



**" AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DOS ANTIGENOS  
INMUNODOMINANTES DE NOCARDIA BRASILIENSIS "**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA.**

**PRESENTA**

**LUCIO VERA CABRERA**

**MONTERREY, N.L., DICIEMBRE 1990**

D.C. LUCIO VERA CABRERA XII - 90

TD  
QR82  
.N6  
V4  
1990  
c.1



1080125911

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA.

PRESENTA

LUCIO VERA CABRERA

Monterrey, N.L., Diciembre 1990

TD  
QR82  
.N6  
V4  
1990



"AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DOS ANTIGENOS INMUNODOMINANTES  
DE Nocardia brasiliensis".

Aceptada por la Subdirección de Investigación y Estudios de  
Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León el \_\_\_\_\_

N O M B R E

F I R M A

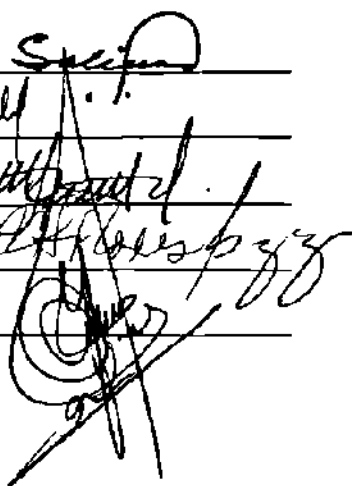
Presidente: Dr. Mario César Salinas Carmona

Secretario: Dr. Oliverio Welsh Lozano

1° Vocal: Dr. Manuel A. Rdz. Quintanilla

2° Vocal: Dra. Ma. del Socorro Flores de C.

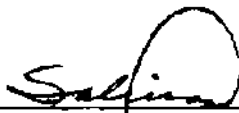
3° Vocal: Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza



The image shows five handwritten signatures, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. A signature for Mario César Salinas Carmona. 2. A signature for Oliverio Welsh Lozano. 3. A signature for Manuel A. Rdz. Quintanilla. 4. A signature for Dra. Ma. del Socorro Flores de C. 5. A signature for Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona.


ASESOR DOCTORAL



---

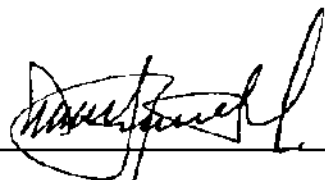
Dr. Mario César Salinas Carmona

CO-ASESORES:



---

Dr. Oliverio Welsh Lozano.



---

Dr. Manuel A. Rodríguez Q.

## DEDICATORIA

A Dios, creador de mi existencia, por haberme permitido llegar a esta meta.

A mis padres, Antonio y Sanjuana, y a mis hermanos, por ser la base fundamental de mi vida.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por su valiosa asesoría y sabios consejos.

A los Doctores Oliverio Welsh Lozano y Manuel A. Rodríguez Quintanilla, quienes siempre me brindaron su apoyo para continuar mis estudios.

Al Dr. Hugo A. Barrera y su equipo de becarios, por la ayuda que siempre me otorgaron.

A los Departamentos de Dermatología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario, por las muestras de suero que gentilmente me proporcionaron para la realización de mi Tesis.

A mi patria, México, que por medio de CONACYT (Beca No. 53507) y la Secretaría de Educación Pública (PRONAES C 88-01-0132) me proporcionó la ayuda económica para llevar a cabo mi proyecto de Doctorado.

Al personal de los Departamentos de Inmunología y Microbiología por su inapreciable ayuda.

A mis amigos, quienes me hicieron más fácil y llevadera mi tesis.

# INDICE.

	Página.
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCION .....	5
III. OBJETIVO .....	14
IV. MATERIAL Y METODOS .....	15
V. RESULTADOS .....	36
VI. DISCUSION .....	51
VII. CONCLUSIONES .....	66
VIII. BIBLIOGRAFIA .....	67
IX. ANEXO A. ABREVIATURAS .....	73
X. ANEXO B. FIGURAS .....	76
XI. ANEXO C. TABLAS .....	97

## R E S U M E N.

El presente trabajo se dividió en tres etapas : 1) La identificación de los antígenos inmunodominantes de N. brasiliensis. 2) El aislamiento de tres de esos antígenos, y 3) La purificación de dichas proteínas inmunodominantes. Como material inicial para llevar a cabo este trabajo, se utilizó un extracto de N. brasiliensis obtenido por sonicación de células desengrasadas y secas. Para determinar los polipéptidos inmunodominantes presentes en el extracto, este se analizó con electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en gradiente, y se transfirió a una matriz sólida de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas al papel se analizaron mediante Western blot, con sueros de pacientes con micetoma, para conocer las proteínas inmunodominantes. Además, se determinaron las reacciones cruzadas con sueros de sujetos aparentemente sanos, de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, así como con sueros de pacientes con enfermedad de Hansen.

En el análisis por SDS-PAGE, se observaron aproximadamente 35-40 bandas del extracto sonicado, mediante la tinción con nitrato de plata. De estas proteínas, seis de ellas fueron reconocidas por más del 50% de los pacientes con micetoma por N. brasiliensis. Tres de éstas, con un peso molecular aproximado de 49, 43 y 42 kilodaltones (kDa), fueron reconocidas muy frecuentemente por sueros de sujetos normales, por pacientes con tuberculosis pulmonar activa y por pacientes con lepra. Las tres restantes, de 61, 26 y 24 kDa, además de ser identificadas por

los pacientes con micetoma por N. brasiliensis, fueron reconocidas por pacientes con micetoma por N. asteroides, y débilmente, por algunos sueros de pacientes con tuberculosis y pacientes con lepra. En base a que las proteínas de 61, 26 y 24 kDa fueron más frecuentemente reconocidas por pacientes con micetoma, así como por mostrar menor reacción cruzada, fueron seleccionadas para ser aisladas y purificadas.

Para aislar las proteínas antes señaladas, se utilizaron las técnicas de filtración en gel, precipitación con solución saturada de sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico.

La mezcla cruda de antígeno se separó mediante filtración en gel en Sephadex G-100, en dos fracciones, una de peso molecular alto (P1), con su pico máximo de absorción cerca del  $V_0$  de la columna, y una de peso molecular bajo (P2) cerca del marcador de 12.4 kDa. El análisis en SDS-PAGE de varios volúmenes de elución del pico P1, mostró que estaba constituido de bandas de peso molecular alto e intermedio. El pico P2 estaba formado casi en su totalidad por la banda de 24 kDa con algunos contaminantes de peso molecular bajo. Esta técnica constituyó un paso preliminar de aislamiento de la proteína de 24 kDa, la cual fue purificada a partir del eluido de Sephadex G-100 que contenía dicha banda (P2). Esta fracción se dializó, se concentró por liofilización, y se aplicó a un gel discontinuo de poliacrilamida, de acuerdo a la técnica de Laemmli, en un sistema no desnaturizante. La porción del gel, en la cual se encontraba la P24, se electroeluyó en un concentrador ISCO. El grado de pureza del electroeluido se

determinó mediante SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, observándose la presencia de una sola banda; en una técnica más sensible, la inmunoelectrotransferencia, tampoco se observaron polipéptidos contaminantes.

Otro método de aislamiento utilizado en la purificación fue la precipitación del extracto crudo con solución saturada de sulfato de amonio a diferentes concentraciones. Al 50% de concentración final, la proteína de 61 kDa precipitó junto con la banda de 24, y de 26 kDa, así como con varias bandas más. A partir de este antígeno enriquecido, se purificaron las bandas de 61, 26 y 24 kDa, mediante la técnica de electroelución en sistema desnaturalizante.

Para obtener las proteínas en forma no desnaturalizada se utilizaron varias técnicas: la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico y la electroelución de geles en condiciones no desnaturalizantes. La cromatografía de afinidad fue realizada con antisueros que fueron obtenidos en conejos inmunizados con proteínas desnaturalizadas purificadas por electroelución. Sin embargo, con este método se obtuvo muy bajo rendimiento.

Con la cromatografía de intercambio iónico, fue posible aislar la banda de 61 kDa semipurificada, pero para obtenerla en un mayor grado de pureza se utilizó la electroelución en geles de poliacrilamida al 10 % sin dodecilsulfato de sodio.

Mediante la electroelución de geles no desnaturalizantes se obtuvo la banda de 61 kDa junto con muy escasas bandas contami-

nantes. Para aumentar el grado de pureza se realizó un segundo paso de electroelución en un sistema desnaturalizante en el que se obtuvo una sola banda al ser analizado en SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia.

## I N T R O D U C C I O N .

El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica que afecta el tejido subcutáneo, y es causado por dos tipos de microorganismos: los eumicetos y los actinomicetos (39). México es uno de los países con más casos reportados, y es, después de Senegal, una de las zonas de mayor incidencia (40, 41) a nivel mundial. Los agentes etiológicos más comunmente aislados son Nocardia brasiliensis, Nocardia asteroides, Actinomadure madurae, A. pelletierii y Streptomyces somaliensis, los cuales en conjunto constituyen alrededor del 98% del total de los casos. De este porcentaje alrededor del 90% es causado por Nocardia brasiliensis (50).

Nocardia es un género perteneciente a la familia Nocardia-ceae incluida en la parte 17 del Manual de Bergey (15). Este género esta antigénicamente muy relacionado con el género Mycobacterium. Son bacilos grampositivos que se dividen por fisión binaria, que al ocurrir la división celular no hay separación del soma bacteriano, formandose una estructura larga denominada hifa microsifonada. Las colonias de Nocardia son muy semejantes a la de los hongos por lo cual durante mucho tiempo se estudiaron como parte de la micología médica.

Los actinomicetos normalmente viven saprofiticamente en el suelo, en la materia orgánica en descomposición, y se introducen

al tejido subcutáneo mediante heridas y traumatismos. En estudios hechos por Gray y Williams (58), se ha encontrado que en terrenos fértiles existen aproximadamente un millón de actinomicetos por gramo de suelo, de los cuales, según Lechevalier 1.98 % son *Nocardia*. Esto sugiere que probablemente existe una constante exposición a estos microorganismos. En los individuos que son expuestos mediante traumas a estos microorganismos, en la mayor parte de las ocasiones, la infección es controlada y desaparece; esta constante exposición se relaciona a un estado de hipersensibilidad tardía hacia antígenos de *Nocardia* en zonas endémicas (46). En algunas ocasiones, los microorganismos son capaces de evadir los mecanismos de defensa del huésped y producir enfermedad. Esto es debido, probablemente, a factores de virulencia de la bacteria o a deficiencias del sistema inmune del paciente. Las bacterias inicialmente se reproducen en los macrófagos, y conforme avanza la infección se forman microcolonias del microorganismo, llamadas gránulos (50). En los casos graves se observa destrucción de músculo y de hueso. Esta destrucción puede deberse a que la bacteria produce proteasas y/o fosfatasas que degradan el tejido óseo, lo cual permite la extensión de la infección (50, 70).

Hace algunos años, la infección por *N. brasiliensis* en muchos de los casos, era de pronóstico difícil y a veces era necesaria la amputación del miembro afectado para evitar la diseminación; inclusive después de la extirpación quirúrgica del



miembro afectado, algunas veces tendían a recidivar en áreas cercanas a la porción amputada. Recientemente Welsh y colaboradores, han propuesto un esquema de tratamiento efectivo para esta enfermedad (65); sin embargo, los mecanismos inmunológicos de los cuales depende la instalación de la infección y/o la recuperación de la misma, no se han determinado, ya que no se conocen completamente los factores de virulencia de la bacteria ni los mecanismos inmunes de resistencia a la infección.

Los factores de virulencia bacteriana incluyen entre otros, la producción de toxinas, como en el caso de Corynebacterium diphtheriae y Clostridium tetani, y la producción de proteasas como Cl. perfringens y Pseudomonas aeruginosa. En el caso de Nocardia brasiliensis se desconoce si tiene alguna actividad toxigénica, pero se ha descrito el aislamiento de una proteasa por Zlotnik et al. (70), lo cual concuerda con la hidrólisis de algunos compuestos por esta bacteria, entre ellos caseína, elastina y gelatina (28). Las proteasas probablemente constituyan un factor de virulencia al facilitar la infiltración de la bacteria al tejido, pero esto no ha sido demostrado, aunque existe evidencia indirecta. Por ejemplo, al comparar el micetoma eumicótico con el actinomicótico, se observa que este último es de evolución más rápida y agresiva quizá por poseer estas proteasas (50).

Al introducirse un microorganismo a los tejidos del huésped el primer factor de resistencia natural lo constituyen los meca-

nismos fagocíticos no estimulados inmunológicamente. En 1980 Filice et al. observaron que al incubar suspensiones unicelulares de Nocardia asteroides con monocitos y polimorfonucleares de sujetos aparentemente sanos, la capacidad de fagocitar Nocardia, de ambas células, fue de un 10 a un 20%; en cambio, la bacteria testigo, Staphylococcus aureus, fue destruída hasta un 90 % (26). Estos experimentos indican que Nocardia posee cierta resistencia a la digestión intracelular por fagocitos mononucleares y polimorfonucleares, lo cual es apoyado por estudios realizados en macrófagos, otros autores. En dichos estudios se observó que las células de N. asteroides inhibían la fusión fagosoma-lisosoma (20, 21), además de impedir la disminución del pH dentro del fagosoma (11). Posiblemente, ambos mecanismos podrían ser causantes de la resistencia de estos microorganismos a los mecanismos fagocíticos.

Sin embargo, en la infección natural, la cantidad de células de Nocardia es muy baja, comparada con la utilizadas in vitro, y eso probablemente permite la restricción de la infección y el desarrollo de una respuesta inmune, tanto humoral como celular, en la mayoría de los individuos. Por otro lado, se desconocen los factores de los cuales depende la instalación de la infección en algunas personas, las cuales desarrollan la enfermedad.

La respuesta inmune por anticuerpos es importante, principalmente, en las infecciones causadas por microorganismos extra-

celulares y virus (51). El efecto de estos anticuerpos es el de neutralizar, en el segundo caso, y el de opsonizar y/o lisar en el primero. Este tipo de respuesta inmune se ha visto que es importante en infecciones por enterobacterias, influenza, neumonía por Streptococcus pneumoniae, etc. En el caso de infecciones por Nocardia parece ser que los anticuerpos son de escasa importancia en la resistencia a la enfermedad. Beaman en 1982 (9) estudió la respuesta inmune humoral en un modelo de infección en ratones CBA/N x DEA2/F1. Estos ratones característicamente tienen una disfunción de los linfocitos B ligada al cromosoma X, de tal forma que los machos son incapaces de producir anticuerpos, siendo las hembras completamente inmunocompetentes. Al determinar la Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de M. asteroides en estos animales, se observó que los machos no eran más susceptibles que sus equivalentes hembras, aún cuando éstas eran capaces de producir anticuerpos específicos. Krick (35) y Rico (48) estudiaron el efecto de la transferencia de suero inmune a ratones, sin poder demostrar un efecto protector a un reto posterior a Nocardia. Estos datos sobre la respuesta inmune humoral a Nocardia, sugieren que que los anticuerpos no juegan un papel importante en la resistencia a la infección, y que inclusive podrían aumentar la gravedad de las lesiones (48).

En los micetomas por Nocardia se ha observado que en pacientes con enfermedad avanzada y de mal pronóstico (30) existe escasa reactividad de hipersensibilidad tardía con antígeno polisacá-

rido de N. brasiliensis; en cambio, en los pacientes con regresión en sus lesiones, la reactividad se vuelve positiva. Estos datos sugieren que un estado de resistencia a la infección se correlaciona con la aparición de una respuesta inmune celular.

Posteriormente, otros autores utilizaron modelos animales y experimentos in vitro para estudiar la relevancia de la respuesta inmune celular en infecciones por Nocardia. Melendro y Ximénez - (42, 66) utilizaron modelos murinos de infección y observaron que existe resistencia cruzada entre N. brasiliensis y otros microorganismos intracelulares, tales como Listeria monocytogenes y el bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Esto probablemente se debe a que existen mecanismos de resistencia similares que se desarrollan contra la infección por microorganismos intracelulares, particularmente la activación de macrófagos (25). Deem, en 1982, (22) estudió la transferencia de inmunidad, a ratones atímicos desnudos, hacia Nocardia asteroides mediante células esplénicas totales y linfocitos T de ratones inmunizados con este microorganismo. En estos experimentos, los autores observaron una mayor - sobrevivencia de los animales transferidos, así como una mayor capacidad para eliminar estas bacterias de bazo e hígado; en cambio, los ratones controles tuvieron un alto grado de mortalidad.

En resumen, parece ser que la resistencia a infecciones por Nocardia está dada por mecanismos inmunes celulares, y no se ha

demostrado que los anticuerpos tengan un papel importante en la resistencia a la infección.

Sin embargo, la mayoría de los experimentos realizados a la fecha sobre la relación hospedero-parásito, en infecciones por *Nocardia*, han sido hechos con antígenos crudos o bacterias completas, sin haberse determinado los componentes específicos que interaccionan con el sistema inmune. Es por esto que es necesario determinar cuales son los antígenos de *N. brasiliensis* que son inmunodominantes y aislarlos para poder analizar más adecuadamente los mecanismos inmunológicos que participan en esta enfermedad.

La pared celular de *Nocardia* está compuesta de un esqueleto de peptidoglucano el cual se asocia a proteínas y polisacáridos (Arabino-galacto-glucana) (58, 61). A semejanza de las micobacterias, la pared de *Nocardia* está constituida alrededor de 40% de lípidos, entre ellos ácidos grasos, carotenos, ácidos Nocardio-micólicos y ceras (37).

Además de *N. brasiliensis*, la otra especie patógena más frecuentemente aislada, es *Nocardia asteroides*, la cual es una especie filogenéticamente muy cercana a *N. brasiliensis*, pero a diferencia de ésta produce cuadros clínicos pulmonares denominados - Nocardiosis, los cuales se presentan principalmente en individuos inmunocomprometidos (54). Además de la Nocardiosis, *N. asteroides*

es un raro agente causal de micetoma. Microscópicamente, N.asteroides se observa en forma de bacilos Ziehl-Neelsen positivos, y se le asocia comunmente a micetoma sin granos. Gran parte de los estudios experimentales sobre la relación huésped parásito en infecciones por Nocardia se han realizado con N.asteroides, y por lo tanto esta especie está mejor caracterizada.

Sugar et al., en 1987, identificaron dos antígenos de N.asteroides útiles en el diagnóstico de la Nocardiosis; uno con un peso molecular de 55 kDa y otro con un peso molecular de 31 kDa (55). La proteína de 55 kDa la utilizaron en un ensayo de ELISA, en la cual el 95% de los sueros de pacientes con nocardiosis dieron positivos sin haber reacción cruzada con sueros de pacientes con tuberculosis (2). Este ensayo parece ser prometedor en el diagnóstico de la Nocardiosis.

Sobre los antígenos proteicos inmunodominantes de Nocardia brasiliensis, se conoce muy poco. En 1972 Ortiz y colaboradores, utilizaron un extracto crudo de este microorganismo obtenido mediante rompimiento mecánico de células desengrasadas y desecadas (45). El extracto se utilizó para realizar pruebas de hipersensibilidad tardía en sujetos con micetoma y en animales de experimentación. Estos autores observaron que personas con micetoma, así como aquellos que vivían en una zona endémica, presentaban una reacción positiva con este extracto antigénico (46). En estudios posteriores, este antígeno fue utilizado para determinar anticuerpos anti-Nocardia, (19, 48, 66) por lo cual consideramos que

dicho extracto contiene los componentes estimuladores de las respuestas inmune celular y humoral. Sin embargo, se desconocen el o los componentes individuales que reaccionan con los anticuerpos o células sensibilizadas. Debido a ello es importante obtener las fracciones inmunogénicas de N. brasiliensis, ya que el purificar estos antígenos inmunodominantes nos permitirá realizar experimentos para conocer más sobre los mecanismos inmunológicos de defensa contra la infección por Nocardia. Eventualmente, en base al conocimiento de estos antígenos inmunodominantes, se podrán desarrollar métodos serológicos, rápidos y confiables, que ayuden al clínico en el diagnóstico y la evaluación terapéutica de esta enfermedad.

**OBJETIVOS:**

- 1) Identificar, en un extracto sonicado de Nocardia brasiliensis, los polipéptidos que son inmunodominantes.
- 2) Aislar mediante métodos fisicoquímicos las principales proteínas inmunodominantes de N. brasiliensis.
- 3) Purificar dichas proteínas inmunodominantes.



## M A T E R I A L Y M E T O D O S.

### A. OBTENCION DEL EXTRACTO SONICADO

1. Cepa bacteriana de Nocardia brasiliensis.- La cepa de Nocardia brasiliensis utilizada en este trabajo, se obtuvo a partir de lesiones de un paciente con micetoma dorsal del Hospital Universitario " José Eleuterio González " de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La especie de Nocardia se determinó mediante pruebas bioquímicas convencionales (28), y se conservó por resiembra en agar Saboreaud. Posteriormente se reconfirmó su identidad por el Dr. Libero Ajello en el Centro para el Control de Enfermedades (Center for Disease Control) en Atlanta, GA. E.U.A.

2. Obtención de suspensiones unicelulares de N. brasiliensis.- Esta bacteria crece en forma de micelio, lo que dificulta el conteo de células, por lo cual se hicieron preparaciones unicelulares. De las colonias crecidas en agar Saboreaud se tomaron algunos fragmentos pequeños y se inocularon en matraces de 125 ml con 30 ml de Infusión Cerebro Corazón (BHI, Brain Heart Infusion, - Difco Det. Mich.). Estos cultivos se incubaron a 37°C en baño de agua con agitación mecánica durante 48 h. El cultivo se cosechó por centrifugación y se lavó, tres veces, con solución salina estéril. La masa bacteriana se trituró por 1.5 min en un homogenizador de 25 ml (Eberbach). Las colonias no fragmentadas y los filamentos miceliales grandes se separaron por centrifugación a 100

g por 5 min (4). El sobrenadante se observó al microscopio y se comprobó que estuviera formada por fragmentos pequeños y células de *Nocardia*.

3. Obtención del extracto sonicado de *Nocardia brasiliensis*. - El inóculo inicial lo constituyó una suspensión unicelular. De esta suspensión se tomaron 0.5 ml y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 1 litro con 160 ml de BHI. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 7 días, al término de los cuales la masa bacteriana se cosechó por centrifugación, y se lavó con agua destilada estéril en 4 ocasiones. Las bacterias se desengrasaron con alcohol etílico-éter etílico 1:1 en repetidas ocasiones hasta eliminar el color amarillento de la masa bacteriana, y luego se secó a temperatura ambiente. Las bacterias secas se resuspendieron en solución amortiguadora Tris 0.01 M, pH 7.4, con acetato de magnesio tetrahidratado 0.01 M, en una proporción aproximada de 10% p/v. La suspensión se sonicó en un aparato Biosonik (Bronwill Scientific, Rochester, N.Y.) en 6 intervalos de 5 minutos, a una intensidad de la punta de titanio de 60%. La sonicación se llevó a cabo en baño de hielo. Al terminar, el sonicado se observó al microscopio para asegurar que el rompimiento fuera un mínimo del 95%. Las células enteras y los restos miceliales se separaron por centrifugación a 3,020 g durante 15 min.. Las paredes bacterianas se separaron a 22,000 g durante 60 min, y finalmente la fracción soluble se obtuvo por ultracentrifugación a 144,000 g durante 3 horas. El sobrenadante se dializó 24 horas contra agua bidestila-

da en un saco de diálisis con un poro de exclusión molecular de 12-14,000 daltones (Sigma, 250-9U). El dializado se separó en - alicuotas y se liofilizó. La cantidad de proteína se determinó por los métodos de Biuret (53) y de Lowry (38). Los azúcares - totales se cuantificaron por el método de Dubois (23). Este anti- geno constituyó el extracto sonicado con el cual se hicieron los análisis de inmunoelectrotransferencia (16, 59)

## B. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

1. Análisis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), del extracto sonicado.- El análisis de los componen- tes del extracto sonicado de N. brasiliensis se realizó por elec- troforesis en gel de poliacrilamida en gradiente, con dodecilsul- fato de sodio como agente desnaturizante. Se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli (36), con un gel de empaquetamiento al 5% T, y geles de corrimiento a varias concentraciones para determi- nar en cual de ellas se obtenía mayor resolución. Se utilizaron geles lineales al 12 y 8 %, y un gel en gradiente de 18 a 8.75% T, el cual se preparó de la siguiente manera :

GEL DE CORRIMIENTO

Concentración (% T) :                      8.75                      18

Acrilamida-Bisacrilamida (30 % T, 2.7 % C).	2.04 mls.	4.197 mls.
Buffer Tris-HCl 3 M, pH 8.8.	1.32 "	1.32 "
Laurilsulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS.) al 10%.	0.069 "	0.069 "
Agua Tridestilada.	3.060 "	0.645 "
Glicerina al 50 %.	0.480 "	0.740 "
Persulfato de Amonio al 5%.	0.025 "	0.025 "
N, N, N', N', Tetrametiletilen- diamina (TEMED).	0.003 "	0.003 "
	<hr/>	<hr/>
Volumen Total :	7.0 ml	7.0 ml

La solución de acrilamida al 8.75% T, se vació en la cámara izquierda del aparato formador de gradientes (Bio Rad Laboratories), y la solución concentrada se vació en la cámara derecha. La unión entre las dos cámaras se abrió, y el gradiente se formó en la cámara derecha con la ayuda de un agitador magnético. El gel se vació en un cassette de 21 x 14 cm con espaciadores de 0.75 mm, mediante una bomba peristáltica (LKB 2132 MICROPERPEX) a una velocidad aproximada de 1 ml por minuto. Después se colocó una capa de agua para evitar el contacto de la acrilamida con el

aire, el cual inhibe su polimerización.

Después que el gel se polimerizó (aproximadamente 30-45 -- min), eliminamos la capa de agua y secamos con papel filtro. Enseguida se colocó el peine de teflon para formar los pozos de -- carga, y vaciamos el gel concentrador el cual fue preparado de la siguiente manera :

GEL CONCENTRADOR AL 5 % T

---

Acrilamida-Bisacrilamida		
(30 % T, 2.7 % C)	0.1665	ml
Buffer Tris-HCl 1 M, pH 6.8.	0.125	"
Agua Tridestilada	0.66	"
SDS al 10 %.	0.01	"
Persulfato de amonio al 5 %.	0.014	"
TEMED.	0.001	"

---

Una vez que el gel polimerizó, se quitó el peine así como el espaciador inferior, y posteriormente se colocó en la cámara de

electroforesis. Como buffer de electroforesis utilizamos Tris 125 mM, Glicina 192 mM con SDS al 0.1 %.

El antígeno se mezcló con el buffer de muestra (SDS al 10%, 2-mercaptoetanol al 10% v/v, Sacarosa al 50 % en buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 con azul de bromofenol como indicador del frente de iones), y se calentó en un baño de agua en ebullición durante 2 minutos, luego se enfrió y fue aplicado al sistema. La electroforesis se llevó a cabo a un voltage constante de 150 v, hasta que el colorante indicador del frente de iones llegó al extremo inferior del gel, el cual se tiñó con nitrato de plata, o con Azul de Coomassie, de la siguiente manera :

#### TECNICA DE TINCION CON NITRATO DE PLATA.

1. Las proteínas se fijaron con solución de metanol al 50 % y ácido acético al 12 %, durante 20 minutos.
2. El SDS se eliminó del gel mediante tres lavados con solución de etanol al 10 % y ácido acético al 5 %.
3. El gel se colocó en solución oxidante ( $K_2Cr_2O_7$ , 3.4 mM,  $HNO_3$ , 3.22 mM) durante 5 min..
4. El oxidante se eliminó con tres lavados de 10 min. en agua tridestilada.
5. El gel se incubó en solución con nitrato de plata ( $AgNO_3$ , 12 mM) durante 30 min, de los cuales, los primeros 5 min se llevaron a cabo en luz intensa.
6. Las bandas se desarrollaron mediante una solución reveladora

( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 280 mM con 0.5 ml de formaldehído conc. por litro de solución). Una vez que se observaron las bandas, la reacción se detuvo con ácido acético al 1 %.

#### TECNICA DE TINCION CON AZUL DE COOMASSIE.

1. El gel se dejó 30 minutos en solución de Azul de Coomassie R-250 al 0.1 %, en metanol al 40% y ácido acético al 10 %.
2. Posteriormente se destiñó con metanol al 40 % y ácido acético al 10 %, para remover el colorante que no se unió a las proteínas.

Los geles teñidos tanto con la tinción argéntica como con Azul de Coomassie se guardaron en glicerina al 10%. Como estándares de peso molecular (Daltones [Da]), se utilizaron las siguientes proteínas : Miosina de músculo de conejo (205,000), -beta-galactosidasa de Escherichia coli (116,000), Fosforilasa B de músculo de conejo (97,400), Albúmina Sérica Bovina (66,000), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36,000), Anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29,000), Tripsinógeno tratado con fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (24,000), Inhibidor de tripsina de frijol de soya (20,100) y alfa-lactábumina (14,200). Estos estándares se obtuvieron de Sigma (SDS-6H y Dalton Mark VII-L), y se prepararon de acuerdo a las instrucciones de esta casa comercial.

2. Inmunolectrotransferencia (Western Blot)..- Se preparó un gel de poliacrilamida en gradiente de 18 a 8.75% con un gel de empaquetamiento al 5 %, de acuerdo a la técnica de Laemmli. Para este ensayo se utilizó un peine de 13 cm por 0.75 mm de grosor, y se aplicaron 25 µg de antígeno por cada 0.8 cm. El gel se corrió en las condiciones descritas arriba, y se transfirió a papel de nitrocelulosa de 0.45 micras de porosidad (Bio Rad Lab.). La transferencia se llevó a cabo en un buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 con metanol al 20 %. Las proteínas del gel se transfirieron al papel mediante la aplicación de un voltage constante de 240 v (aproximadamente 0.75 Amperios) durante 90 min. Se utilizó un sistema de enfriamiento (LKB 2209 multitemp) para evitar el calentamiento y la evaporación del buffer. Al término de la transferencia, el gel se tiñó con nitrato de plata para determinar la eficiencia de la transferencia. El papel se bloqueó con gelatina de pescado (Hipur Liquid Gelatin, Norland Products, New Brunswick, N.J.) al 3 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 60 min. a 37°C. Posteriormente se lavó con solución de lavado (Gelatina 0.3 % en PBS-tween 20 1:1000), y se cortó en tirillas. Las tiras se incubaron durante 2 horas a 37°C con los sueros diluidos 1:25 en gelatina al 1.5 % en PBS con Tween 20 1:1000. Después de lavar 6 veces con solución de lavado, las tiras se incubaron con anti-inmunoglobulinas humanas totales (A 8400 Sigma) marcadas con peroxidasa, diluidas 1:1000 en solución de lavado. El conjugado se incubó con las tiras durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Las tiras



se lavaron de nuevo y se incubaron con la solución sustrato - (3,3',-diaminobencidina [Tetraclorhidrato] al 0.05 % en PBS), la cual se activó con peróxido de hidrógeno (40 µl de la solución al 30% por cada 20 ml de solución de diaminobencidina). Después de unos minutos, la reacción se detuvo con HCl 1 N. Las tiras se lavaron con agua tridestilada y se secaron para su análisis posterior.

**3. Muestras de sueros analizadas por electrotransferencia.-** Los sueros de pacientes con micetoma diagnosticado por estudio clínico, biopsia y cultivo, fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Oliverio Welsh del departamento de Dermatología. Estos pacientes no habían recibido tratamiento alguno. Se obtuvieron 16 sueros de pacientes con micetoma por M. brasiliensis, y tres por M. asteroides. Además de los pacientes con micetoma, se obtuvieron 25 sueros de sujetos aparentemente sanos. Para observar la reacción cruzada con Mycobacterium, se analizaron 17 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, y 13 sueros de pacientes con enfermedad de Hansen, en los ensayos de electrotransferencia.

Todos los sueros se dividieron en alícuotas, y se guardaron a -20°C hasta su uso.

**4. Determinación del peso molecular de las bandas identificadas en los ensayos de inmunolectrotransferencia.-** El peso molecular

de las bandas del extracto sonicado de N. brasiliensis identificadas por los sueros de los pacientes, en el papel de nitrocelulosa, se calculó mediante el siguiente método : se utilizó un gel en gradiente de 18 a 8.75% y se corrió el antígeno en dos carriles; el primero, para la técnica de inmunotransferencia (30  $\mu$ g/cm), y el segundo, para transferir y tefir con Azul de Coomassie (100  $\mu$ g/cm). Al lado del segundo carril de antígeno se colocaron los marcadores de peso molecular. Después de la transferencia, el papel del carril no 2 se tiñó con solución de Azul de Coomassie (40% de metanol, 10% de ácido acético, y 0.2% de Azul de Coomassie R 250) durante 10 min. Se destiñó con solución de metanol al 90% y ácido acético al 2%. Al terminar de destañir, el papel se equilibró en PBS. El otro carril se reveló con un suero de paciente con micetoma por N. brasiliensis.

5. Adsorción de los anticuerpos de reacción cruzada con Mycobacterium. - 50 mg de Mycobacterium tuberculosis H37Ra muertas por calor (Difco, Det. Mich.) se lavaron con solución salina isotónica estéril, luego se secaron a 50°C y se desengrasaron 2 veces con 7 ml de éter etílico anhidro. El paquete de células se secó al vacío y fue triturado en un homogenizador Elvehjem-Potter. Las micobacterias se mezclaron con 200  $\mu$ l de suero de conejo, anti-extracto crudo de N. brasiliensis precipitado con sulfato de amonio a una saturación del 50% (Título 1:4 en inmunodifusión), y se les agregó 200  $\mu$ l de PBS. La mezcla se incubó a 37°C por 30 min, y posteriormente se centrifugó a 13,500 rpm du--

rante 30 min. El sobrenadante se diluyó 1:100 para el ensayo de inmunolectrotransferencia, y fue procesado como se describió anteriormente en los ensayos de western blot.

### C. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE 61, 26 Y 24 kDa.

Una vez conocidas las bandas más inmunogénicas del extracto sonificado de Nocardia brasiliensis, se procedió a su aislamiento. Para ello se utilizaron las técnicas de filtración en gel y precipitación con sulfato de amonio.

1. Cromatografía de filtración en gel. - Para los ensayos de filtración en gel se utilizó como matriz de soporte el Sephadex, grado fino, de varios tamaños de poro (Sephadex G-200, G-100 y G-25). De ellos, la mejor resolución se obtuvo con el Sephadex G-100. La técnica se realizó de la siguiente manera : se utilizó una columna de vidrio con recubrimiento interior de borosilicato de 1.6 cm de diámetro, así como adaptadores de membrana de nylon como soporte del gel (LKB 2137). Como matriz utilizamos Sephadex G-100 grado fino con una capacidad de retención de agua de 10 ml por gramo de peso seco. Se pesaron 10 g de Sephadex para montar una columna de 40 x 1.6 cm , se suspendió en agua bidestilada y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con agua bidestilada. Posteriormente se equilibró en PBS y al final fue suspendido en PBS en una proporción 1:1 v/v. Con este material se empacó una columna por gravedad, y se lavó con PBS al

flujo normal de trabajo (0.5 ml por minuto). Para determinar el volumen vacío de la columna se aplicó Dextrán Azul, (P.M. aprox. 2,000 kDa, Sigma. [2 mg en 0.4 ml de PBS con glicerina al 5 %]), y se eluyó al flujo de trabajo. Se tomaron alícuotas de 2 ml y se leyeron en un espectrofotómetro PMQ3 (Carl Zeiss), a una longitud de onda de 280 nm. De la misma forma se aplicaron cuatro proteínas de peso molecular conocido, para determinar su volumen de elución. Las proteínas utilizadas fueron las siguientes : Beta-amilasa, P.M. 200 kDa, (4 mg en 0.5 ml), Alcohol deshidrogenasa, P.M. 150 kDa, (5 mg en 0.5 ml), Anhidrasa carbónica, P.M. 29 kDa (3 mg en 0.5 ml) y Citocromo C, P.M. 12.4 kDa, (2 mg en 0.5 ml). Se graficó la absorbancia a 280 nm de las alícuotas obtenidas contra el volumen de elución (Ve) de las mismas.

A la muestra de antígeno crudo agregamos deoxiribonucleasa I (Sigma), 1 µg por mg de proteína, y se incubó a 37°C en baño de agua durante 2 horas. La muestra se centrifugó a 3,500 rpm por 5 min (Sero-fuge II, Clay Adams), y el sobrenadante se aplicó a la columna. Posteriormente se eluyó con PBS al flujo de trabajo, y se colectaron alícuotas de 2 ml, a las cuales se les determinó la absorbancia a 280 nm y se analizaron con SDS-PAGE en gradiente, de acuerdo a la técnica descrita arriba.

**3. Fraccionamiento del antígeno crudo de *N. brasiliensis* mediante precipitación con sulfato de amonio (Salting Out).** - Para separar el antígeno crudo en fracciones, utilizamos la precipitación con

sulfato de amonio. Para los ensayos analíticos se precipitó -  
aproximadamente 1 mg de extracto crudo de N. brasiliensis con  
solución saturada de sulfato de amonio  $[(NH_4)_2SO_4]$ , pH 7.2, a las  
concentraciones finales de 20, 50, 70 y 80 %. Los precipitados -  
obtenidos se resuspendieron en un volumen mínimo de solución sa-  
lina boratos (SSB), pH 8.4-8.5, y se dializaron extensivamente -  
contra SSB. Los precipitados dializados se analizaron mediante  
SDS-PAGE.

Posteriormente utilizamos la técnica de inmunoelectrotrans-  
ferencia para confirmar la identidad de las bandas precipitadas,  
y seleccionar aquella concentración de sulfato de amonio en la  
que se observara la precipitación de las bandas de 61, 26 y 24  
kDa con mínimos contaminantes.

4. Cromatografía de Intercambio Iónico. - Utilizamos la cromato-  
grafía de intercambio iónico con una matriz catiónica, la dietil-  
aminoetilcelulosa (Sigma) con una capacidad intercambiadora media  
(1 meq/gr. de peso seco) (64). La resina en forma microgranular se  
pesó (10 g) y se suspendió en NaOH 0.5 N. Posteriormente se lavó  
5 veces con la misma solución alcalina. Después se eliminó el -  
NaOH mediante lavados con agua bidestilada hasta alcanzar un pH  
neutro. La resina se equilibró en buffer de trabajo (Tris-HCl -  
0.01 M, pH 8.00), se empacó en una columna de 8.1 x 1.6 cm -  
(LKB), y se lavó con el buffer de trabajo a un flujo de 25 ml por  
hora. Se aplicaron aproximadamente 1.5 mg de precipitado al 50 %,

a la columna, con la ayuda de una llave de tres vías, y se lavó con buffer para eliminar las proteínas no adsortas a la resina. Las proteínas adheridas se eluyeron de la resina mediante un gradiente de concentración de NaCl de 0.0 a 0.3 M, y luego con uno de 0.3 a 0.6 M. Se tomaron algunas alícuotas de los eluidos de la columna y se analizaron por SDS-PAGE.

D. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE 61, 26 Y 24 kDa DE  
N. brasiliensis EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

1. Electroelución en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio.- Ya que con la precipitación del antígeno crudo con sulfato de amonio al 50% se obtenía un antígeno constituido principalmente por las bandas de 61, 26 y 24 kDa, decidimos purificarlas mediante electroelución en condiciones desnaturalizantes.

Para determinar la posición de cada proteína en el gel utilizamos 6 proteínas preteñidas (Bio Rad), las cuales se corrieron junto con el precipitado al 50 % en un gel de poliacrilamida-SDS lineal al 12 %, de 0.5 mm de espesor. El gel se tiñó con Azul de Coomassie, y se determinó la posición de las proteínas de 61, 26 y 24 kDa con respecto a la migración de las proteínas preteñidas.

Después se realizaron ensayos con geles de mayor capacidad (preparativos) con espaciadores de 3 mm de espesor y peine continuo de 13 cm de largo. Se utilizó el sistema de Laemmli anteriormente descrito, pero se utilizó un buffer de electroforesis de doble concentración (Tris 50 mM, Glicina 384 mM con SDS al 0.1 %).

Se aplicó aproximadamente 1 mg de ppt.50, y a ambos lados del carril del antígeno, se aplicaron 80 µl de los marcadores preteñidos. La electroforesis se llevó a cabo a un voltage cons--

tante de 150 v durante aproximadamente 4 horas y después se cortó el fragmento del gel que contenía cada proteína. Para obtener la proteína de 61 kDa cortamos justamente arriba de la albúmina sérica bovina. La proteína de 26 kDa se encontraba debajo de la banda correspondiente a la lisozima, y la 24 kDa se obtuvo cortando inmediatamente debajo de la proteína de 26 kDa

**Electroelución.**- Los fragmentos obtenidos anteriormente se cortaron en fracciones más pequeñas y se colocaron en la cámara anódica de un electroelutor ISCO (Lincoln, NE). El sistema de electroforesis estuvo constituido de un buffer de electrodo de Tris 50 mM, Glicina 384 mM, y como buffer de cámara se utilizó este mismo buffer diluido 10 veces. Ambas soluciones estuvieron separadas por una membrana de diálisis con un límite de exclusión molecular de 12 a 14,000 Da. La electroelución se llevó a cabo a un voltage constante de 120 v. Para determinar el tiempo de elución se colocaron fragmentos del gel con las proteínas preteñidas, y la electroelución se detuvo una vez que toda la proteína se transfirió a la cámara anódica (aproximadamente 2 horas). Los electroeluidos se recogieron y se guardaron a -20°C. El grado de pureza se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con plata.



**E. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE 61 Y 24 kDa DE  
N. brasiliensis POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.**

**1. Producción de sueros monoespecíficos anti 61, 26 y 24 kDa.-**

Una vez que se purificaron las proteínas de 61, 26 y 24 kDa, mediante electroelución en sistema desnaturalizante, se procedió a inmunizar a conejos Nueva Zelanda con cada una de ellas. Inicialmente se aplicaron, emulsificadas en adyuvante incompleto de Freund, por vía subcutánea dorsal, con reinmunizaciones posteriores por vía intramuscular en las piernas, y después por vía intraperitoneal. Se inmunizaron 2 conejos con el fragmento de gel que contenía la banda de 61 kDa proveniente de 700 µg de precipitado al 50 %, y se continuó con reinmunizaciones de aproximadamente 10 µg de proteína electroeluida pura. Para las proteínas de 26 y 24 kDa se siguió un protocolo similar. Todas las inmunizaciones se realizaron con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) y los títulos de anticuerpos producidos se determinaron mediante la técnica de inmunodifusión en gel (27).

La fracción gama de los sueros, rica en anticuerpos, se obtuvo por precipitación con sulfato de amonio al 50 % y reprecipitación al 33 %. El precipitado final se redisolvió en solución salina y se dializó exhaustivamente contra solución salina boratos (SSB), pH 8.4, hasta que se eliminó todo el sulfato de amonio. La concentración de proteína se determinó por el método de Biuret.

**2. Acoplamiento de la gamaglobulina de conejo anti-61 kDa con la matriz de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno.-** 8 g de la Sepharosa 4B (Sigma) se hidrataron con 40 ml de HCl 1 mM durante 15 min (47). Posteriormente se lavó por decantación con 1600 ml de HCl 1 mM y se equilibró en buffer de acoplamiento - (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M con NaCl 0.5 M). El gel se mezcló con la gamaglobulina en una relación de 10 mg por ml durante 12 horas a 4°C con agitación constante. Los sitios residuales de fijación se bloquearon con glicina 0.2 M, pH 8.0 durante 2 horas. Luego el gel se lavó con 3 ciclos de buffer de acetato 0.1 M, pH 4.4, y buffer de acoplamiento. Se equilibró en PBS y se lavó con KSCN 3 M para posteriormente volverse a equilibrar con PBS.

Una vez preparado el inmunoadsorbente anti-61 kDa, este se incubó con la muestra de antígeno crudo (10 mg) o ppt 50 (1 mg) durante 45 min a 37°C. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se eliminó. Luego, el gel se lavó exhaustivamente con PBS (Aprox. 500 ml) y se agregó el agente eluyente, KSCN 3 M, con el cual se incubó por 10 min a temperatura ambiente. El eluyente se separó de la matriz de gel por centrifugación, se dializó extensivamente contra solución salina y se concentró por liofilización. La calidad de la proteína eluida se evaluó por análisis en SDS-PAGE y tinción con plata. Además, el eluido con KSCN se transfirió a papel de nitrocelulosa y las tirillas se revelaron por separado con un suero de paciente con micetoma, y un anticuerpo monoclonal anti 61-kDA(Y4E2) (52).

**F. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE 61 Y 24 kDa POR  
ELECTROELUCION EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES.**

1. Purificación de la proteína de 24 kDa. - Para este ensayo, se utilizó el extracto sonicado crudo (aprox. 40 mg) o bien el sobrenadante de su precipitación al 50 % con sulfato de amonio. Inicialmente el antígeno se pasó por la columna de filtración en gel con Sephadex G-100. Una vez conocido el volumen de elución en el cual se obtenía la banda de 24 kDa, se tomaron las alícuotas correspondientes, y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones donde se encontró la banda de 24 kDa se mezclaron y se dializaron contra agua bidestilada para eliminar el buffer de fosfatos. Posteriormente se concentraron por liofilización, y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Tanto los ensayos de filtración en gel como las electroforesis preparativas se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$  para conservar la integridad de la proteína lo más posible.

El liofilizado de la fracción 2 se resuspendió en 1 ml de agua tridestilada, y se mezcló con 333  $\mu\text{l}$  de buffer de muestra sin SDS y sin beta-mercaptoetanol. La muestra se aplicó a un sistema preparativo de electroforesis en gel de poliacrilamida (12% T), en sistema discontinuo de Laemmli, sin SDS. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 v por 4 horas.

Después de determinar la posición de P24 mediante la tinción de un fragmento del gel, se cortó la fracción que contenía la banda de 24 kDa, y se colocó en la cámara catódica del Concentrador - ISCO. La proteína se electroeluyó de acuerdo a la técnica descrita anteriormente.

Para determinar el grado de pureza obtenido, el electroeluido se analizó por SDS-PAGE, e inmunoelectrotransferencia. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (13).

## 2. Purificación de la proteína de 61 kDa de N. brasiliensis.

Para determinar la posición de la proteína de 61 kDa, en condiciones no-desnaturalizantes, se corrió una muestra que contenía una gran proporción de esta banda (eluido de DEAE-celulosa) en un gel de poliacrilamida al 12% sin SDS. Las bandas más fuertemente teñidas fueron electroeluidas y analizadas en SDS-PAGE.

Una vez conocida la posición de la proteína de 61 kDa en geles no-desnaturalizantes, se hicieron geles en escala preparativa de 3 mm de grosor con capacidad de 1-1.5 mg de un precipitado del extracto crudo obtenido con sulfato de amonio al 50 %. La posición de la proteína en el gel se determinó por comparación de la migración de proteínas preteñidas (Bio Rad). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema discontinuo de Laemmli, sin SDS, con un gel de corrimiento al 10 %, con un voltaje constante de 150 v,

y finalmente la proteína de 61 kDa se electroeluyó en la forma ya descrita. El electroeluido obtenido se analizó en un gel de poli-acrilamida al 12%, con SDS, y la cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (13).

## R E S U L T A D O S.

### I. OBTENCION DEL ANTIGENO CRUDO

a). Obtención de inóculos para el cultivo en masa de *Nocardia brasiliensis*.- Mediante la inoculación de suspensiones unicelulares de *N. brasiliensis* obtuvimos una mayor cantidad de masa bacteriana que con la inoculación con fragmentos de colonias crecidas en agar Saboureaud. La masa bacteriana obtenida de 6 litros de BHI fue de aproximadamente 100 g de masa húmeda, de la cual se extrajeron aproximadamente 300 mg de extracto crudo.

b) Determinación de proteínas y carbohidratos del extracto crudo.- Al extracto crudo se le determinó la cantidad de proteína por los métodos de Lowry y Biuret, así como la concentración de carbohidratos totales por el método del fenol-sulfúrico. La concentración de proteínas determinada por ambos métodos fue idéntica (2.6 mg/ml), lo que descarta que este extracto sea bajo en proteínas con tirosina o triptófano. La concentración de carbohidratos fue de 280 µg por ml por el método de Dubois.

c) Análisis del extracto sonificado de *N. brasiliensis* en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).- En el gel de poliacrilamida al 12 % de T, las bandas del extracto crudo estaban uniformemente distribuidas a todo lo largo, pero las proteínas de peso molecular bajo (menores de 14 kDa) migraron con el

frente de iones (Azul de bromofenol), por lo que quizá los polipéptidos pequeños se eluyeron del gel y no fueron detectados. Al 8 % de T la migración fue demasiado rápida y las bandas resultaron en el tercio inferior del gel (datos no mostrados). Para separar las proteínas tanto de alto como de bajo peso molecular, se utilizó un gel en gradiente de 18 a 8.75 % en el cual observamos una distribución uniforme de las bandas teñidas con Azul de Coomassie. Con la tinción de nitrato de plata pudimos observar el antígeno citoplásmico a una concentración de 31.25  $\mu\text{g}$  por cm en geles de 0.75 mm de grosor y 10 cm de largo, como se muestra en la Figura No 1. Con esta tinción encontramos aproximadamente 35-40 bandas del antígeno crudo, principalmente entre los marcadores de 66 y 20 kDa. Arriba del marcador de 66 kDa se observaron aproximadamente 8 bandas.

Cuando el antígeno se tiñó con Azul de Coomassie se necesitaron alrededor de 200  $\mu\text{g}$  de proteína, esto es, 7 veces más la cantidad de antígeno para alcanzar la sensibilidad del nitrato de plata. Con Azul de Coomassie se observaron 2 bandas fuertemente representadas en la zona correspondiente a 24 kDa (figura no 2) las cuales no fueron reveladas con nitrato de plata.

## II. ANALISIS POR ELECTROTRANSFERENCIA.

**a) Determinación de los polipéptidos inmunogénicos del extracto sonificado.** - En los ensayos de inmunoelectrotransferencia (Western blot) se analizó el patrón de reconocimiento del extracto sonificado de N. brasiliensis por los sueros de pacientes con micetoma por N. brasiliensis, N. asteroides, tuberculosis pulmonar activa y pacientes con lepra. Los sueros se diluyeron 1:25 y el patrón de reconocimiento se comparó con el patrón presentado por sueros de sujetos normales sin antecedentes de ninguna de estas enfermedades.

Para conocer el peso molecular de las bandas reconocidas por los sueros de los pacientes, se determinó la migración (movilidad relativa, Rf) de los marcadores de peso molecular conocido en el papel teñido con Azul de Coomassie (ver tablas 1 y 2,) y se graficó contra el logaritmo de su peso molecular. Con estos datos se obtuvo una curva, en la cual se extrapolaron los Rf de las bandas reconocidas por los pacientes en la inmunoelectrotransferencia y se calculó su peso molecular.

Los sueros de los pacientes con micetoma por N. brasiliensis reconocieron con una frecuencia de más del 50 %, 6 bandas de peso molecular aproximado de 61, 49, 43, 42, 26 y 24 kDa (tabla no 3). Aunque estas bandas fueron las más frecuentemente reconocidas, - hubo otras de peso molecular aproximado de 56, 55, 47, 45, 28, 21



y 15 kDa, que también fueron identificadas aunque con menor frecuencia. Las bandas de 61, 26 y 24 kDa eran muy fuertemente reveladas por la mayoría de los sueros (figura no 3) de los pacientes con micetoma por N. brasiliensis.

Además de los sueros de pacientes con micetoma por N. brasiliensis, analizamos tres sueros de pacientes con micetoma por N. asteroides (figura no 3). Los tres sueros identificaron las bandas de 61, 49, 47, 43, y 26 kDa, y dos de éstos reconocieron la banda de 24 kDa. El patrón de reconocimiento de los sueros de pacientes con micetoma, tanto por N. brasiliensis como por N. asteroides era indistinguible entre ellos. No se realizaron ensayos con sueros de pacientes con nocardiosis pulmonar.

Los sueros de sujetos aparentemente sanos reconocieron muy frecuentemente la banda de 42 kDa, así como la de 49 y 43 kDa (figura no 4). La banda de 61 kDa fue débilmente identificada por 4 de estos sueros (Tabla no 3).

**b) Determinación de los isotipos de las inmunoglobulinas, de los pacientes con micetoma por N brasiliensis, que reconocen las proteínas del extracto sonicado.** - Para determinar el isotipo de las inmunoglobulinas implicadas en la prueba de inmunoelectrotransferencia, se analizaron 5 sueros de pacientes con micetoma por N. brasiliensis en ensayos de Western blot, en los que se utilizaron anticuerpos anti-isotipos de inmunoglobulinas conju-

gados con peroxidasa, como segundo anticuerpo.

El patrón de reconocimiento mostrado con conjugado anti-inmunoglobulinas totales era igual al observado con el conjugado anti-IgG (Figura No 5), pero con anti-IgM, sólo en un caso se observó la identificación de las bandas de 60, 28, 26, y 24 kDa. Este mismo suero presentó anticuerpos de tipo IgA contra las bandas de 61, 60, 26 y 24 kDa. Los demás sueros no desarrollaron - bandas apreciables en las tiras incubadas con conjugados anti-IgA o IgM.

**c) Análisis por inmunoelectrotransferencia del extracto sonificado de *N. brasiliensis* con sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y lepra.**- Los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TPA), reconocieron varias bandas del extracto sonificado (Ver tabla No 4). La banda de 42 kDa fue identificada por casi todos los sueros (17/13) y generalmente fue - revelada fuertemente (Figura No 6). La banda de 49 kDa fue igualmente reconocida por los sueros (17/13). Menos comunmente, fueron identificadas las bandas de 56, 55, 45 y 43 kDa, junto con algunas otras bandas que fueron esporádicamente reconocidas. Las bandas de 26 y 24 kDa fueron identificadas por 4 sueros de - pacientes con TPA, aunque fueron reveladas con menor intensidad que en el caso de los sueros de pacientes con micetoma.

Los sueros de pacientes con enfermedad de Hansen, la mayoría

de ellos con lepra de tipo lepromatoso, reconocieron, en forma - similar a los pacientes con TPA, las bandas de 56, 55, 49, 45, y 42 kDa principalmente (Ver tabla No 4). De estos sueros, 2 de - ellos reaccionaron en forma leve pero evidente, con la banda de 61 kDa. El doblete 26-24 kDa fue reconocido por 3 de los sueros, aunque en una forma débil.

En general la reactividad de los sueros tanto de pacientes con TPA como de pacientes con enfermedad de Hansen, se centró en el reconocimiento de las bandas con un peso molecular aproximado entre 40 y 50 kDa.

**d) Adsorción de las bandas de reacción cruzada, con Mycobacterium tuberculosis H37Ra.** - Para demostrar que las bandas de 49, 45, 43 y 42 kDa son proteínas que se presentan también en - Mycobacterium, se realizó un experimento de adsorción de un suero de conejo, anti-antígeno de N. brasiliensis precipitado con solución saturada de sulfato de amonio al 50 %, con células de - M. tuberculosis H37Ra desengrasadas y trituradas.

En la Figura No 7 se observa que el suero probado en inmuno-electrotransferencia, después de ser adsorbido con las micobacterias, ya no reacciona con las bandas de 49, 45 y 43 kDa, aunque se observa la presencia de anticuerpos contra las bandas de 61, 42, 26 y 24 kDa.

### III. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE 61, 26 Y 24 kDa DE N. brasiliensis.

a) Filtración en gel del antígeno crudo de N. brasiliensis en Sephadex G-100. Al graficar la absorbancia de las alícuotas con respecto a su volumen de elución (figura 20), se observó un pico de peso molecular alto (P1), un pico con su máxima absorbancia cercana al marcador de 29 kDa (anhidrasa carbónica), y posteriormente, un pico de absorción muy alta de peso molecular bajo (P3). Se seleccionaron varias alícuotas de los picos de absorción y se analizaron por SDS-PAGE en gradiente. La proteína de 61 kDa fue eluída en las primeras alícuotas del pico 1 junto con muchas bandas contaminantes. En las alícuotas del pico 1, con un mayor  $V_e$ , se observaron proteínas de peso molecular progresivamente más bajo. El hallazgo más importante fue que al analizar el pico 2 con SDS-PAGE, observamos que estaba compuesto casi exclusivamente por una banda de peso molecular aproximado de 24 kDa (figura no 8). Al analizar el pico 3 por SDS-PAGE no se detectó ninguna banda a pesar de su alta absorbancia. Cabe mencionar que el color amarillo del antígeno fue eluído en el pico 3. Las demás fracciones (P1 y P2) quedaron incoloras.

Ya que en una de las alícuotas del pico 2 se observó una banda que por su  $R_f$  aparentemente correspondía a la proteína de 24 kDa, decidimos confirmar su identidad mediante un ensayo de Western blot. Para ello transferimos una fracción de este eluído

y revelamos con suero de conejo anti-extracto total. En la Figura No 9 observamos que el suero de conejo anti-extracto total, reacciona con muchas de las bandas del extracto crudo; en cambio, en el carril del eluido del Sephadex G-100 observamos la banda de 24 kDa, junto con una proteína de un peso molecular aproximado de 18 a 20 kDa.

**b) Fraccionamiento del antígeno crudo con solución saturada de sulfato de amonio.**- El extracto crudo fue precipitado en escala analítica a concentraciones finales de sulfato de amonio de 20, 50, 70 y 80 por ciento. Los precipitados, así como los sobrenadantes de cada ensayo, se dializaron exhaustivamente con solución salina boratos. Después de dializar, los precipitados se analizaron por SDS-PAGE en gradiente.

Al teñir el gel con nitrato de plata, encontramos que en el precipitado al 20 % no había ninguna banda observable; en cambio, el sobrenadante era rico en bandas y estaba constituido prácticamente por la totalidad del antígeno. En el precipitado al 50% se observaron algunas bandas, aunque muchas de ellas quedaron en el sobrenadante. En la precipitación al 70 y 80 % con sulfato de amonio, observamos que aumentó la cantidad de bandas en los precipitados y disminuyó en los sobrenadantes.

En otro ensayo, los precipitados fueron analizados en SDS-PAGE en gradiente de 18 a 8.75 %, electrotransferidos y revelados

con suero de conejo anti-extracto total de N. brasiliensis (figura No 10). En el precipitado al 20 % observamos, casi exclusivamente, las proteínas de 61, 26 y 24 kDa. A la concentración de 50% de sulfato de amonio, observamos las bandas de 61, 26 y 24 kDa junto con algunas otras bandas que se encontraban en menor cantidad. A las concentraciones de 70 y 80% de la sal, observamos la precipitación de múltiples bandas del antígeno crudo. Puesto que al 50 % precipitaban las bandas de 61, 26 y 24 kDa junto con escasas bandas contaminantes, decidimos utilizar esta concentración para llevarla a cabo en escala preparativa.

Al precipitar mayor cantidad de antígeno crudo al 50% (alrededor de 40 mg), se observó, mediante análisis en SDS-PAGE, la presencia de las bandas de un peso molecular relativo de 61, 26 y 24 kDa junto con varias bandas contaminantes (Figura No 8). Sin embargo lo más notorio de este ensayo fue la precipitación masiva de la banda de peso molecular aproximado de 61 kDa la cual se encontraba, muy escasamente representada en el antígeno crudo.

Para corroborar que las bandas precipitadas fueran las identificadas por los sueros de los pacientes, realizamos un ensayo de electrotransferencia del antígeno crudo, así como del precipitado al 50 %, que fue revelada con un suero de paciente con micetoma por N. brasiliensis. En la Figura No 11, se observa que en el carril del antígeno crudo fueron reconocidas las bandas de 61, 60, 49, 47, 45, 43, 42, 26, 24 kDa y otra banda de peso molecular

más bajo. En el carril en el que colocamos el antígeno precipitado al 50 % (1.31  $\mu$ g de proteína), se observó prominentemente la banda de 61 kDa, algunas bandas de peso molecular alrededor de 50 kDa y las bandas de 26 y 24 kDa. A menor concentración del precipitado (0.26  $\mu$ g), se observó exclusivamente la banda de 61 kDa, que por su alta concentración en el precipitado fue fácilmente observada inclusive con 131 ng de proteína.

**c) Cromatografía de intercambio iónico.**— Después de aplicar la muestra de antígeno y eluir con el gradiente de NaCl de 0.0 a 0.3 M, se tomaron varias alícuotas de los eluidos de la columna de DEAE-celulosa y se analizaron en SDS-PAGE. Se observó que en este rango se eluyeron las proteínas de peso molecular medio, así com las proteínas de 26 y 24 kDa. No hubo separación neta de ninguna de ellas; sin embargo, la banda de 61 kDa no se observó en ninguna de las fracciones eluidas a estas concentraciones de NaCl; por lo cual, se decidió utilizar concentraciones mayores de NaCl. La columna se eluyó con un gradiente de concentración de 0.3 a 0.6 M de NaCl, y algunas alícuotas, a diferentes volúmenes de elución, se analizaron en SDS-PAGE. La proteína de 61 kDa se observó en las primeras fracciones de este gradiente junto con algunas bandas contaminantes (Figura No 12). La pureza de la banda dependió del grado de pureza del antígeno precipitado al 50% aplicado a la columna. En algunos ensayos se alcanzó una pureza de alrededor del 80 %, por lo que estos eluidos sirvieron para determinar la movilidad de esta proteína en un sistema sin

SDS, ya que constituía la banda más prominente, y por lo tanto, su posición era fácilmente identificable en el gel (figura no - 18).



#### IV. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE 61, 26 Y 24 kDa de N. brasiliensis.

A) Purificación de las bandas de 61, 26 y 24 kDa mediante electroforesis preparativa en SDS-PAGE.- Al analizar una muestra del antígeno crudo precipitado con sulfato de amonio al 50%, en un gel de poliacrilamida al 12%, con SDS, junto con las proteínas preteñidas (Bio Rad), observamos que la banda de 61 kDa migró inmediatamente antes de la albúmina de huevo preteñida (50 kDa) - (figura 13). La banda de 26 kDa tenía un Rf similar al de el - inhibidor de tripsina (27,000), y teóricamente la banda de 24 kDa migró un poco más que la banda de 26 kDa. Una vez localizada la migración de las proteínas en un gel analítico, se pasó a la etapa preparativa en geles de 3 mm de grosor con capacidad de 2 a 3 mg de antígeno precipitado al 50 %. Después de correr las muestras, se cortaron las fracciones del gel, que teóricamente contenían las bandas, y las proteínas se extrajeron mediante electroelución. Los electroeluidos obtenidos se analizaron en SDS-PAGE, y en los tres casos (P61, P26 y P24) se observó, mediante tinción de los geles con Azul de Coomassie (figura no 14 y no 15), nitrato de plata y por inmunoelectrotransferencia, la presencia de una sola banda.

b) Cromatografía de afinidad.- Los conejos inmunizados con las - proteínas puras desnaturalizadas de 26 y 24 kDa, no produjeron - anticuerpos demostrables con la técnica de inmunodifusión, por lo

cual no se utilizaron en los ensayos de cromatografía de afinidad.

Los conejos inmunizados con la proteína de 61 kDa, purificada por electroelución en condiciones desnaturalizantes, dieron títulos de anticuerpos, medidos por inmunodifusión, hasta 1:4 después de 3 inmunizaciones semanales posteriores a la primoinmunización. En Western blot, el suero anti-61 kDa reaccionó a una dilución igual o mayor a 1:5000; en cambio, el antisuero de conejo anti-extracto total con título de 1:32, medido por inmunodifusión, dió una reacción similar a una dilución de 1:500.

El inmunoadsorbente hecho con anticuerpos dirigidos contra la proteína de 61 kDa se incubó con el antígeno de N. brasiliensis y las proteínas adsortas se eluyeron con KSCN 3M. Este eluido se analizó mediante Western blot. En la figura no. 16 se muestra este análisis. En la tirilla No 1 que se incubó con suero de paciente con micetoma por N. brasiliensis, se observa la banda de 61 kDa, una banda de aproximadamente 24 kDa y una banda de gran intensidad debajo de la banda de 61 kDa. La tirilla incubada con el suero monoclonal Y4E2 (Tirilla No 2), que identifica únicamente la banda de 61 kDa, se observó única y exclusivamente esta banda.

**c) Purificación de la proteína de 24 kDa.**-El pico de peso molecular bajo (P2) obtenido por filtración en gel del antígeno crudo

en Sephadex G-100 estaba constituido prácticamente solo por la proteína de 24 kDa, aunque en Western blot apareció una banda contaminante de peso molecular menor (Figura No 8). Para purificar la proteína de 24 kDa, en estado nativo, a partir de esta fracción, utilizamos un sistema de electroelución en gel no desnaturalizante.

Las proteínas separadas en condiciones desnaturalizantes y no-desnaturalizantes tienen un Rf diferente en cada sistema. Para determinar la posición de la banda de 24 kDa, en condiciones nativas, se analizó una muestra del pico 2 del eluido de la columna de Sephadex G-100 en un gel analítico no desnaturalizante. Se tiñó con Azul de Coomassie, y se determinó el Rf de la proteína de 24 kDa. Una vez conocida la migración de P24, se realizaron ensayos en geles preparativos de los que se obtuvo P24 por electroelución. El eluido se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot, métodos en los que se observó la presencia de una sola banda (Figura no 17 y no 19), que corresponde a la proteína de 24 kDa que fue identificada por los sueros de los pacientes con micetoma por N. brasiliensis.

d) Purificación de la proteína de 61 kDa.— La posición de la banda de 61 kDa, en sistema no-desnaturalizante, se determinó mediante el análisis de un eluido de la columna de intercambio iónico, en un gel sin SDS al 12% (Figura no 18). Este antígeno, rico en proteína de 61 kDa, al teñirse con nitrato de plata desa-

rrollaba una banda fuertemente teñida de color naranja. Al electroeluir esta fracción del gel, se observó que esta banda correspondía a la movilidad de la proteína de 61 kDa. Posteriormente, se realizaron ensayos preparativos en geles de 3 mm de grosor, a los que se aplicaron de 1 a 1.5 mg de antígeno precipitado al 50%. A esta concentración de precipitado, se observó, en el gel en corrimiento, una banda de color amarillo, que posteriormente se comprobó que correspondía a la proteína de 61 kDa.

Después de electroeluir este fragmento de gel, se analizó por SDS-PAGE, y se tiñó con nitrato de plata. Se observó la banda de 61 kDa junto tres contaminantes de peso molecular más bajo. Para obtener un mayor grado de pureza de la proteína, se aplicó este eluido a un gel preparativo con SDS. El eluido obtenido de este segundo paso, se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot (revelado con suero de conejo anti-extracto sonificado de N. brasiliensis), y se demostró que el producto final de la purificación estaba constituido por una sola banda (Figura no 17 y no 19).

## D I S C U S I O N :

Nocardia brasiliensis es el microorganismo causante de la mayoría de los casos de micetoma en México (40). En los estudios inmunológicos sobre la relación huésped-parásito en Nocardia, se ha observado que la inmunidad de tipo celular es primordial para la resistencia a la infección (22, 25, 56, 57); en cambio los anticuerpos parecen no tener actividad protectora, e inclusive, pudieran empeorar la infección (48). Sin embargo, la respuesta inmune a este microorganismo no ha sido completamente dilucidada, en parte por la carencia de los antígenos puros que son inmunológicamente importantes.

Para seleccionar las proteínas del agente causal que son reconocidas por el sistema inmune, podríamos empezar por conocer cuales son los antígenos que inducen la respuesta inmune celular, ya que es la que correlaciona con resistencia. Sin embargo, esta información es difícil de obtenerse en forma directa. En algunos casos, otros autores han aislado en primera instancia las proteínas y luego han estudiado si tienen o no importancia inmunológica (14, 18, 33, 67). Pero esta es una forma muy indirecta y lenta para obtener esa información, ya que no se conoce previamente la inmunogenicidad de las proteínas en cuestión.

Otro criterio para seleccionar los antígenos del agente

causal que deben ser aislados, es su capacidad de inducir anticuerpos en pacientes infectados (17, 62, 69), lo que asegura su antigenicidad.

En esta tesis, para aislar las proteínas de N. brasiliensis, nosotros tomamos en cuenta este segundo criterio. El material inicial del cual partimos para aislar y purificar las proteínas, fue un extracto sonicado de bacterias desengrasadas y secas. Un extracto de N. brasiliensis fue obtenido de manera similar, y utilizado por Ortiz y cols. para realizar estudios de hipersensibilidad tardía en sujetos con micetoma, en los cuales observó una reacción positiva (46). Posteriormente este mismo autor, demostró la producción de anticuerpos contra el extracto de N. brasiliensis en modelos murinos (19, 48, 66). En base a estos resultados, consideramos que el extracto citoplásmico utilizado en estos experimentos contiene los antígenos que reaccionan con ambos efectores, células T sensibilizadas y anticuerpos. Sin embargo, los inmunogénos específicos que estimulan a dichos efectores de la inmunidad no se han determinado.

Consideramos que en el antígeno crudo utilizado se encuentran muchas proteínas de pared bacteriana, además de las citoplásmicas, ya que durante la sonicación, las paredes fueron rotas y el material citoplásmico se liberó al medio junto con muchas de las proteínas de pared celular. Para el análisis del antígeno crudo en gel de poliacrilamida, y dado que el extracto teórica-

mente estaba constituido por proteínas de muy diverso peso molecular, decidimos utilizar un gel en gradiente que cubriera tanto los rangos de peso molecular bajo, medio y alto (18 a 8.75 %). El extracto crudo estaba constituido de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas. Al teñir con la técnica de nitrato de plata, observamos alrededor de 35 a 40 bandas bien diferenciadas sobre un fondo oscuro, producido quizá por los lípidos restantes o fragmentos de ácidos ribo o desoxiribonucleicos, o bien a la mayor sensibilidad de la técnica. La tinción con nitrato de plata fue aproximadamente 10 veces más sensible que la técnica de Azul de Coomassie, por lo que optamos por utilizar la primera técnica.

Para conocer hacia cuales de estas bandas estaba dirigida la respuesta inmune humoral de los pacientes con micetoma por N. brasiliensis, transferimos las proteínas, separadas en el gel de poliacrilamida, a una matriz de papel de nitrocelulosa, combinando así la alta resolución del SDS-PAGE en gradiente y la gran sensibilidad del EIA (16, 59). Las muestras de suero, analizadas en los ensayos de Western blot, se extrajeron antes de que el paciente recibiera tratamiento anti-bacteriano, ya que el tratamiento podría modificar el patrón de reconocimiento debido a la liberación de antígenos a la circulación, o bien a la exposición de nuevos antígenos de los microorganismos destruidos. En nuestro caso, observamos que algunos sueros de pacientes que estaban curados clínicamente, carecían de anticuerpos anti-Nocardia.

Los sueros de los pacientes con micetoma por N. brasiliensis reconocieron más comunmente 7 bandas del antígeno crudo, las cuales son muy aparentes en el Western blot. Hubo además otras bandas reconocidas, sólo que con menor frecuencia e intensidad.

Los sueros de los sujetos aparentemente sanos (24%) reaccionaron más frecuentemente con la banda de 42 kDa, y en menor proporción con las bandas de 49, 45 y 43 kDa. De 25 sueros de personas sanas, cuatro de ellos reaccionaron débilmente con la banda de 61 kDa. Esta reacción cruzada es debida probablemente a la presencia de anticuerpos inducidos por actinomicetos que viven saprofiticamente en la tierra, a anticuerpos inducidos por la vacuna de BCG o bien, debido a la reactividad cruzada con antígenos de la flora bacteriana intestinal normal.

*Mycobacterium* y *Nocardia* son actinomicetos que poseen fuerte reactividad cruzada (49, 60, 66). En los ensayos de Western blot observamos que los sueros de pacientes con lepra lepromatosa y tuberculosis pulmonar activa, identificaron muy frecuentemente las bandas de 49, 45, 43, y 42 kDa. Los pacientes con lepra lepromatosa identificaron esporádicamente la banda de 61, 26 y 24 kDa, aunque en forma más débil que los pacientes con micetoma. - Cuatro de 17 sueros de pacientes con TPA identificaron las bandas de 26 y 24 kDa en forma débil. Estos datos sugieren que muy probablemente *Mycobacterium* posee determinantes antígenicos de reacción cruzada, principalmente, con las proteínas de 49, 45, 43, y



42 kDa de N. brasiliensis. Para corroborar esta reacción cruzada, se realizó un ensayo de absorción de un suero anti-extracto sonificado precipitado con sulfato de amonio al 50%, que presentaba reacción con varias bandas del antígeno sonificado; entre ellas las de 61, 49, 45, 43, 42, 26, y 24 kDa (figura 7). Este suero fue adsorto con células de M. tuberculosis H37Ra, desengrasadas y trituradas. En este ensayo observamos que el suero, una vez adsorto, no identificó las bandas de 49, 45, y 43 kDa, lo cual nos demuestra que tales determinantes de reacción cruzada se encuentran en las proteínas de las células de M. tuberculosis H37Ra.

En los ensayos de Western blot se utilizó como segundo anticuerpo, un conjugado anti-inmunoglobulinas humanas totales. Para conocer el isotipo de los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con micetoma, utilizamos, en otros ensayos, anti-inmunoglobulinas isotipo específicas (IgG, IgM, IgA). En estos experimentos observamos que la mayor parte de los anticuerpos era del isotipo IgG, lo cual correlaciona con una típica respuesta inmune secundaria.

Resulta interesante que la inmunogenicidad de las bandas de 61, 26 y 24 kDa también se observó en sueros de animales (conejos, ratas y ratones; datos no mostrados) inmunizados con bacterias completas o con el antígeno crudo, en los que se identificó, por Western blot, la presencia de anticuerpos primordialmente

contra estas tres bandas. Estas proteínas fueron rara vez identificadas por los sueros normales, por lo que de las 35-40 bandas teñidas con nitrato de plata, seleccionamos las de 61, 26 y 24 kDa para ser aisladas y purificadas.

Para aislar las proteínas a partir de un extracto crudo, tradicionalmente se han utilizado varios métodos de fraccionamiento, entre ellos : filtración en gel, precipitación con solventes orgánicos, cromatografía de intercambio iónico, etc. Para purificar la proteína inmunodominante de 24 kDa en forma nativa, nosotros utilizamos, en primera instancia, la filtración en gel en Sephadex; técnica con la cual separamos el antígeno crudo en fracciones de diferente peso molecular. Al graficar la lectura a 280 nm de las alícuotas, observamos dos picos de absorbancia, uno grande cerca del volumen vacío de la columna, y otro más pequeño cerca del marcador de 12 kDa (citocromo c). El pico de peso molecular alto estaba constituido de casi todas las bandas del antígeno crudo; en cambio, el pico 2 estaba constituido casi exclusivamente por la banda de 24 kDa. Anteriormente Gupta y col., en 1985, describieron la separación de un extracto crudo de N. asteroides, por filtración en gel, en dos picos (31). De manera similar a nuestros resultados, la composición de bandas del pico de peso molecular alto era compleja; en cambio, el pico de peso molecular bajo estaba constituido por escasas bandas. Posteriormente, estos autores realizaron estudios de protección en animales (32), con las fracciones del antígeno crudo separadas

por filtración en gel, y encontraron que solamente el primer pico inducía resistencia en los animales. Sin embargo no caracterizaron ni purificaron los antígenos inmunodominantes de estos extractos semipurificados.

El pico 2 obtenido por filtración en gel del extracto sonificado de N. brasiliensis estaba constituido casi totalmente por la banda de 24 kDa. Para purificar dicha proteína a partir de esta fracción, se utilizó la técnica de electroelución a partir de un gel preparativo en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Con este método se logró obtener la banda de 24 kDa purificada como una sola banda, demostrada por dos métodos muy sensibles como los son : la tinción con nitrato de plata y el Western blot. En el producto final de purificación, podría haber pequeñas cantidades de otras proteínas, que por sus características fisicoquímicas similares a las de la proteína de 24 kDa, pudieron haberse obtenido también en el proceso de purificación. Sin embargo, dada la sensibilidad del Western blot, dichas impurezas, si existen, se encuentran por debajo de 50 pg, que es el límite aproximado de la sensibilidad del método. Por lo tanto consideramos tener un alto nivel de pureza de la proteína purificada de 24 kDa.

Para purificar las proteínas inmunodominantes de 61, y 26 kDa, se utilizó la precipitación del antígeno crudo con solución saturada de sulfato de amonio al 50% de saturación. En esta técnica, las proteínas precipitan gradualmente dependiendo de su -

número de cargas o de sus regiones hidrofóbicas, conforme se varía la cantidad de sulfato de amonio en la solución (53). Mediante este método obtuvimos un antígeno muy abundante en la banda de 61 kDa junto con las bandas de 26 y 24 kDa, así como algunas bandas contaminantes. Este precipitado constituyó una fuente excelente para purificar la banda de 61, 26 y 24 kDa mediante electroelución en SDS-PAGE. El método de electroelución de geles con SDS resultó excelente aunque muchos electroeluidos no daban la pureza del 100%, y por lo tanto no se podían utilizar, ya que existían otras bandas contaminantes. Sin embargo, se obtuvieron cantidades suficientes para inmunizar conejos y obtener antisueños que fueron utilizados en los ensayos de cromatografía de afinidad.

Contra las bandas de 24 o 26 kDa, no se lograron obtener anticuerpos; esto podría deberse a que los conejos inmunizados fueran no respondedores, a que se utilizaran concentraciones insuficientes de proteína pura para inducir una respuesta adecuada de anticuerpos, o bien a que P26 y P24 sean poco inmunogénicas en forma aislada. Es además importante considerar que no se utilizó adyuvante completo de Freund, en ninguna de las inmunizaciones, el cual es un mayor potenciador de la respuesta inmune que el adyuvante incompleto que fue utilizado por nosotros en los protocolos de inmunización. Por otra parte, P61 en condiciones similares de inmunización, indujo una fuerte respuesta humoral, por lo que quizá la baja inducción de anticuerpos por P26 y P24 es debida a

otras causas, que no pudieron ser estudiadas en este trabajo.

Anteriormente Gupta y col. (31) describieron el aislamiento, mediante filtración en gel, de una fracción de peso molecular - bajo, de N. asteroides que denominaron F2. Aunque F2 formaba 2 líneas de precipitación con un antisuero contra el extracto total de N. asteroides, esta era incapaz de inducir una respuesta inmune humoral o celular al inmunizar un grupo de ratones (31). En - forma similar, P26 y P24 son fuertes inductores de anticuerpos en varias especies (ratas, ratones [datos no mostrados], conejos, y en pacientes infectados) cuando son aplicados en forma cruda, pero cuando se inmunizaron en forma pura no se obtuvo una respuesta de anticuerpos. Dado este comportamiento inmunológico similar, - aunado a un peso molecular semejante, P26 y P24 de N. brasiliensis podrían ser moléculas similares a las descritas por Gupta, ya que inclusive fueron identificados, en el ensayo de Western blot, por sueros de pacientes con micetoma por N. asteroides. Estos hallazgos necesitan otros estudios para esclarecer esta relación.

El ensayo de cromatografía de afinidad resultó muy poco productivo, en términos de rendimiento, ya que obtuvimos escasa cantidad de la banda de 61 kDa, junto con una proteína de 45 a 50 - kDa, que se encontraba en mayor cantidad. Dada la escasa cantidad de P61 recuperada, optamos por otra técnica de purificación, la cromatografía de intercambio iónico; para ello utilizamos una - resina cargada positivamente, la DEAE-celulosa, en forma micro-

granular, que teóricamente da una mayor resolución que la resina fibrosa. Tanto la resina, como las proteínas a separar, se equilibraron, previamente al ensayo, en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.01 M, pH 8.00. A este pH los grupos amino de la resina se cargan positivamente, y las proteínas se adsorberán o no dependiendo de las cargas de superficie totales de la misma. Para la elución de las proteínas adsortas utilizamos un gradiente de concentración de NaCl. Dado que el rango de elución en la mayoría de las proteínas es de 0.0 a 0.5 M, y ya que P61 se eluyó en el gradiente de mayor concentración (de 0.3 a 0.6M), consideramos que esta proteína tiene abundantes cargas negativas, lo cual se podría constatar en un futuro mediante la determinación de los residuos de aminoácidos de que esta compuesta.

En general la metodología de cromatografía en columna implica la dilución, así como la diálisis y concentración de la muestra, y por lo tanto, varios pasos de congelación, manipulación y descongelación. Ya que la técnica de intercambio iónico implica estos pasos, además de no haberse aislado la banda de 61 kDa en forma pura, decidimos purificarla mediante electroelución en geles no desnaturizantes. Este método tiene la gran resolución de la electroforesis en poliacrilamida, junto con la gran capacidad de los geles preparativos. Por otra parte, las técnicas de electroelución en sistemas no desnaturizantes tienen la ventaja de conservar las estructuras proteicas, así como un alto porcentaje de recuperación de la proteína a purificar.

La proteína de 61 kDa tiene, en un sistema desnaturizante, un determinado Rf que probablemente cambie en un sistema no desnaturizante, en el que la migración depende tanto del peso molecular como de la carga iónica, y no exclusivamente del peso molecular como en el primer caso (34). El antígeno crudo poseía una cantidad relativamente baja de la proteína de 61 kDa, de tal manera que al teñir el gel sin SDS no sabíamos exactamente a cual de las bandas correspondía. Para determinar la posición de la proteína de 61 kDa, corrimos una muestra de antígeno crudo, junto con otra muestra del eluido de la columna de DEAE-celulosa, en un gel de poliacrilamida al 12%, sin SDS (figura 18). La última muestra tenía una gran proporción de banda de 61 kDa, por lo que la banda mayormente representada en el gel teóricamente correspondería a P61. Después de teñir un fragmento del gel sin SDS, cortamos y electroeluimos los fragmentos del gel que se teñían más fuertemente y de color naranja (que era característico de P61), para posteriormente analizarlos en SDS-PAGE al 12%, y corroborar así que dicha banda correspondía a la proteína de 61 kDa.

Como mencionamos anteriormente, una de las desventajas de este sistema es que al cortar el fragmento del gel que contiene la proteína de nuestro interés, puede haber bandas cerca, las cuales aparecen en el eluido final. Por lo tanto, la pureza del eluido depende mucho de la abundancia de la proteína de nuestro interés en el antígeno inicial. Para obtener un precipitado con

mayor proporción de P61, en lugar de sonicar la bacteria desengrasada, con lo cual se extraen muchas proteínas, utilizamos la maceración de las bacterias secas y desengrasadas. A partir de este extracto, que característicamente tenía una proporción más alta de las bandas de 61 y 24 kDa, se obtuvo la proteína de 61 kDa en forma semiaislada, por precipitación con sulfato de amonio al 50%, y en seguida se purificó por electroelución en condiciones no desnaturizantes.

El antígeno crudo original presentaba un color amarillo, que con la diálisis disminuía levemente. Posteriormente, en los ensayos de filtración en gel, dicho color amarillo fué eluido en los componentes de bajo peso molecular (<10 kDa), y el antígeno restante quedó completamente incoloro. Por otra parte, al precipitar el antígeno crudo con sulfato de amonio a una saturación del 50%, el precipitado era de color amarillo ocre y el sobrenadante quedó de color amarillo. Este último parece corresponder al compuesto amarillo de peso molecular bajo observado en la filtración en gel, que probablemente sea diferente al compuesto cromógeno del precipitado. Al correr un gel preparativo sin SDS, con 1 a 1.5 mg de ppt 50%, se observó una proteína, con movilidad semejante a la de 61 kDa, que presentaba dicho color. Al electroeluir y analizar con SDS-PAGE al 12%, corroboramos que tal compuesto cromógeno en realidad era la proteína de 61 kDa. Este color amarillo quizá es debido a que la proteína posee un grupo prostético, el cual se pierde en condiciones desnaturizantes y reductoras, y que pro-



bablemente esté relacionado con la función de la proteína en la bacteria.

La tinción con Azul de Coomassie R-250 tiene una sensibilidad de aproximadamente 1 µg. El nitrato de plata aumenta esta sensibilidad hasta nanogramos y el Western blot hasta el nivel de picogramos. Las proteínas purificadas de 61 y 24 kDa se analizaron secuencialmente por estos métodos, y en todos ellos se observó la presencia de una sola banda, por lo que consideramos que mediante esta metodología es posible obtenerlas con un alto nivel de pureza. El rendimiento de purificación de las proteínas fue el siguiente: de aproximadamente 100 mg de extracto crudo se obtuvieron 0.4 mg de proteína pura de 61 kDa y 0.125 mg de proteína pura de 24 kDa.

En resumen, en el presente trabajo se identificaron las proteínas contra las cuales se desarrolla una respuesta de anticuerpos, y se seleccionaron aquellas que mostraron menor reacción cruzada con sueros de pacientes sanos, así como con sueros de pacientes con enfermedades producidas por otras bacterias (antigénicamente relacionadas con *Nocardia*) como son *M. tuberculosis*, y *M. leprae*. Dado que P61, P26 y P24 estimulan la producción de anticuerpos en pacientes infectados, esto podría dar lugar a que en el futuro se desarrollara una prueba serológica para el diagnóstico rápido del actinomicetoma. El hecho de que estas tres proteínas fueran identificadas también por sueros de pacientes con mi-

cetoma por N. asteroides, imposibilita el diagnóstico especie - específico, pero al mismo tiempo podría ser útil en el diagnóstico de la Nocardiosis pulmonar producida por N. asteroides; la - cual es un cuadro clínico cuyo diagnóstico diferencial es difícil, ya que es muy similar a la tuberculosis pulmonar, y el diagnóstico por cultivo es lento.

Durante el desarrollo del proyecto, se observó que las proteínas (P61; P26 y P24) eran fácilmente extraíbles con un proceso leve de maceración, en lugar del rompimiento de las células con ultrasonido, lo cual teóricamente daba como resultado la extracción de menor cantidad de proteína citoplásmica. En el análisis por SDS-PAGE del extracto obtenido por maceración, se observó - que la cantidad de P61, P26 y P24 aumentó en proporción relativa con respecto las demás proteínas. Esto quizá es debido a que - estas tres proteínas están más superficialmente expuestas en las células, probablemente en la pared celular, y por lo tanto son más fácilmente extraíbles. Su localización no fue estudiada, por lo que será importante determinarla, posiblemente, mediante el - uso de cortes de células de Nocardia, incubadas con anticuerpos contra estas proteínas, marcados con ferritina u otro material electrodensito. Mediante la observación, por microscopía electrónica, del sitio de unión de los anticuerpos en la célula, podremos determinar el sitio en que se encuentran situadas dichas proteínas.

Aunque P61, P26 y P24 fueron seleccionadas en base a su capacidad para estimular la producción de anticuerpos en pacientes infectados, desconocemos si de la misma forma estimulan la producción de células sensibilizadas (hipersensibilidad tardía). Como se mencionó anteriormente en la introducción, es la respuesta inmune celular la que correlaciona con un estado de inmunidad, por lo que será importante determinar la capacidad de las proteínas purificadas para estimular dicha respuesta, lo que nos permitirá conocer más sobre los mecanismos inmunológicos de defensa involucrados en el micetoma por N. brasiliensis.

**C O N C L U S I O N E S :**

En conclusión, el presente trabajo aportó el siguiente conocimiento sobre el tema :

- 1) Identificamos 3 antígenos inmunodominantes de N. brasiliensis, de un peso molecular aproximado de 61, 26 y 24 kDa.
- 2) Los sueros de pacientes con lepra y tuberculosis pulmonar — activa, mostraron reacción cruzada con las bandas de 49, 45, 43, y 42 kDa del extracto de N. brasiliensis. Algunos de ellos reconocieron débilmente las bandas de 61, 26 y 24.
- 3) Se desarrolló una estrategia para aislar y purificar las proteínas de 61, 26 y 24 kDa en forma desnaturalizada.
- 4) Se purificaron las proteínas de 61 y 24 kDa en forma nativa.
- 5) Las proteínas purificadas de 61, 26 y 24 kDa son herramientas muy valiosas para el estudio de la relación huésped-parásito en la infección por N. brasiliensis.

## B I B L I O G R A F I A.

- 1 Andrews, A.T. 1986. Electrophoretic concentration . Electrophoresis, theory techniques, and biochemical and clinical applications. Oxford Science publications.
- 2 Angeles, A.M., and A.M. Sugar. 1987. Rapid diagnosis of nocardiosis with enzyme immunoassay. J. infect. Dis. 155:292-296.
- 3 Angeles, A.M. and A.M. Sugar. 1987. Identification of a common protein in culture filtrates of three Nocardia species and use in etiologic diagnosis of mycetoma. J. Clin. Microbiol. 25:2278-2280.
- 4 Beaman, B.L. and S. Maslan. 1977. Effect of cyclophosphamide on experimental Nocardia asteroides infection in mice. Infect. Immun. 16:995-1004.
- 5 Beaman, B.L., and S. Maslan. 1978. Virulence of Nocardia during its growth cycle. Infect. Immun. 20:290-295.
- 6 Beaman, B.L., M.E. Gershwin, and S. Maslan. 1978. Infectious agents in immunodeficient murine models: pathogenicity of Nocardia asteroides in congenitally athymic (nude) and hereditarily asplenic (Dh/+) mice. Infect. Immun. 20:381-387.
- 7 Beaman, B.L., E. Goldstein, M.E. Gershwin, S. Maslan, and W. Lippert. 1978. Lung response of congenitally athymic (nude), heterozygous, and Swiss Webster mice to aerogenic and intranasal infection by Nocardia asteroides. Infect. Immun. 22:867-877.
- 8 Beaman, B.L., S. Maslan, S. Scates, and J. Rosen. 1980. Effect of route of inoculation on host resistance to Nocardia. Infect. Immun. 28:185-189.
- 9 Beaman, B.L., M.E. Gershwin, A. Ahmed, S.M. Scates and R.L. Deem. 1982. Responses of CBA/N X DBA2/F1 mice to Nocardia asteroides. Infect. Immun. 35:111-116.
- 10 Bio-Rad The Bio-Rad silver stain. 1986. Bulletin 1089. Bio Rad Laboratories, Richmond, Calif.
11. Black, C.M., B.L. Beaman, R.M. Donovan, and E. Goldstein. 1985. Intracellular acid phosphatase content and the ability of different macrophage populations to kill Nocardia asteroides. Infect. Immun. 47:375-383.
- 12 Bojalil, L.F. and A. Zamora. 1963. Precipitin and skin tests in the diagnosis of mycetoma due to Nocardia brasiliensis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113:40-43.

- 13 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.
- 14 Bruyn De, J., K. Huygen, R. Bosmans, M. Fauville, R. Lippens, J.P. Van Vooren, P. Falmagne, M. Weckx, H.G. Wiker, M. Harboe and M. Turner. 1987. Purification, characterization and identification of a 32 kDa protein antigen of Mycobacterium bovis - BCG. *Microbial. Pathogenesis.* 2:351-366.
- 15 Buchanan, R.E., and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 8<sup>th</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 1974. p. 559.
- 16 Burnette, W.N. 1981. "Western blotting" : electrophoretic - transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection - with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- 17 Calhoun, D.L., E.O. Osir, K.O. Dugger, J.N. Galgiani and J.H. Law 1986. Humoral antibody responses to specific antigens of Coccidioides immitis. *J. Infect. Dis.* 154:265-272
- 18 Clark-Curtiss, J.E., W.R. Jacobs, M.A. Doherty, L.R. Ritchie and R. Curtiss III. 1985. Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of Mycobacterium leprae. *J. Bacteriol.* 161:1093-1102.
- 19 Conde, C., R. Mancilla, M. Fresan, and L. Ortiz-Ortiz. 1983. - Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with Nocardia brasiliensis. *Infect. Immun.* 40:1218-1222.
- 20 Davis-Scibienski, C. and B.L. Beaman. 1980. The interaction of Nocardia asteroides with rabbit alveolar macrophages: the association of virulence, viability, ultrastructural damage and phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 28:610-619.
- 21 Davis-Scibienski, C., and B.L. Beaman. 1980. Infection of alveolar macrophages with Nocardia asteroides: immunological enhancement of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion, and microbicidal activity. *Infect. Immun.* 30:578-587.
- 22 Deem, R.L., B.L. Beaman, and M.E. Gershwin. 1982. Adoptive - transfer of immunity to Nocardia asteroides in nude mice. - *Infect. Immun.* 38:914-920.
- 23 Dubois, M., Gilles, K.A. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. - 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.

- 24 El-Zaatari, F.A., E. Reiss, A.M. Yakrus, S.L. Bragg, and L. - Kaufman. 1986. Monoclonal antibodies against isoelectrically focused Nocardia asteroides proteins characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Method. Diagn. Immunol.* 4:97-106.
- 25 Filice, G.A., B.L. Beaman, and J.S. Remington 1980. Effects of activated macrophages on Nocardia asteroides. *Infect Immun.* - 27:643-649
- 26 Filice, C.A., B.L. Beaman, J.A. Krick and J.S. Remington. 1980. Effects of human neutrophils and monocytes on Nocardia asteroides. failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J. Infect. Dis.* 142:432-438.
- 27 Garvey, J.S., N.E. Cremer, and D.H. Sussdorf. 1977. Gel diffusion. *Methods in Immunology. A laboratory text for instruction and research.* 3th. ed. W.A. Benjamin, Inc. p. 313.
- 28 George, L.K., L. Ajello, K. Mc Durmont and T. Hosty. 1961. The identification of Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis. *Am. Rev Resp. Dis.* 84:337-347.
- 29 Gonzalez-Ochoa, A. 1962. Mycetoma by Nocardia brasiliensis - isolation of the agent from the soils. *Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. (Mexico).* 22:15-54.
- 30 Gonzalez-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.
- 31 Gupta, V., V. Pancholi, V.K. Vinayak and G.K. Khuller. 1985. Immunological responses to protein, carbohydrate and lipid fractions of Nocardia asteroides in mice. *J. Med. Microbiol.* 20:263-274.
- 32 Gupta, R., V. Pancholi, V.K. Vinayak, and G.K. Khuller. 1985. Protective immunity to systemic nocardiosis in mice immunized with cell extract antigens of Nocardia asteroides. *Med. Microbiol. Immunol.* 174:157-166.
- 33 Jimenez, T., A.M. Díaz and H. Zlotnik. 1990. Monoclonal antibodies to Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis antigens. *J. Clin. Microbiol.* 28:87-91.
- 34 Johnstone, A. and R. Thorpe. 1985. Polyacrylamide gel techniques. *Immunochemistry in Practice.* Blackwell Scientific Publications. Chapter 7, p.141.
- 35 Krick, J. and J.S. Remington. 1975. Resistance to infection - with Nocardia asteroides. *J. Infect. Dis.* 131:665-672.

- 36 Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature. 227:680-685.
- 37 Lechevalier, M.P., A.C. Horan and H.A. Lechevalier. 1971. Lipid composition in the classification of Nocardiae and Mycobacteria. J. Bact. 105:313-318.
- 38 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.
- 39 Mahgoub, E.S. and I.G. Murray. 1973. Mycetoma. Heinemann, London.
- 40 Mariat, F., P. Destombes and G. Secretain. 1977. The mycetomas: Clinical features, pathology, ethiology and epidemiology. — Contrib. Microb. Immunol. 4:1-39.
- 41 Mariat, F. 1963. Sur la distribution géographique et la répartition des agents des mycetomes. Bull. Soc. Pathol. Exot. 56: 35-45.
- 42 Melendro, E.I., M.F. Contreras, C. Ximenez, A.M Garcia and L - Ortiz-Ortiz. 1978. Changes in host resistance caused by Nocardia brasiliensis in mice: cross protection against Listeria monocytogenes. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 57:74-81.
- 43 Merril, C.R., M.L. Dunau, and D. Goldman. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 110:201-207.
- 44 Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedman, and M.M. Ebert. 1981. — Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science. — 211:1437-1438.
- 45 Ortiz-Ortiz, L., M.F. Contreras and L.F. Bojalil. 1972. Cytoplasmic antigens from Nocardia eliciting a specific delayed — hypersensitivity. Infect. Immun. 5:879-882.
- 46 Ortiz-Ortiz, L., and L.F. Bojalil. 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of Nocardia organisms as a means of diagnostic and epidemiological study of Nocardia infection. Clin. Exp. Immunol. 12:225-229.
- 47 Pharmacia, Fine Chemicals. 1983. Affinity chromatography. Principles and methods. Uppsala, Sweden.
- 48 Rico G., R. Ochoa, A. Oliva, A. Gonzalez-Mendoza, S.M. Walker, and L. Ortiz-Ortiz. 1982. Enhanced resistance to Nocardia brasiliensis infection in mice depleted of antigen specific — B-cells. J. Immunol. 129:1688-1693.



49. Ridell, M. 1977. Studies on Corynebacterial precipitinogens common to Mycobacterium, Nocardiae and Rhodochrous. Int. Archs. Allergy. appl. Immun. 55:468-475.
- 50 Rippon, J.W. 1982. Mycetoma. Medical mycology : the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. The W.B. saunders Co. - Philadelphia. Chapter 5, p. 79-114.
- 51 Roitt, I. 1988. Immunity to infection. Essential immunology. - Blackwell Scientific Publications. 6th. Ed. Chapter 10, p.154.
- 52 Salinas, M.C., Pérez, L.I., González, Y., y Vera L.1989. Anticuerpos monoclonales contra antígenos de Nocardia brasiliensis. VII Congreso Nacional de Inmunología. San Luis Potosí, México.
- 53 Scopes, R.K 1984. Protein purification, principles and practice. Springer Verlag, New York.
- 54 Simpson, G.L., E.B. Stinson, M.J. Egger, and J.S. Remington. - 1981. Nocardial infections in the immunocompromised host : a detailed study in a defined population. Rev. Infect. Dis. 3: - 492-507.
- 55 Sugar, A.M., G.K. Schoolnik, 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.
- 56 Sundaraj, T., and S.C. Agarwal. 1977. Cell-mediated immunity - in experimental Nocardia asteroides infection. Infect. Immun. 15:370-375.
- 57 Sundaraj, T. and S.C. Agarwal. 1978. Relationship of macrophages to cell-mediated immunity in experimental Nocardia asteroides infection. Infect. Immun. 20:685-691.
- 58 Sykes, G. and F.A. Skinner. 1973. Actinomycetales: characteristics and practical importance. Academic Press. London. New York.
- 59 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. USA 76:4350-4354.
- 60 Tsukamura, M. 1970. Relationship between Mycobacterium and Nocardia. Jap. J. Microbiol. 14:187-195.
- 61 Voiland, A., and G. Michel. 1985. Structural studies of the cell wall polysaccharide of Nocardia asteroides R 399. Can. J. Microbiol. 31:1011-1018.

- 62 Vega-Lopez, F., N.G. Stoker, M.F. Lochniskar, H.M. Dockrell, - K.A Grant, and K.P.W.J. Mc Adam. 1988. Recognition of mycobacterial antigens by sera from patients with leprosy. *J. Clin. Microbiol.* 26:2474-2479.
- 63 Weber, K., and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular - weight determinations by dodecylsulfate-polacrylamide gel elec- trophoresis. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412.
- 64 Weir, D.M. 1973. Ion exchange chromatography and gel filtra- tion. (chapt. 7). *Immunochemistry* 2nd. Ed. Blackwell Scienti- fic Publications. Oxford.
- 65 Welsh, O., E. Saucedo, J. Gonzalez, and J. Ocampo. 1987. Amika cin alone and in combination with trimethoprim sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17:443-448.
- 66 Ximenez, C., E.I. Melendro, A.Gonzalez-Mendoza, A.M. Garcia, - A. Martinez, and L. Ortiz-Ortiz. 1980. Resistance to Nocardia brasiliensis infection in mice immunized with either Nocardia or BCG. *Mycopathologia.* 70:117-122.
- 67 Young, D., L. Kent, A. Rees, J. Lamb, and J. Ivanyi. 1986. Imu nological activity of a 38-kilodalton protein purified from - Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* 54:177-183.
- 68 Zamora, A., L.F. Bojalil and F. Bastarrachea. 1963. Immunologi cal active polysaccharides from Nocardia asteroides and Nocardia asteroides. *J. Bacteriol.* 85:549-555
- 69 Zimmer, B.L., and D. Pappagianis. 1986. Comparison of immuno- blot analysis of spherule-endospore-phase extracellular protein and mycelial-phase antigen of Coccidioides immitis. *Infect. Immun.* 53:64-70.
- 70 Zlotnik, H., V.L. Schramm and H.R. Buckley. 1984. Purification and partial characterization of a Nocardia brasiliensis extrace- llular protease. *J. Bacteriol.* 157:627-631.

**ANEXO A. ABREVIATURAS.**

**ANEXO A. ABREVIATURAS.**

1. BCG Bacilo de Calmette-Guerin.
2. BHI Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion).
3. BSA Albúmina Sérica Bovina (Bovin Serum Albumin).
4. C Grados centígrados.
5. %C Por ciento de Agente Entrecruzador (Bis-acrilamida).
6. cm Centímetros (s).
7. Da Dalton.
8. DEAE Dietilaminoetil.
9. DL<sub>50</sub> Dosis Letal 50 por ciento.
10. DNA Acido Desoxiribonucleico.
11. EIA Ensayo Inmuno Enzimático.
12. ELISA Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).
13. g Unidad de Gravedad.
14. gr Gramos.
15. kDa Kilodalton
16. M Molar.
17. meq Miliequivalente gramo.
18. mg Miligramo (s).
19. min Minuto (s).
20. ml Mililitro (s).
21. mm Milímetro (s).
22. mM Milimolar.
23. N Normal.

24. ng Nanogramos.
25. nm Nanómetros.
26. PBS Solución Salina Tamponada con Fosfato (Phosphate Buffered Saline).
27. P61 Proteína de 61 kDa.
28. P26 Proteína de 26 kDa.
29. P24 Proteína de 24 kDa.
30. pcg Picogramo(s).
31. pH Potencial de Hidrógeno.
32. r Coeficiente de Correlación.
33. RF Factor de Retardamiento (Movilidad Relativa).
34. SDS Laurilsulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate).
35. SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).
36. SSB Solución Salina Boratos.
37. %T Porcentaje de Acrilamida Total.
38. TEMED N,N,N',N', tetrametiletildiamina.
39. TPA Tuberculosis Pulmonar Activa.
40. Tris Tris(hidroximetil)aminometano.
41. UFC Unidades Formadores de Colonias.
42. v Voltios.
43. Ve Volumen de Elución.
44. Vo Volumen Vacío

**ANEXO B. FIGURAS.**

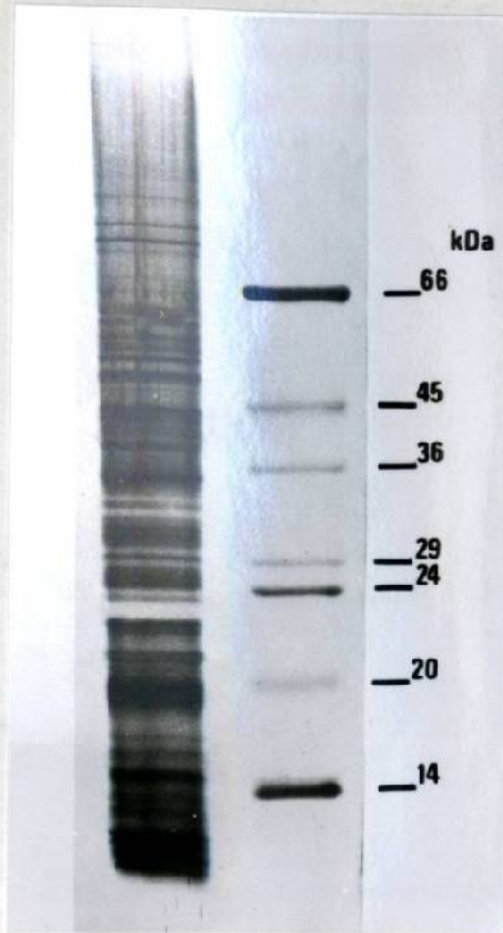


Figura 1. Análisis del extracto sonicado de N. brasiliensis por electroforesis en gel de poliarilamida-SDS en gradiente de 18 a 8.75%. Carril Izquierdo: antígeno crudo (25 µg). Carril derecho: Marcadores de peso molecular bajo. Tinción con Nitrato de Plata

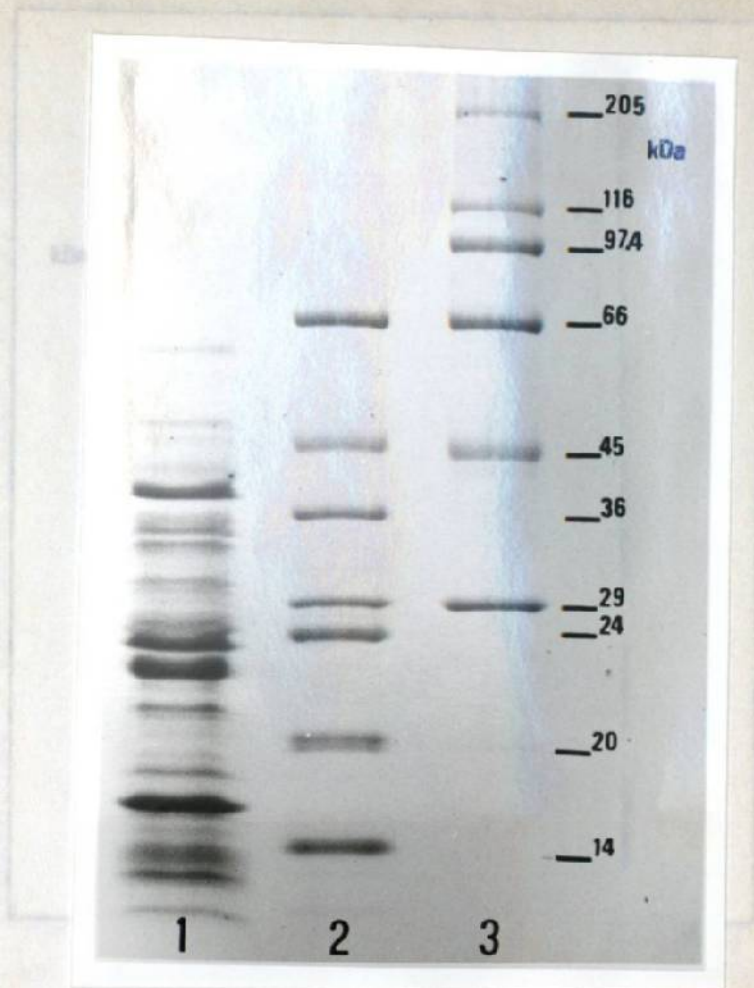


Figura 3. Electrotransferencia del antígeno sonificado de

**Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en gradiente de 18 a 8.75 % del extracto sonicado de *N. brasiliensis*.** ---- Carril no 1: Antígeno crudo (200 µg). Carril no 2: Marcadores de peso molecular bajo. Carril no 3: Marcadores de peso molecular alto. Tinción con Azul de Coomassie.



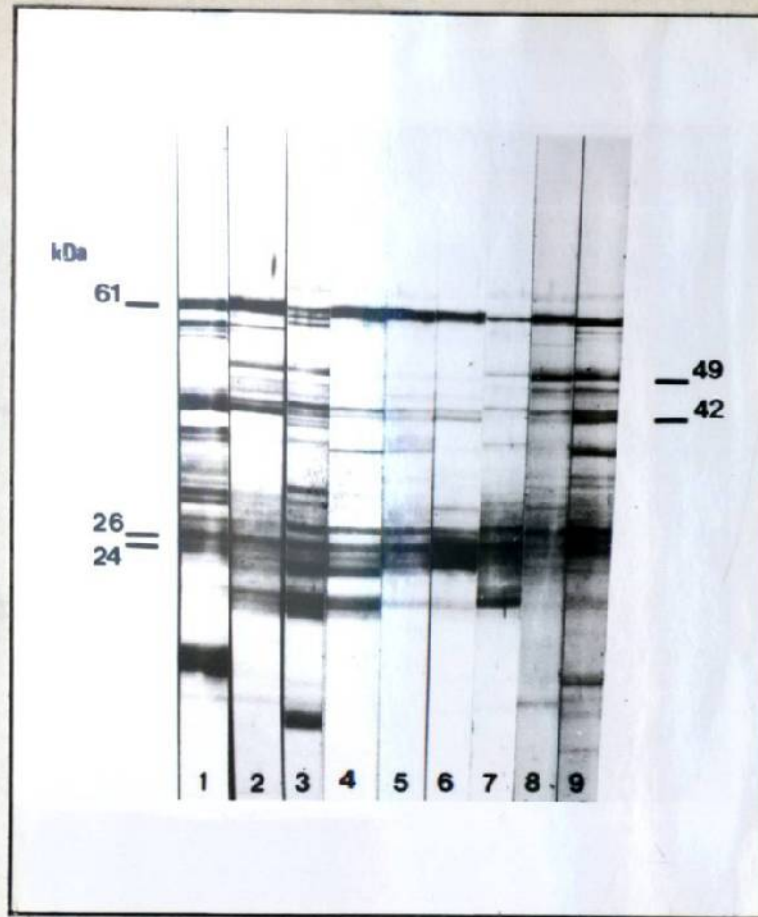


Figura 3. Electrotransferencia del antígeno sonicado de N. brasiliensis revelada con sueros de pacientes con micetoma. Tirilla no 1: Sueros de conejo inmunizado contra el extracto total. Tirillas 2 a la 7: Sueros de pacientes con micetoma por N. brasiliensis. Tirillas 8 y 9: Sueros de pacientes con micetoma por N. asteroides.

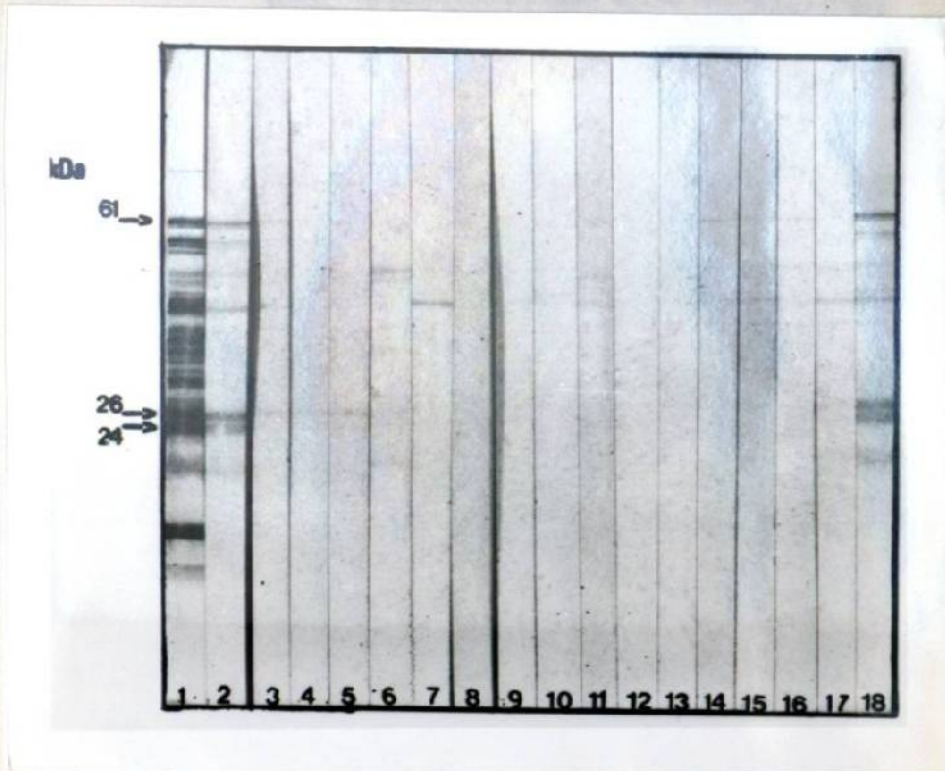
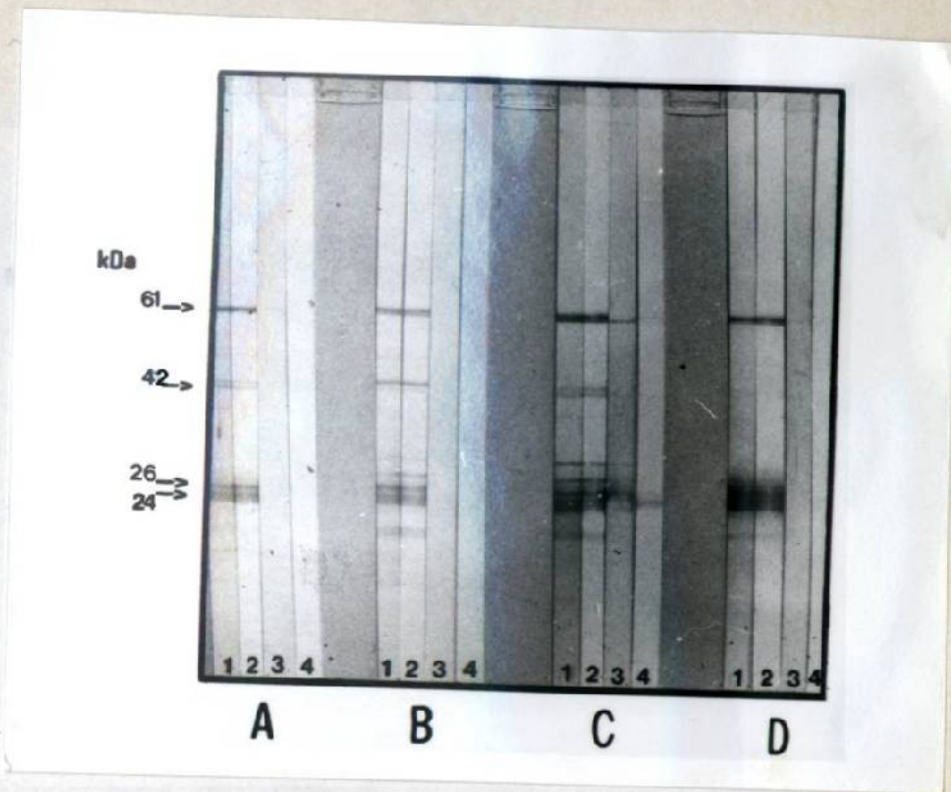


Figura 4. Eletrotransferencia del antígeno sonicado de *N. brasiliensis* revelada con sueros de sujetos sanos. Tirilla no 1: Sueros de conejo inmunizado contra el extracto total. Tirillas 2 y 18: Sueros de pacientes con mietoma por *N. brasiliensis*. Tirillas 3 a 17: Sueros de sujetos aparentemente sanos.



**Figura 5. Determinación de los isotipos de las inmunoglobulinas de los sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* que reaccionan con el extracto sonicado. A, B, C, y D son los grupos de tirillas revelados con diferentes sueros de pacientes con micetoma por *N. brasiliensis*. Los números de cada tirilla se refieren al conjugado utilizado como segundo anticuerpo. 1: Anti-inmunoglobulinas totales. 2: Anti-IgG. 3: Anti-IgM, y 4: anti-IgA.**

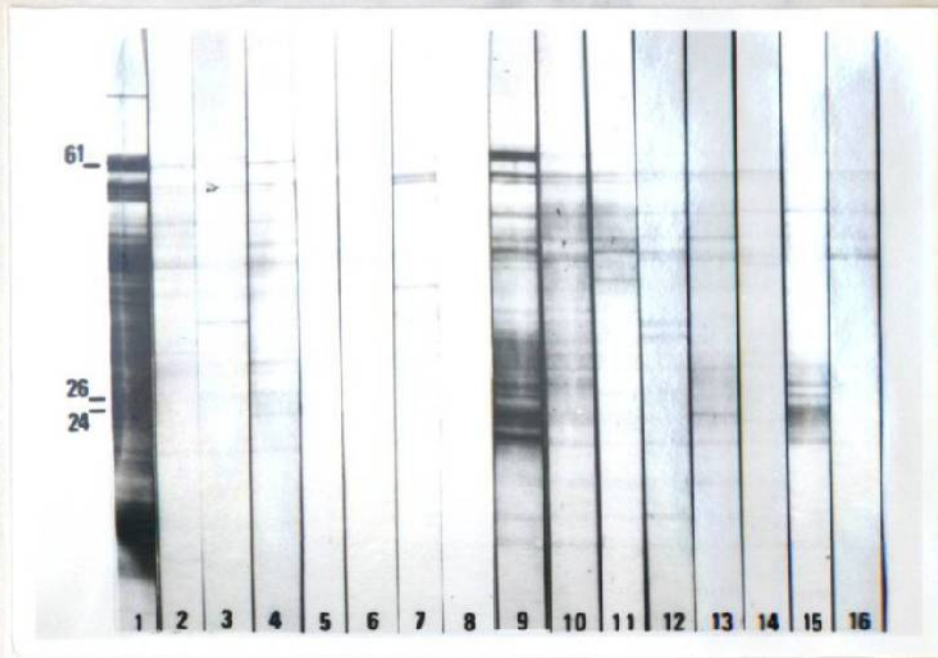
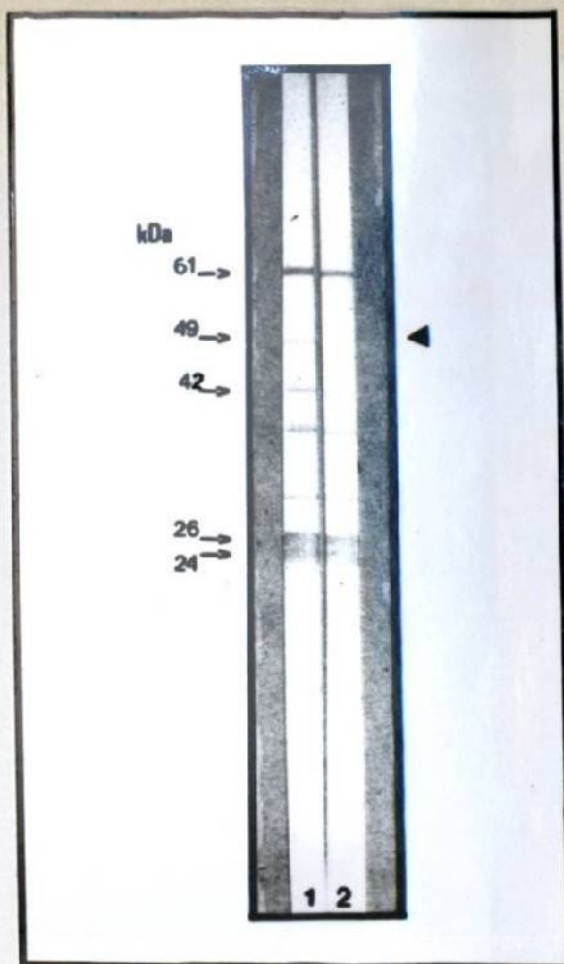
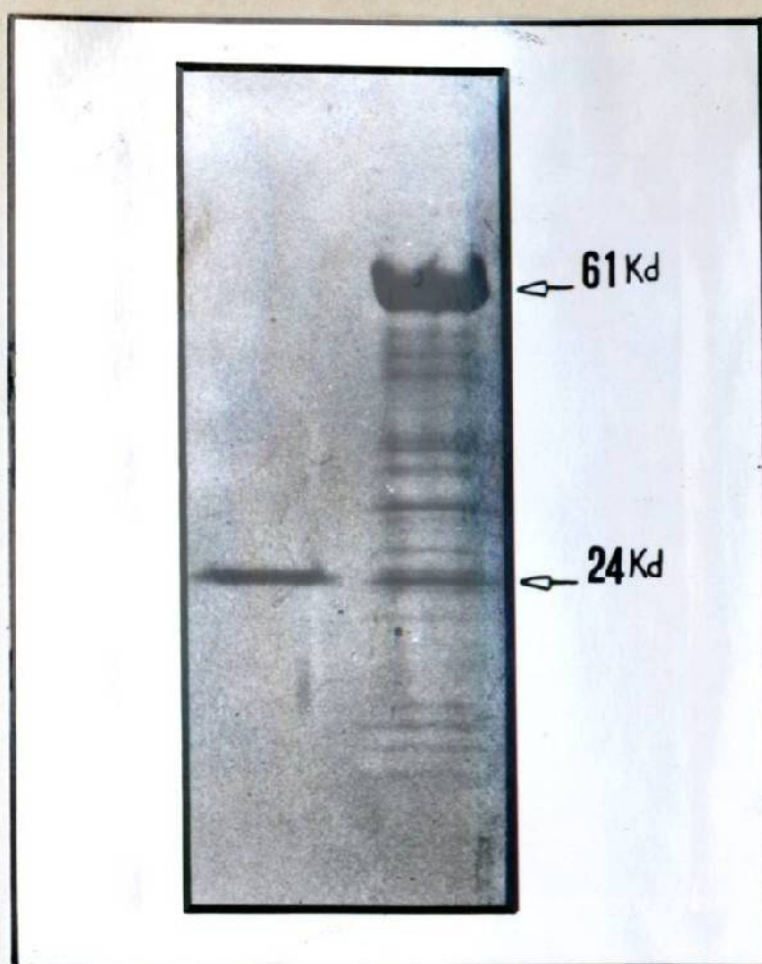


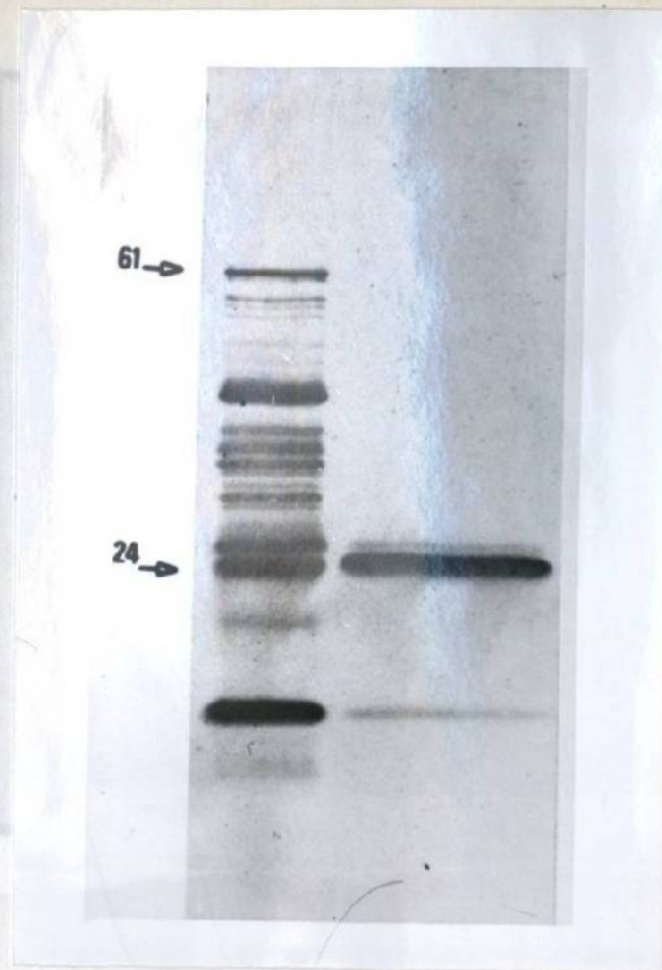
Figura 6. Electrotransferencia del extracto sonificado de *N. brasiliensis* revelado con sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y Enfermedad de Hansen. Tirilla no 1: suero hiperinmune de conejo anti-extracto total. Tirillas 2 a 8: sueros de pacientes con lepra. Tirilla no 9: suero de paciente con micetoma por *N. brasiliensis*. Tirillas 10-16: sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.



**Figura 7.** Adsorción de los anticuerpos contra las bandas de 49, 45, 43 y 42 kDa de N. brasiliensis, con células de M. tuberculosis H37Ra. Tirilla no 1: suero de conejo, anti-antígeno crudo de N. brasiliensis precipitado con sulfato de amonio al 50% de saturación. Tirilla no 2: tirilla incubada con el suero anterior, - pero adsorto con células desengrasadas y trituradas de M. tuberculosis H37Ra. La flecha indica la desaparición de la banda de 49. Menos claramente se observa en la fotografía, la desaparición de las bandas de 45 y 43 kDa.



**Figura 8. Aislamiento de las Proteínas de 61 y 24 kDa de *N. brasiliensis*.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en gradiente de 18-8.75%. Carril izquierdo: fracción P2 de la filtración en gel del extracto sonicado de *N. brasiliensis* en Sephadex G-100 (2.3  $\mu$ g). Carril derecho: Precipitado con sulfato de amonio al 50% del antígeno crudo (26  $\mu$ g). Las flechas indican la posición de las bandas de 61 y 24 kDa en el gel. Tinción con Azul de Coomassie.



**Figura 9. Aislamiento de la proteína de 24 kDa de N. brasiliensis.**

Análisis por Western blot. Carril izquierdo: extracto sonicado - (25 µg). Carril derecho: Fracción P2 del extracto sonicado, obtenido en Sephadex G-100 (2.3 µg). Electrotransferencia revelada - con sueros de conejo anti-extracto total.

Carril no 2: 50µg. Carril no 3: 70µg. Carril no 4: 50µg.

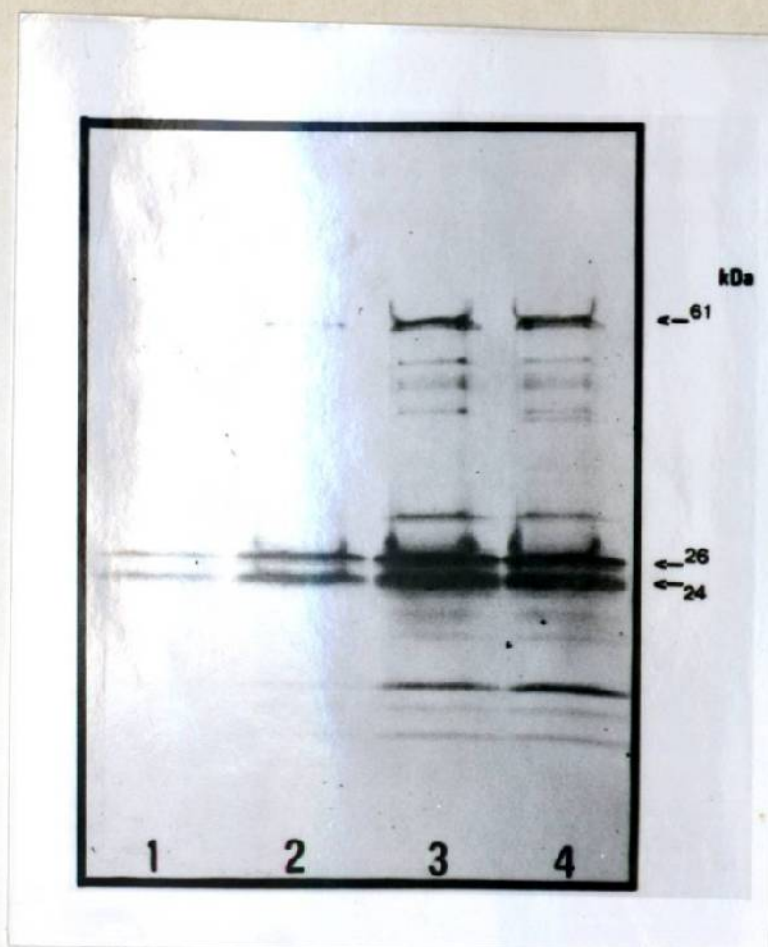


Figura 10. Análisis por Western blot de los precipitados del extracto crudo de N. brasiliensis fraccionado con sulfato de amonio. Precipitados del antígeno crudo a varios porcentajes de saturación de sulfato de amonio. Carril no 1: 20%. Carril no 2: 50%. Carril no 3: 70%. Carril no 4: 80%.



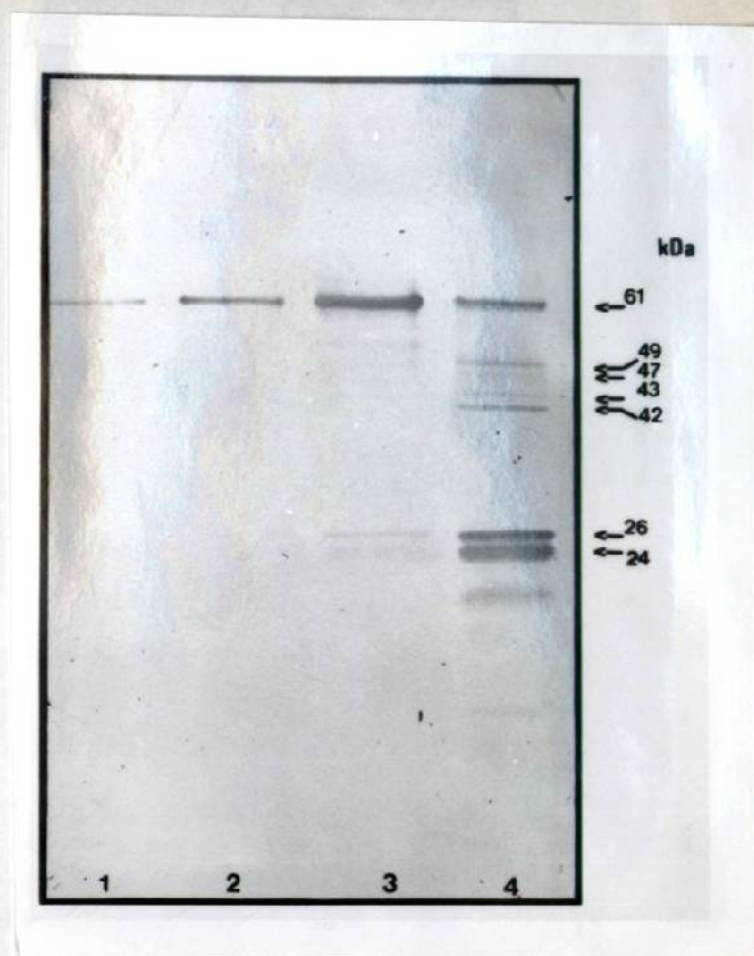
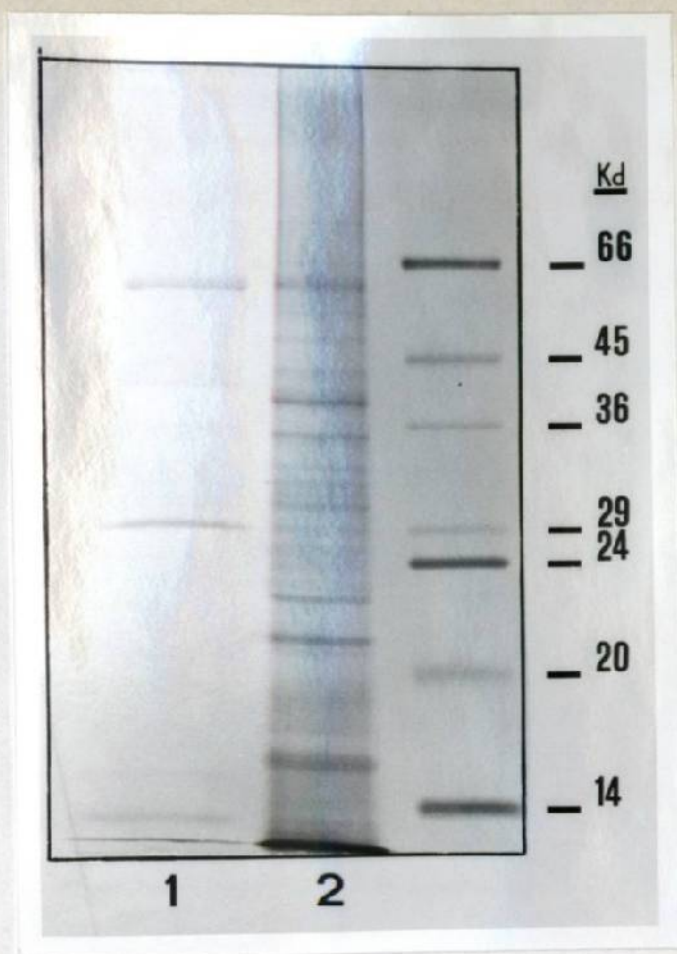
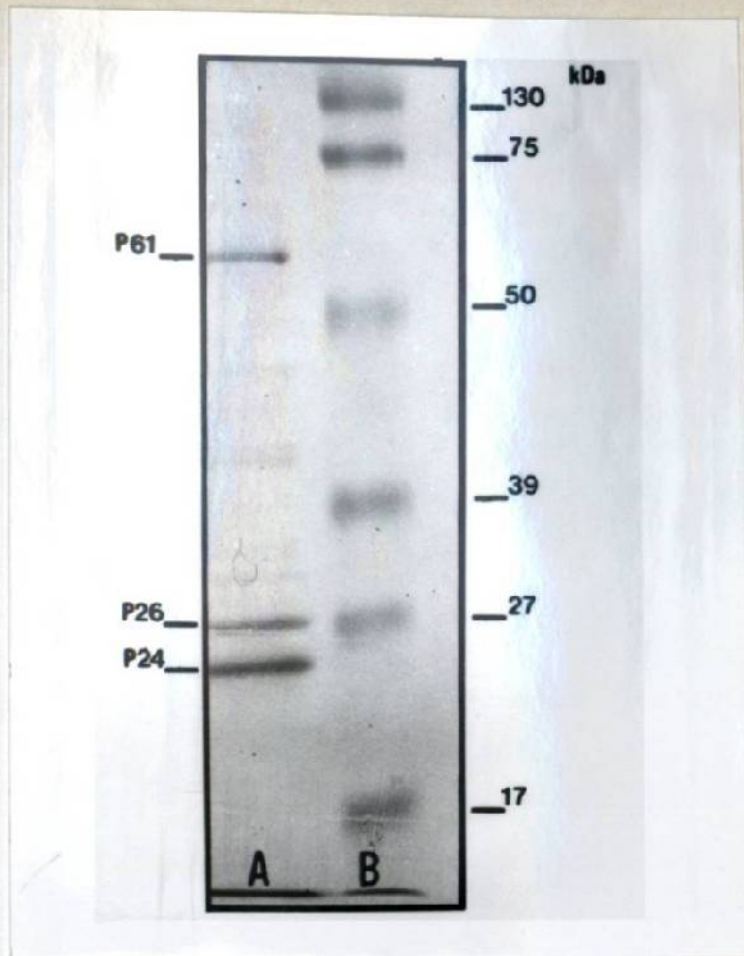


Figura 11. Electrotransferencia del antígeno crudo de N. brasiliensis y de su precipitado con sulfato de amonio al 50% de saturación. Carriles 1, 2 y 3: Antígeno crudo precipitado al 50% con sulfato de amonio (130, 260, y 1,300 ng de proteína respectivamente). Carril no 4: Antígeno crudo (25 µg).



**Figura 12. Cromatografía de intercambio iónico.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, lineal al 12%. Carril no 1: muestra -- del pico de elución de la columna de DEAE-celulosa que contenía -- la banda de 61 kDa. Carril no 2: antígeno crudo de N. brasiliensis. Carril en el extremo derecho: marcadores de peso molecular -- bajo. Tinción con nitrato de plata.



**Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12%.**  
 Carril A: Antígeno crudo precipitado al 50% con sulfato de amonio. Carril B: marcadores de peso molecular preteñidos. Fosforilasa B (130,000), Albúmina Sérica Bovina (75,000), Ovoalbúmina (50,000), Anhidrasa Carbónica (39,000), Inhibidor de Tripsina (27,000), y Lisozima (17,000). Tinción con Azul de Coomassie.

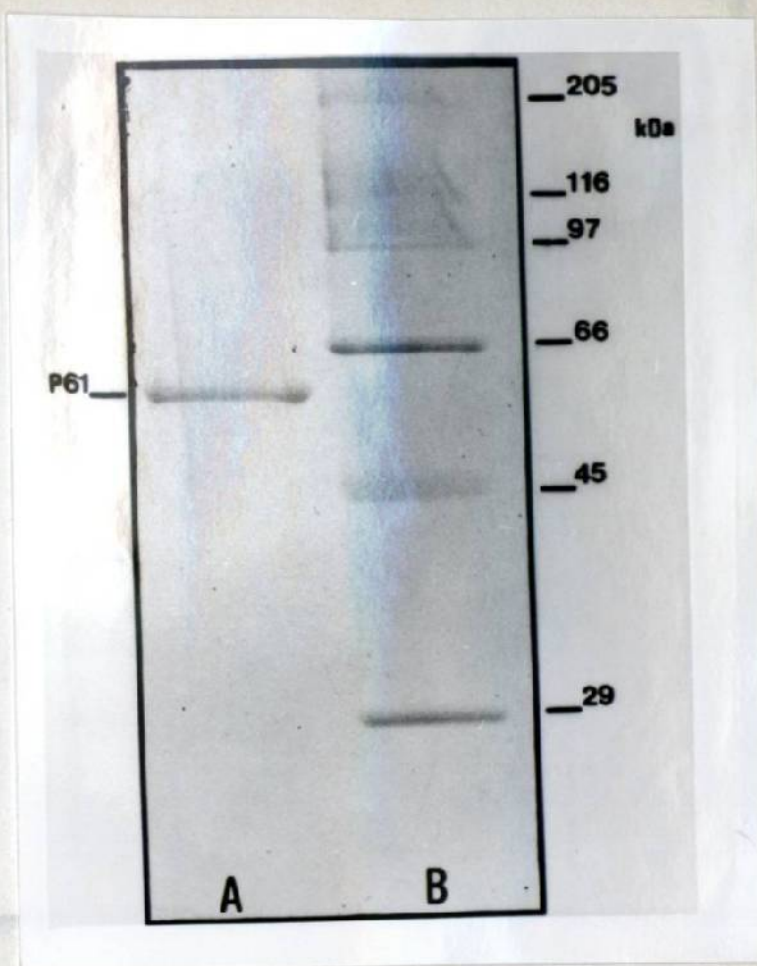


Figura 14. Análisis en SDS-PAGE de las proteínas de 25 y 26 kDa

**Figura 14. Purificación de la proteína de 61 kDa de *N. brasiliensis*.** Carril A: P61 obtenida por electroelución de geles preparativos con SDS. Carril B: Marcadores de peso molecular alto. Gel lineal al 12%. Tinción con Azul de Coomassie.

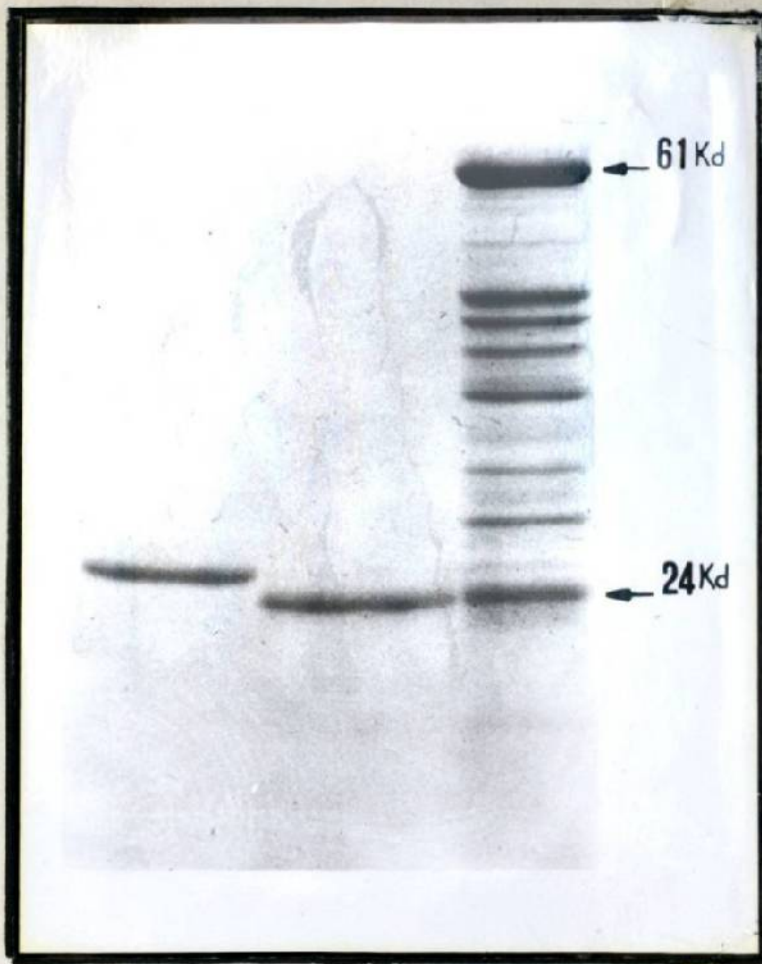


Figura 15. Análisis en SDS-PAGE de las proteínas de 26 y 24 kDa purificadas por electroelución en condiciones desnaturalizantes. Carril izquierdo: P26. Carril central: P24. Carril derecho: precipitado del antígeno crudo de N. brasiliensis con sulfato de amonio al 50%. Tinción con Azul de Coomassie.

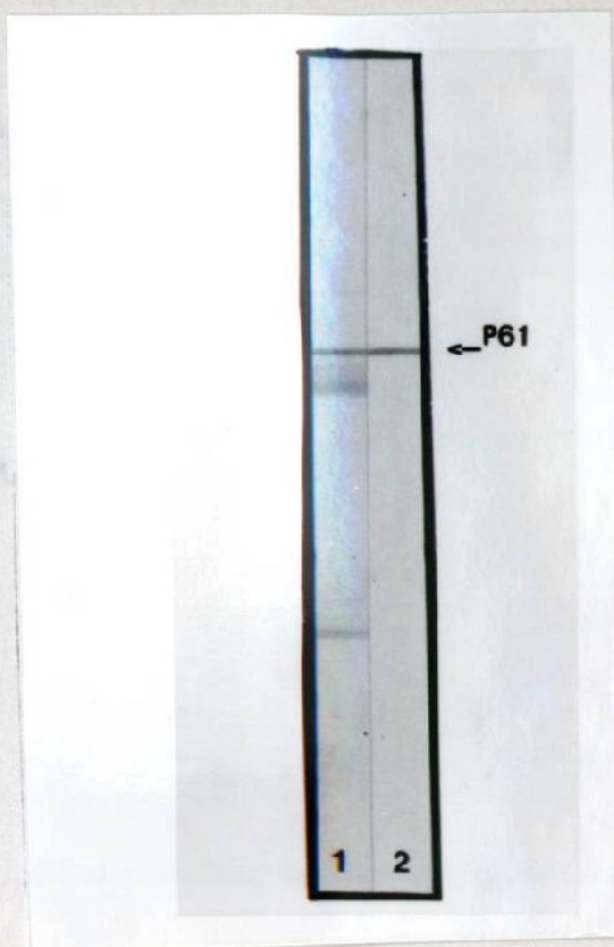
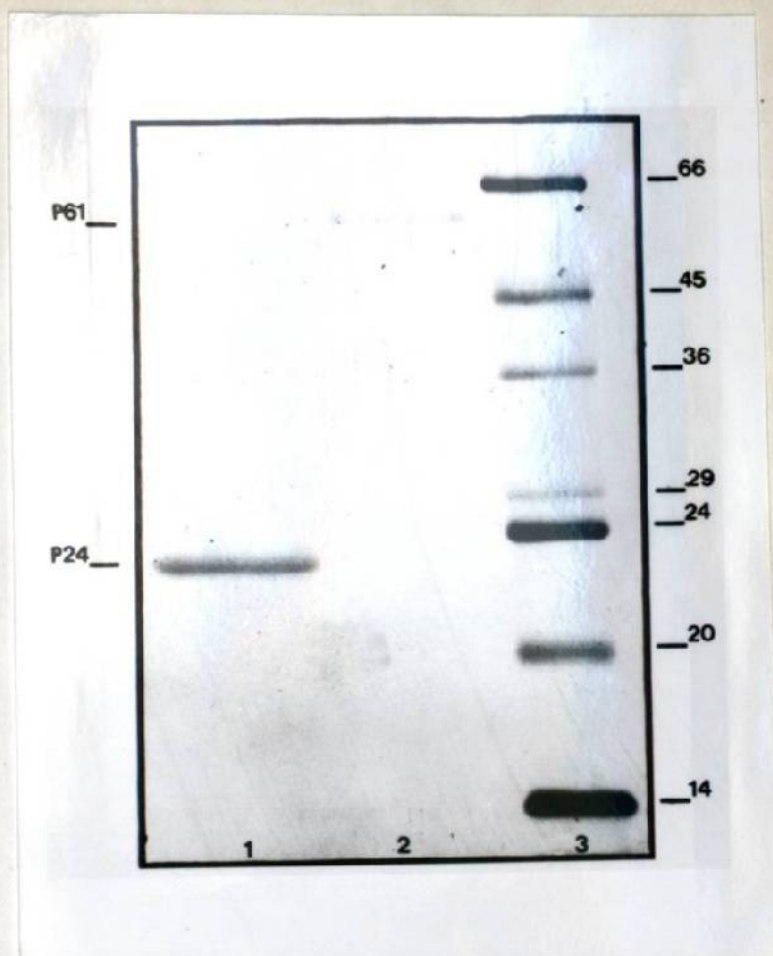
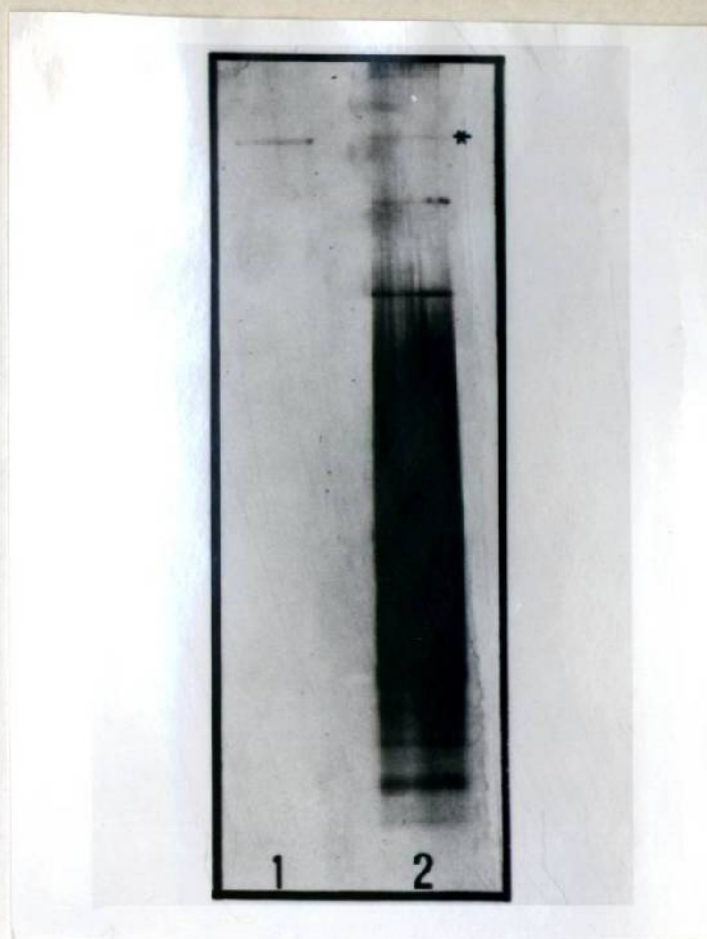


Figura 17. Análisis en SDS-PAGE de los productos purificados de 21 y 22 días de cultivo por

**Figura 16. Electrotransferencia del eluido con KSCN 3M del inmuno-**  
**noadsorbente anti-61 kDa de N. brasiliensis.** Tirilla no 1: Suero  
de paciente con micetoma por N. brasiliensis. Tirilla no 2: Anti-  
cuerpo monoclonal anti-61 kDa de N. brasiliensis.

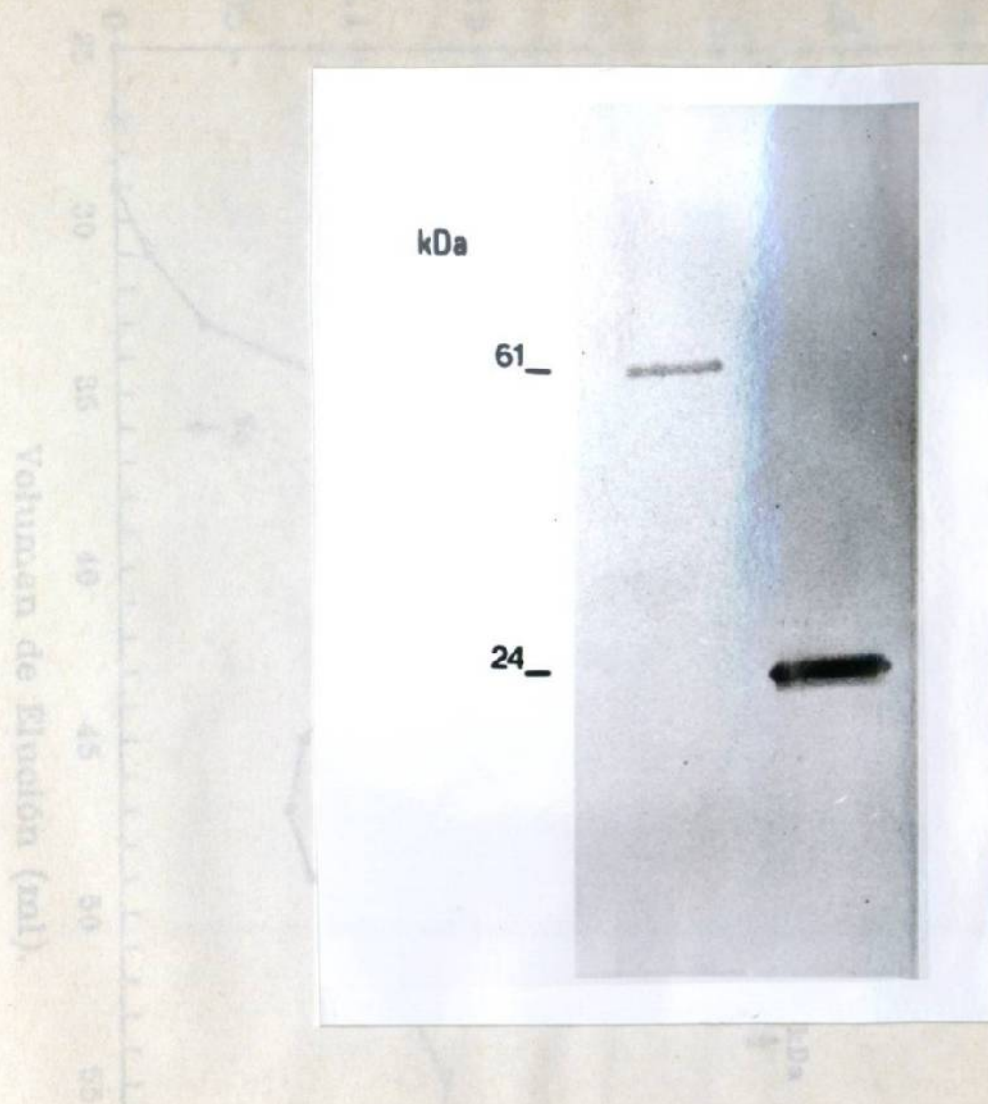


**Figura 17. Análisis en SDS-PAGE lineal al 12% de las proteínas purificadas de 61 y 24 kDa. Carril no 1: P24 obtenida por electroelución de geles sin SDS. Carril no 2: P61 obtenida por electroelución de geles en condiciones desnaturalizantes. Carril no 3: estándares de peso molecular. Gel al 12%. Tinción con nitrato de plata.**



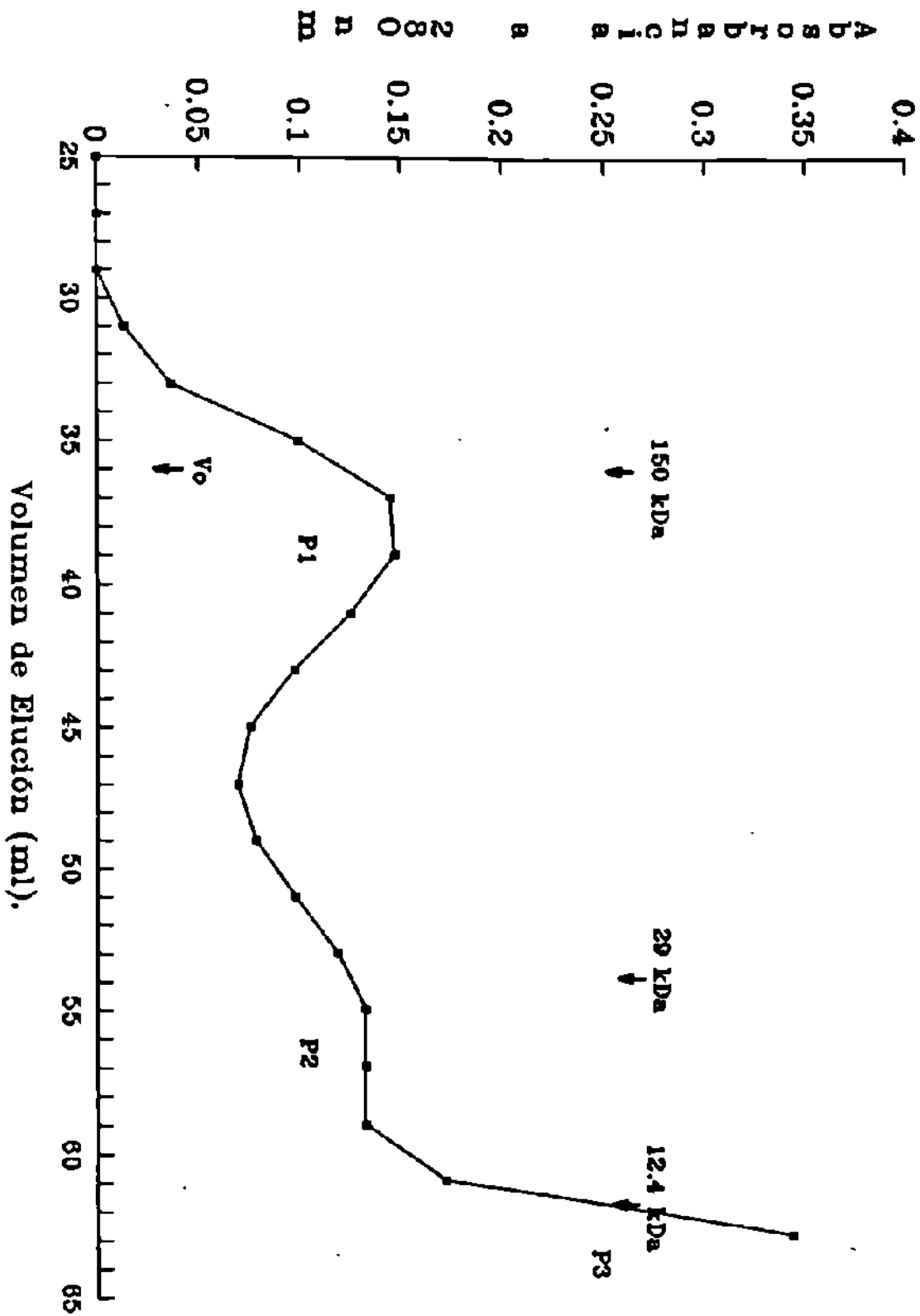
**Figura 18.** Determinación de la movilidad de la banda de 61 kDa en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturizantes. Carril no 1: P61 semipurificada obtenida por cromatografía de intercambio iónico. Carril no 2: Antígeno crudo sonicado (25  $\mu$ g). Tinción con nitrato de plata. La banda marcada con el asterisco corresponde a P61 en el extracto crudo.





**Figura 19. Análisis por electrotransferencia de las proteínas - purificadas de 61 y 24 kDa, de N. brasiliensis. Carril izquierdo: P61 (300 ng). Carril derecho: P24 (300ng). Peso molecular en kilodaltons.**

Figura No. 20. Perfil de Elución del Extracto Sonificado de Nocardia brasiliensis en Sephadex G - 100.



**ANEXO C. TABLAS.**

TABLA No I  
 DETERMINACION DE LA MOVILIDAD RELATIVA (Rf) DE  
 LOS MARCADORES DE PESO MOLECULAR EN EL PAPEL  
 TEÑIDO CON AZUL DE COOMASSIE.

MARCADOR.	MIGRACION (mm) . .	Rf.	P.M.
Albúmina Sérica Bovina.	21.5	0.2945	66,000
Ovoalbúmina.	30.0	0.4109	45,000
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.	35.0	0.4794	36,000
Anhidrasa carbónica.	42.5	0.58219	29,000
Tripsinógeno.	45.5	0.6232	24,000
Inhibidor de la Tripsina.	53.5	0.7328	20,100
Alfa-Lactalbúmina.	65.0	0.8904	14,200
Azul de Bromofenol.	73.0		
		$r = -0.9959$	

TABLA No II

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS BANDAS IDENTIFICADAS EN WESTERN BLOT POR LOS PACIENTES CON MICTOMA POR Nocardia brasiliensis.

BANDA No.	MIGRACION (mm).	Rf.	PESO MOLECULAR APROXIMADO.
1	26	0.3229	61,000
2	32	0.3935	49,000
3	33	0.4099	47,000
4	35.5	0.4437	43,000
5	37	0.4596	42,000
6	50	0.6211	26,000
7	52	0.6459	24,000

TABLA III. IDENTIFICACION, POR WESTERN BLOT, DEL EXTRACTO SONICADO DE N. brasiliensis POR SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA Y SUEROS DE SUJETOS SANOS.

	PESO MOLECULAR APROXIMADO (KILODALTONES)										
	61	56	55	49	47	45	43	42	28	26	24
<u>Nocardia brasiliensis</u> n=16	13	6	6	9	5	6	10	9	7	14	14
<u>Nocardia asteroides</u> n=3	3	2	2	3	3	0	3	0	2	3	2
Sujetos sanos. n=25	4	0	0	4	0	2	3	6	0	0	0

TABLA IV. IDENTIFICACION, POR WESTERN BLOT, DEL EXTRAC-  
TO SONICADO DE *N. brasiliensis* POR SUEROS DE PACIENTES  
CON ENFERMEDAD DE HANSEN Y TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA.

	PESO MOLECULAR APROXIMADO (kda)										
	61	56	55	49	47	45	43	42	28	26	24
HANSEN n=13	2	4	4	11	1	6	1	9	0	3	3
TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA n=17	0	6	6	13	0	9	3	13	0	4	4





