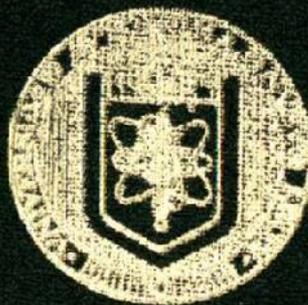


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



IDENTIFICACION DE UN ANTIGENO  
INMUNODOMINANTE DE *Nocardia asteroides* CON  
POTENCIAL DIAGNOSTICO

Por  
MARIA DE LOS ANGELES CASTRO CORONA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología

Enero, 2005

MARIA DE LOS ANGELES CASTRO CORONA

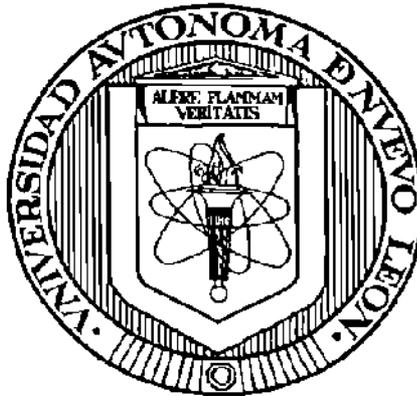
TD  
QR82  
.A35  
C3  
2005  
c.1



1080126537

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**IDENTIFICACIÓN DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE  
*Neisseria asteroides* CON POTENCIAL DIAGNÓSTICO**

**Por**

**MARÍA DE LOS ÁNGELES CASTRO CORONA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología**

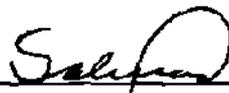
**Enero, 2005**

TD  
QR 2  
-435  
C3  
2 5



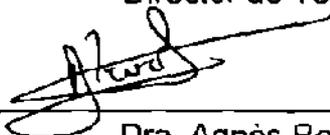
**IDENTIFICACIÓN DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE  
*Nocardia asteroides* CON POTENCIAL DIAGNÓSTICO**

Aprobación de la Tesis:



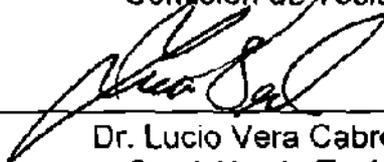
---

Dr. Mario César Salinas Carmona  
Director de Tesis



---

Dra. Agnès Revol  
Comisión de Tesis



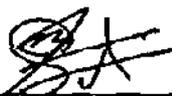
---

Dr. Lucio Vera Cabrera  
Comisión de Tesis



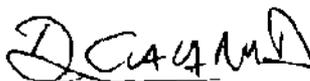
---

Dr. Carlos Eduardo Medina De la Garza  
Comisión de Tesis



---

Dr. Juan Manuel Solís Soto  
Comisión de Tesis



---

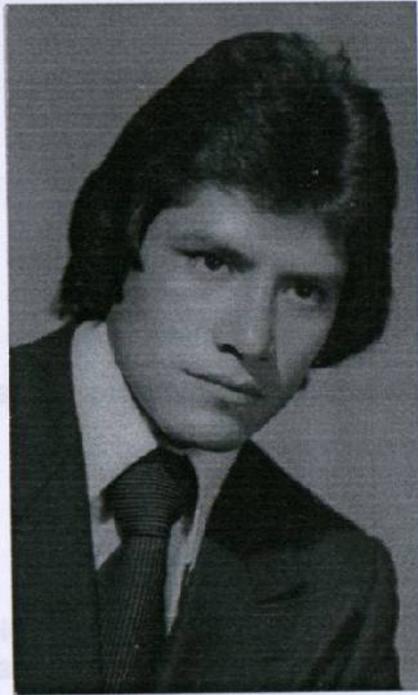
Dr. Dionicio Angel Galarza Delgado  
Subdirector de Estudios de Postgrado

# **IDENTIFICACIÓN DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE *Nocardia asteroides* CON POTENCIAL DIAGNÓSTICO**

El presente trabajo fue realizado por María de los Ángeles Castro Corona, en el *Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León*, bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona. Apoyado parcialmente por la Universidad Autónoma de Nuevo León (PAICYT).

Agradezco a CONACYT la beca – crédito otorgada.

DEDICATORIA



A MIS PADRES

Maria de Jesús y José Sa

el y su inmenso cariño.

A MIS HERMANOS

Mario, Elpidio, Pablo, H  
ejemplo de perseverancia

mando, porque son un

A MIS SOBRINOS

Mariza, Roberto, Mónica  
vida.

and Erick, por iluminar mi

*A Pablo Millán Corona †  
In memoriam*

*Siempre permanecerá en nuestro corazón*

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

María de Jesús y José Santos, por el apoyo incondicional y su inmenso cariño.

### **A MIS HERMANOS**

Mario, Elpidio, Pablo, Hilda, Teresa, Pablo R. y Fernando, porque son un ejemplo de perseverancia.

### **A MIS SOBRINOS**

Maritza, Roberto, Mónica, Gabriela, Daniel, Leonardo y Erick, por iluminar mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por su dirección y sabios consejos, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su equipo.

A la Dra. Agnès Revol, por sus consejos y por su interés para llevar a buen termino este proyecto.

Al Dr. Lucio Vera Cabrera, por sus valiosas aportaciones y por el legado *Nocardia*.

Al Dr. Juan Manuel Solís Soto, por su disposición para colaborar en este trabajo.

Al Dr. Carlos Eduardo Medina De la Garza, por tu crítica acertada, por tus consejos precisos y principalmente por tu amistad.

A la Dra. María del Socorro Flores González, porque a pesar de la distancia, como los buenos amigos, siempre esta presente.

A todos los compañeros del Departamento de Inmunología (dice TODOS), porque cada uno de Ustedes es pieza clave para el buen desarrollo de nuestro trabajo. Además, por formar parte de mi segunda familia.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, gracias por preocuparse por los estudiantes de postgrado, por sus enseñanzas y su trato siempre cordial.

Agradezco sinceramente a todos los compañeros de las diferentes especialidades del *postgrado*, por la solidaridad que siempre me brindaron.

A las doctoras de la AMNL: Estela Morales, Irene Rosas, Lidia Arenas, Guadalupe Moreno, Beatriz de la Fuente, Sandra Villarreal, Rosalba Rodríguez y Angelina Patrón, por compartir sus conocimientos y experiencia y permitirme ser parte del grupo.

A Gloria Molina, Ana Laura Marines, Araceli Fuentes y Lupita De la Cruz por su amistad y cariño.

Al *personal* de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario, que brindan servicio de calidad, pero lo más importante con calidez.

Gracias a todos los compañeros, que han estado en el Departamento de Inmunología, por los días felices que compartimos.

Un agradecimiento especial a todos los alumnos de Medicina, que han cursado la materia de Inmunología, Ustedes han sido mis mejores maestros.

# INDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos microbiológicos	1
1.2 Patología y formas clínicas de la infección	3
1.3 Respuesta inmune	5
1.4 Infecciones en humanos	7
1.5 Diagnóstico	12
1.6 Justificación	15
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
1. Microorganismos	19
2. Obtención de los extractos celulares	19
2.1 Obtención del inóculo	19
2.2 Obtención de extractos celulares de bacterias del género <i>Nocardia</i>	20
3. Determinación de proteínas por el método de Bradford	21
4. Análisis electroforético de los extractos celulares	22
4.1 Análisis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), de los extractos celulares de <i>N. asteroides sensu stricto</i> , <i>N. farcinica</i> y <i>N. nova</i>	22
4.2 Tinción con nitrato de plata	24

4.3 Tinción con azul de Coomassie	24
5. Identificación de antígenos inmunodominantes de <i>N. asteroides</i> , <i>N. farcinica</i> y <i>N. nova</i> en ratones BALB/c	25
5.1 Animales	25
5.2 Identificación de antígenos inmunodominantes de <i>N. asteroides</i> , <i>N. farcinica</i> y <i>N. nova</i> en ratones BALB/c inmunizados	25
5.2.1 Antígenos	26
5.2.2 Esquema de inmunización	26
5.3 Identificación de antígenos inmunodominantes de <i>N. asteroides</i> , <i>N. farcinica</i> y <i>N. nova</i> en ratones BALB/c infectados	27
5.3.1 Inóculos	27
5.3.2 Esquema de infección	27
6. Identificación de antígenos inmunodominantes mediante Western blot	28
7. Aislamiento de un antígeno inmunodominante	29
7.1 Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio	29
7.2 Identificación del antígeno inmunodominante	30
7.3 Electroelución del antígeno inmunodominante	30
8. Transferencia de un antígeno inmunodominante a membrana polyvinylidene difluoride (PVDF)	31
8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida la 12 % en condiciones desnaturalizantes	31
8.2 Transferencia del antígeno inmunodominante a membrana de PVDF	31
8.3 Tinción de la membrana de PVDF con azul de Coomassie	32
9. Determinación de la secuencia aminoacídica N-terminal de un antígeno inmunodominante	32
10. Clonación de un antígeno inmunodominante de <i>N. asteroides</i>	33

10.1 Obtención del DNA genómico	33
10.2 Diseño de iniciadores	34
10.3 Estandarización de la técnica de PCR	34
10.4 Electroforesis en geles de agarosa	35
10.5 Clonación del producto amplificado en vector T	36
10.5.1 Preparación del vector T	36
10.5.2 Ligación del vector T y el producto amplificado para formar el vector recombinante	38
10.5.3 Transformación de células <i>E. coli</i>	39
10.5.4 Caracterización de las clonas recombinantes	39
10.5.5 Obtención del DNA plasmídico	39
10.5.6 Análisis de los plásmidos recombinantes	40
11. Determinación y análisis de la secuencia nucleotídica del producto amplificado	41
<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
1. Rendimiento del extracto celular de <i>N. asteroides</i> , <i>N. farcinica</i> y <i>N. nova</i>	42
2. Análisis de los extractos celulares en SDS-PAGE	42
3. Identificación de antígenos inmunodominantes en suero de ratones BALB/c inmunizados	44
4. Identificación de antígenos inmunodominantes en suero de ratones BALB/c infectados	48
5. Selección de un antígeno inmunodominante específico de <i>N. asteroides</i>	52
6. Aislamiento del antígeno inmunodominante de <i>N. asteroides</i>	56
7. Secuencia aminoacídica N-terminal de la proteína de 36-kDa de <i>N. asteroides</i>	59
8. Comparación de la secuencia N-terminal	59
9. Diseño de iniciadores para el gen que codifica a la proteína de 36 kDa de <i>N. asteroides</i>	60
10. Obtención del DNA genómico de <i>N. asteroides</i>	62

11. Amplificación del fragmento del gen que codifica una tiolasa de <i>N. asteroides</i>	63
12. Clonación en vector T	64
13. Determinación de la secuencia nucleotídica del producto amplificado de tiolasa de <i>N. asteroides</i>	65
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>74</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>91</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>93</b>
APÉNDICE A	94
APÉNDICE B	95

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Condiciones de la PCR	35
II. Digestión de pBS-SK II con <i>Eco</i> RV	36
III. Condiciones de reacción para la preparación del vector T	37
IV. Condiciones de ligación	38
V. Porcentaje de similitud entre las secuencias aminoacídicas de tiolasa de <i>N. asteroides</i> con secuencias de bacterias relacionadas	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Página</b>
1. Patrón electroforético de los extractos celulares de <i>Nocardia</i>	43
2. Respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados con extracto de <i>N. asteroides</i>	45
3. Respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados con extracto de <i>N. farcinica</i>	46
4. Respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados con extracto de <i>N. nova</i>	47
5. Respuesta de anticuerpos de ratones infectados con <i>N. asteroides</i>	49
6. Respuesta de anticuerpos de ratones infectados con <i>N. farcinica</i>	50
7. Respuesta de anticuerpos de ratones infectados con <i>N. nova</i>	51
8. Análisis de anticuerpos de reacción cruzada, producidos por ratones inmunizados con <i>Nocardia</i>	53
9. Análisis de anticuerpos de reacción cruzada, producidos por ratones inmunizados con <i>Nocardia</i>	54
10. Análisis de anticuerpos de reacción cruzada, producidos por ratones inmunizados con <i>Nocardia</i>	55
11. Análisis electroforético de la proteína de 36-kDa de <i>N. asteroides</i>	57
12. Análisis de la proteína de 36-kDa transferida a PVDF	58
13. Comparación del péptido N-terminal de <i>N. asteroides</i>	60
14. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de tiolasa	61
15. Análisis del DNA genómico de <i>N. asteroides</i>	62
16. Amplificación del fragmento del gen de tiolasa de <i>N. asteroides</i>	63
17. Análisis de las clonas recombinantes	64
18. Alineamiento y comparación de las secuencias aminoacídicas del producto amplificado de <i>N. asteroides sensu stricto</i>	66

## RESUMEN

**María de los Ángeles Castro Corona**

**Fecha de Obtención del grado  
Enero 2005**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del estudio: IDENTIFICACIÓN DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE  
*Nocardia asteroides* CON POTENCIAL DIAGNÓSTICO**

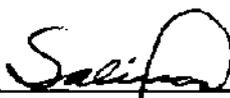
**Número de páginas:95**

**Candidato al grado de Doctor  
en Ciencias con Especialidad  
en Inmunología.**

**Área de estudio: Inmunología**

**Propósito y Método del estudio:** *Nocardia asteroides*, *Nocardia farcinica* y *Nocardia nova* producen infección sistémica en los seres humanos. Hasta el momento las pruebas para la identificación de estas especies solo se realizan en laboratorios de referencia. El objetivo del presente trabajo fue identificar un antígeno inmunodominante de *Nocardia asteroides* que pueda ser utilizado para desarrollar una prueba diagnóstica rápida que sea utilizada en la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos. El antígeno inmunodominante se identificó mediante la respuesta de anticuerpos en el suero de ratones BALB/c infectados e inmunizados con las tres especies de *Nocardia* mediante la técnica de Western-blot. El antígeno identificado se aisló a partir de un extracto celular, y se determinó su secuencia N-terminal. A partir de esta secuencia se diseñaron iniciadores consenso con lo que se amplificó el gen correspondiente el cual se clonó en vector T.

**Contribuciones y Conclusiones:** Mediante el análisis de la respuesta de anticuerpos fue posible identificar un antígeno inmunodominante de *Nocardia asteroides sensu stricto*. Este antígeno no desencadenó reacción cruzada con *N. farcinica* y *N. nova*, además indujo respuesta de anticuerpos en ratones infectados. La secuencia N-terminal identificó a la proteína como una tiolasa. Después del diseño de iniciadores consenso para el gen del antígeno seleccionado, se amplificó el gen de tiolasa a partir del DNA genómico de *N. asteroides sensu stricto*. El producto amplificado se clonó en vector T. La secuencia nucleotídica del producto amplificado de *N. asteroides*, presenta un 77% de similitud con *Nocardia farcinica*. Las diferencias encontradas, hacen a esta proteína un buen candidato para desarrollar una prueba diagnóstica.



Dr. Mario César Salinas Carmona  
Director de Tesis

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Nocardia* son bacterias aerobias, saprofitas, que se encuentran en la naturaleza en el suelo, madera, vegetales y espigas. (1, 2, 3). En regiones secas con clima cálido se encuentran millones de actinomicetos del género *Nocardia* por gramo de tierra (2).

En el año de 1888 Nocard, aisló de un bovino con mastitis, un micro-organismo aerobio, filamentosos. Un año más tarde Trevisan creó el género *Nocardia*, y *Nocardia farcinica* se consideró como la especie tipo (4). En 1890, Eppinger aisló un organismo similar de un paciente con una enfermedad sistémica; este organismo fue nombrado *Cladothrix asteroides*, sin embargo en 1896 fue renombrado como *Nocardia asteroides* (5). Actualmente *Nocardia asteroides* es considerada la cepa tipo de este grupo de microorganismos (6).

### 1.1 Aspectos microbiológicos.

A finales de 1890 se reconoció un grupo de microorganismos filamentosos que semejaban a hongos y bacterias. Estos organismos fueron nombrados Actinomicetos. Originalmente los Actinomicetos comprendían 4 géneros: *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia* y *Mycobacterium* (6). Hasta la fecha se han descrito más de 40 géneros de Actinomicetos (6).

Los géneros bacterianos *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia* y *Mycobacterium* están filogenéticamente relacionados (7, 8, 9, 10, 11, 12). Para la diferenciación taxonómica de estos géneros se han desarrollado diversas técnicas, entre ellas el análisis químico de los componentes de la pared celular, en donde *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium* se han clasificado dentro del tipo IV por los carbohidratos de su pared celular y patrón de azúcares tipo A (arabinosa y galactosa) (8). La pared celular de las bacterias del género *Corynebacterium* posee ácidos micólicos cuyas cadenas varían entre 20-38 átomos de carbono, en el caso de *Rhodococcus* las cadenas son de 34-66, para *Nocardia* son de 44-60 y para *Mycobacterium* de 60-90 (6). Estas características se han utilizado como criterio taxonómico para diferenciar especies de *Mycobacterium* (6, 8). También se ha utilizado para la clasificación bacteriana la composición de sus ácidos nucleicos, en donde estos géneros presentan un alto contenido de (% molar) guanina-citosina: 52-68% para *Corynebacterium*, 59-69% para *Rhodococcus*, 60-72% para *Nocardia* y 62-70% para *Mycobacterium* (8, 9, 13). Los análisis previamente mencionados hacen evidente las similitudes bioquímicas y estructurales que existen entre estas bacterias. Desde el punto de vista inmunológico, dichas similitudes se ponen de manifiesto en las reacciones cruzadas observadas con sueros inmunes contra uno u otro género.

El género *Nocardia* fue definido por Goodfellow y Minnikin como actinomicetos grampositivos, aerobios, de desarrollo lento, que producen micelio aéreo y que se fragmentan en elementos coccoides y bacilares (6). Los

filamentos ramificados en el micelio aéreo tienen un diámetro que varía de 0.3 a 1.5  $\mu\text{m}$ . De acuerdo a sus características tintoriales, las bacterias del género *Mycobacterium* son ácido-alcohol resistentes, mientras que *Nocardia* y *Rhodococcus* lo son parcialmente (6).

*Nocardia asteroides* es una especie heterogénea que puede incluir por lo menos a una docena de subgrupos distintos; *Nocardia farcinica* y *Nocardia nova* comparten algunas propiedades con *N. asteroides* (14). Por este motivo algunas especies fueron consideradas dentro de un grupo llamado complejo *Nocardia asteroides* (14, 15).

## 1.2 Patología y formas clínicas de la infección.

*N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*, son las tres especies que causan la mayoría de las infecciones en humanos (16). En el hombre, cerca del 80% de los casos de nocardiosis pulmonar y sistémica es causada por *N. asteroides*, el 15% por *N. brasiliensis* y el 1% por *N. otitidiscaviarum*. (16, 17, 18).

Las infecciones por *Nocardia spp.* pueden agruparse en una amplia gama de enfermedades de acuerdo a la vía de infección y las subsecuentes manifestaciones clínicas y características anatomopatológicas (16). Estos grupos incluyen: nocardiosis pulmonar y sistémica, nocardiosis localizada

cutánea y subcutánea, infección linfocutánea (enfermedad esporotricoides) y actinomicetomas (16, 19).

El actinomicetoma se presenta como un nódulo indoloro en el sitio de la lesión, que en el transcurso de unas semanas o meses se observa la formación de fístulas, por las que drena material seroso, serosanguinolento o purulento (14). Este material contiene gránulos que están constituidos por células inflamatorias y colonias macroscópicas del microorganismo. La lesión se puede diseminar a músculo o hueso.

*N. asteroides*, también produce en la mayoría de los casos, infección sistémica caracterizada por supuración sin presencia de granos, originando la enfermedad conocida como nocardiosis. *N. asteroides* es el principal agente causal de la nocardiosis en Norte América (20), donde esta enfermedad se presenta principalmente en sujetos inmunocomprometidos (21, 22).

La nocardiosis es una enfermedad que generalmente afecta a los pulmones y puede llegar a diseminarse a otro órgano. En la infección pulmonar las lesiones pueden ser dispersas o formar un absceso grande y confluyente. Histológicamente se observa granulación y fibrosis del tejido que rodea las áreas de necrosis. En los abscesos, *N. asteroides* se encuentra dispersa en forma de redes: esto constituye el pseudogránulo, en donde también se encuentran: una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas, linfocitos y fibrina (23).

La infección de los pulmones puede permanecer localizada, o diseminarse por extensión directa. Sin embargo, aproximadamente 23-25% de los casos presentan diseminación hematológica. Durante la diseminación hematológica el cerebro representa el principal blanco tanto para lesiones primarias o secundarias pero también se pueden presentar lesiones en piel, riñón, ojos y corazón (14).

La nocardiosis frecuentemente mimetiza otras enfermedades como: tumores, varios tipos de cáncer, infecciones piógenas, tuberculosis y una variedad de infecciones por hongos por lo que en ocasiones no es diagnosticada correctamente (16).

Las diferentes formas clínicas de infecciones por *Nocardia* se observan en todo el mundo, sin embargo en las regiones de temperatura templada se observan infecciones causadas por *Nocardia asteroides*, mientras que en las regiones cálidas tropicales y subtropicales predominan las infecciones causadas por *Nocardia brasiliensis* (16). Las infecciones causadas por *Nocardia otitidiscaviarum* parecen no tener predilección geográfica.

### **1.3 Respuesta inmune.**

El estudio de la respuesta inmune en los individuos con infecciones causadas por *Nocardia*, demuestra que los mecanismos de resistencia inespecífica tienen un papel primordial en la protección contra estos

microorganismos (24). Las bacterias del género *Nocardia* son fácilmente fagocitadas, sin embargo su muerte depende de la virulencia y de las características de su pared celular (24). Las cepas virulentas de *N. asteroides* inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, disminuyendo la fosfatasa ácida lisosomal, lo que le permite crecer dentro de los macrófagos (25). Así mismo estas cepas producen y secretan una superóxido dismutasa y tienen niveles elevados de catalasa intracitoplasmática (26). Ambas enzimas protegen *in vitro* a las bacterias de la muerte producida por el estallido oxidativo fagolisosomal de los polimorfonucleares (26).

Con respecto a la respuesta inmune humoral, algunos estudios sugieren que los anticuerpos favorecen la infección por *Nocardia* (27). Para evaluar el papel de los linfocitos B en la resistencia a la infección, se infectaron ratones CBA/N (deficientes de linfocitos B) con *N. asteroides* y no se detectaron anticuerpos, a diferencia de la presencia de anticuerpos en los ratones normales. Posteriormente ambas cepas de ratones fueron retadas por segunda ocasión con *Nocardia asteroides* y se observó que los ratones que no producían anticuerpos eran más resistentes a la infección que los ratones normales. Además los estudios de inmunoprotección utilizando sueros inmunes no han tenido éxito hasta la fecha (28, 29, 30).

Recientemente, Salinas-Carmona y Pérez-Rivera describieron una respuesta IgM específica que se presenta a los 7 días postinfección; se observó que estos anticuerpos evitan el desarrollo de micetoma en un modelo

experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c. Esto sugiere fuertemente que los anticuerpos IgM son los efectores humorales responsables de la protección en contra de *N. brasiliensis* (31).

Se ha observado que existe un mayor riesgo de infecciones por *Nocardia* cuando existe deficiencia en la inmunidad mediada por células (16, 17). Se ha demostrado que los linfocitos T interactúan con subpoblaciones de linfocitos T y con macrófagos, para aumentar la capacidad microbicida de los macrófagos. Los ensayos de transferencia adoptiva de linfocitos T de ratones inmunizados con *Nocardia*, a ratones deficientes de células T, demostraron que después de la inyección intravenosa de *Nocardia* en estos últimos, hay una eliminación más rápida de las bacterias (17). En estudios realizados *in vitro*, los macrófagos activados, mostraron una mejor actividad microbicida cuando se incubaron con linfocitos T previamente sensibilizados con *Nocardia* (17, 32).

#### **1.4 Infecciones en humanos.**

A partir de los años noventa se ha observado un aparente incremento de las infecciones causadas por *Nocardia*. En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha reconocido con mayor frecuencia infecciones diseminadas por bacterias del género *Nocardia* (33, 34, 35, 36, 37, 38, 39). Es importante aclarar que más del 50% de los casos de infecciones por *Nocardia* se presentan en pacientes inmunocomprometidos (40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47), el 50%

restante se presentan en sujetos inmunocompetentes (48), observándose en la mayoría de los casos infecciones cutáneas (49) aunque éstas también se han reportado en pacientes inmunocomprometidos (50, 51).

Existe un número creciente de informes de casos de infecciones sistémicas causadas por *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*; la mayoría de estos casos se refieren a enfermos estudiados fuera de México. En el año 2000 en un hospital para enfermos con tuberculosis en la India, reportaron una prevalencia de nocardiosis pulmonar de 1.4%; sin embargo, el diagnóstico lo realizaron mediante pruebas de hipersensibilidad tardía para *Nocardia* (40).

En Japón, en el centro para la investigación de agentes patógenos, estudiaron infecciones causadas por *Nocardia* en el periodo 1991-2002 y encontraron que el 72.3% correspondían a *N. asteroides*; además reportaron que el principal factor predisponente fue el uso de terapia inmunosupresora y la edad de los pacientes, oscilaba entre los 61 y 80 años de edad (41). En adultos mayores también se ha reportado infección del sistema nervioso central por *Nocardia* asociada a otro agente patógeno, tal como *Aspergillus fumigatus* (42, 52).

En el norte de Italia, un grupo de investigadores, realizó un estudio retrospectivo que comprendió el periodo de 1982-992 y encontraron 30 casos de nocardiosis; el 83.3% de los casos fueron producidos por *N. asteroides* y 13.3% por *N. farcinica* (53). Además de inmunosupresión, encontraron como

factor predisponente importante enfermedad pulmonar previa con presencia de fibrosis pulmonar. El mismo grupo reportó 26 casos en el período 1993-1995; nuevamente *N. asteroides* ocupó el primer lugar causando el 69.2% de las infecciones, *N. farcinica* 19.2%, *N. nova* 7.6% y *N. brasiliensis* 3.8% (54).

En España, en el Hospital Ramón y Cajal, Pintado analizó la incidencia de infecciones por *Nocardia* en un periodo de 24 años (1978-2001) y encontró 34 casos (55). El 97% de estas infecciones fueron causadas por bacterias pertenecientes al complejo *Nocardia asteroides*. La infección pulmonar ocurrió en el 41% de los casos y el 85% tenían como antecedente inmunosupresión y/o enfermedad pulmonar.

En Chile, en el hospital Dr. Sotero del Río, reportaron en el año 1995, tres casos de Infección diseminada por *N. asteroides* en pacientes inmunocompetentes (56) y en 1996 un caso en un receptor de trasplante renal (57).

En México, solo hay un informe de infecciones sistémicas causadas por *Nocardia* en pacientes infectados por el VIH, estudio realizado en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Subirán". En este informe se describe un incremento en la frecuencia de infecciones por *Nocardia*; de 0.3% en el año 1985 a 1.8% en el año de 1989 (58).

En la infección sistémica por *Nocardia*, la localización pulmonar ocupa el primer lugar y se han reportado casos en pacientes con trasplante renal, pulmonar, cardíaco y de médula ósea (57, 59, 60, 61, 62, 63, 64). La infección pulmonar también se ha reportado en personas inmunocompetentes (65, 66).

Según el estudio de Canet, en pacientes con trasplante renal, existe un incremento en el número de infecciones por *Nocardia* cuando se introduce un nuevo agente inmunosupresor (43). En este estudio reportaron una incidencia de infecciones de 0.2 % en pacientes que recibieron ciclosporina A, a diferencia de 2% en pacientes que recibieron tacrolimus (43).

En cuanto a las infecciones del sistema nervioso central, el primer reporte de absceso cerebral se realizó en el año 1950, en un paciente de Texas (67), y el último reporte se hizo en Diciembre del 2004, en Turquía (68). En algunos reportes de los años sesentas, los abscesos cerebrales se presentaron en pacientes con infección primaria pulmonar y el agente etiológico reportado fue *N. asteroides* (69, 70, 71). En 1994, Mamelak analizó los 131 casos reportados desde 1950 a 1993, 11 de ellos estudiados por su grupo en un periodo de 23 años (72). Los hallazgos reportados fueron: edad promedio 42 años  $\pm$  15.1 años, relación varón:mujer 2.3:1, 34% recibían tratamiento inmunosupresor y sólo el 5% era seropositivo para el VIH.

Las infecciones de sistema nervioso central con frecuencia son confundidas con masas tumorales lo que retrasa el inicio del tratamiento apropiado (44). Además de los pacientes inmunosuprimidos, también se han reportado casos de infección en pacientes con inmunodeficiencia secundaria, tal como en personas diabéticas (41, 45).

Recientemente también se han reportado infecciones por *Nocardia* en sujetos jóvenes y/o sin afección inmunológica, siendo primordialmente infección localizada, sin embargo algunas de estas infecciones son de tipo sistémico (44, 73, 74, 75, 76, 77).

En la edad pediátrica, las infecciones por *Nocardia* son poco frecuentes y cuando se presentan lo hacen en niños con algún tipo de inmunodeficiencia primaria, como la enfermedad granulomatosa crónica (78, 79, 80) o en pacientes con enfermedad autoinmune (81). En el año 2000 se reportó el caso de una niña de 9 años, previamente sana, con neumonía y abscesos cerebrales por *Nocardia* (82) y en el año 2003, el de un lactante de 2 meses sin factores predisponentes, quien desarrollo nocardiosis diseminada (83).

Además de infecciones sistémicas graves, la infección por *Nocardia* se presenta como infección primaria cutánea y linfocutánea (84, 85, 86, 87). Algunas formas clínicas de infección menos frecuentes incluyen: meningitis, sinusitis esfenoidal, pericarditis, masa mediastinal, absceso de glándula mamaria, absceso renal e infección en la glándula tiroides (88, 89, 90, 91, 92,

93, 94, 95). En los últimos años, se ha reportado con mayor frecuencia infecciones a nivel ocular como: keratitis, úlcera corneal y escleritis (96, 97, 98, 99, 100, 101, 102).

### **1. 5 Diagnóstico.**

El diagnóstico etiológico de las infecciones causadas por microorganismos del género *Nocardia* es difícil. La determinación del agente etiológico se establece mediante varios exámenes de laboratorio tales como el examen microscópico directo que permite identificar los granos (103). Mediante el estudio histopatológico es posible en ocasiones hacer un diagnóstico del agente etiológico de acuerdo a su morfología y a sus características tintoriales (6). Sin embargo, para realizar el diagnóstico de micetoma actinomicótico por *Nocardia* se requiere un mínimo de tres semanas, ya que es necesario hacer un cultivo y realizar la caracterización bioquímica para la confirmación de este agente causal (104).

Se han realizado investigaciones con el objeto de mejorar la capacidad diagnóstica hacia *Nocardia*. La mayoría de los métodos desarrollados son inmunológicos, tanto serológicos como reacciones cutáneas (105, 106, 107, 108). El principal problema de la mayoría de estas pruebas es que no son específicas o su sensibilidad es baja. Probablemente las fallas en la especificidad de las pruebas se deben a que los antígenos utilizados no son los adecuados.

Diferentes investigadores, principalmente en Estados Unidos y Europa, han trabajado en el desarrollo de pruebas para diferenciar las especies del género *Nocardia* causantes de infección sistémica.

En 1990, Wallace evaluó 200 cultivos que previamente habían sido identificados como *N. asteroides*, y encontró que el 19% de estas bacterias presentaban resistencia a cefamandol y ceftriaxona y que concordaban con la cepa de referencia de *N. farcinica*, por lo que propuso utilizar el patrón de resistencia a antibióticos para la identificación de esta especie (109).

En 1994, Carson propuso la diferenciación de *N. farcinica* de *N. asteroides*, mediante la prueba de opacificación del medio Middlebrook 7H10 por *N. farcinica*, aunado a su capacidad de crecer a 45°C (110).

En 1995, Provost utilizó la actividad citotóxica contra *Nocardia*, de *Pichia mrakii* (K9) y *Pichia lynferdii* (K76), para diferenciar bacterias del complejo *N. asteroides* (111). *N. asteroides* fue identificada como K9+ K76-, *N. farcinica* K9- K76- y *N. nova* K9+ K76+.

Biehle propuso el uso de pruebas de hidrólisis de L-pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide (PYR), ya que solamente *Nocardia farcinica* y *Nocardia nova* hidrolizan PYR (112) .

A partir del año 1995, se reportaron técnicas de biología molecular para la identificación de bacterias del género *Nocardia* y para la diferenciación de especies. Steingrube, propuso la amplificación de DNA con análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), con lo que es posible diferenciar bacterias del género *Nocardia* de *Mycobacterium*; así como diferenciar algunas especies de *Nocardia*. Sin embargo, con esta metodología no es posible diferenciar entre las especies del complejo *N. asteroides* (113).

Workman en 1998, propuso utilizar la sensibilidad a antibióticos para identificar a *N. farcinica* y *N. nova*; sin embargo, esto también requiere de otras características, como propiedades de crecimiento, utilización de ramnosa y producción de acetamida (114).

En 1999, Laurent desarrolló una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de bacterias del género *Nocardia*. Utilizó como blanco el gen de rRNA 16S y logró diferenciar bacterias del género *Nocardia* de bacterias estrechamente relacionadas como *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Tsukamurella* (115).

En el año 2000, Conville evaluó la utilidad de la PCR y RFLPs sobre el rRNA 16S sin embargo solo fue posible la identificación del 85 % de las cepas estudiadas (116).

Recientemente en el año 2002, Kiska utilizó un grupo de pruebas para la identificación de especies de *Nocardia*, entre ellas sus patrones de sensibilidad a antibióticos, la utilización de citrato y acetamida como fuente de carbono y la asimilación de inositol y andonitol (117) pero esta batería de pruebas requiere por lo menos una semana.

A pesar de la gran cantidad de pruebas reportadas el diagnóstico de infección por *Nocardia* requiere de tiempo, además de que algunas de las pruebas se realizan solo en laboratorios de referencia.

En 1993 Salinas, reportó el uso de una técnica de ELISA para el diagnóstico de infecciones por *N. brasiliensis* (107) con una alta sensibilidad y especificidad; en esta prueba se utilizó como antígeno una proteína que había sido previamente identificada como inmunodominante tanto en humanos, conejos y ratones (118).

## **1.6 Justificación.**

En los últimos años han aumentado el número de casos de infección en el ser humano por bacterias del género *Nocardia*. Las infecciones sistémicas por estas bacterias tienen una mortandad del 50%, por lo que es necesario realizar el diagnóstico de forma oportuna. De acuerdo al antecedente del uso de antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis* como blanco para el desarrollo de una prueba diagnóstica, y la carencia hasta el momento de

métodos diagnósticos rápidos para otras especies del género *Nocardia*, consideramos importante identificar antígenos inmunodominantes que sean específicos. El conocer su secuencia aminoacídica permitirá en el futuro el desarrollo de un método para la identificación rápida y exacta de una de las especies, que con mayor frecuencia es causante de infección sistémica. Con esto se tendrá la posibilidad de diagnosticar oportunamente esta infección. Además, el conocer la especie causante de estas infecciones, le permitirá al clínico decidir el tratamiento antibiótico apropiado con lo que podrá disminuir la mortalidad causada por estas bacterias.

## HIPÓTESIS

*Nocardia asteroides sensu stricto, Nocardia nova y Nocardia farcinica* aunque bioquímicamente casi indistinguibles, tienen proteínas inmunogénicas diferentes que permiten distinguir individualmente a cada especie.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Identificar un antígeno inmunodominante de *Nocardia asteroides* y clonar el gen que lo codifica.

### Objetivos específicos:

1. Comparar el patrón de antígenos proteicos de *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*.
2. Identificar los antígenos inmunodominantes de *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*.
3. Comparar los antígenos inmunodominantes de ratones infectados e inmunizados con *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*.
4. Aislar un antígeno inmunodominante de *Nocardia asteroides*.
5. Determinar la secuencia aminoacídica N-terminal del antígeno seleccionado.
6. Clonar el gen del antígeno seleccionado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MICRORGANISMOS.

Se utilizaron 3 cepas de bacterias del género *Nocardia*, dos de ellas provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC Manassas, VA USA) *Nocardia farcinica* ATCC 3318 y *Nocardia nova* ATCC 33726. La cepa de *Nocardia asteroides* sensu stricto fue proporcionada por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla ([q.e.p.d] Facultad de Medicina, UANL. México).

### 2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES.

#### 2.1 Obtención del inóculo.

Para cada una de las cepas de las bacterias que crecieron en medio Sabouraud, se tomaron tres colonias y se inocularon en matraces Erlenmeyer (Pyrex) de 125 ml, con un volumen de 25 ml de medio infusión cerebro-corazón (BHI, Difco Laboratories Detroit, MI. USA) (119, 120, 121). Los cultivos se incubaron a 37°C en baño de agua con agitación (Dubnoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific) por 48 h. Las bacterias se recuperaron en tubos cónicos, se centrifugaron (Beckman TJ-6) a 450 x g por 5 min y la pastilla se lavó, con solución salina estéril al 0.85%, tres veces. Las

colonias se trituraron mecánicamente con un agitador de vidrio y se lavaron una vez más recuperando únicamente el sobrenadante que contenía las células disgregadas en suspensión. El sobrenadante obtenido se utilizó para inocular 2 matraces Erlenmeyer con 30 ml de BHI. Los cultivos se incubaron a 37°C en baño de agua con agitación durante 48 h. Las bacterias se recuperaron mediante centrifugación a 450 x g por 5 min y se lavaron 3 veces con solución salina. Finalmente las bacterias se homogeneizaron con un Potter-Elvehjem. El homogeneizado representa la suspensión unicelular o inóculo que fue utilizado para la obtención de los extractos y para infectar a ratones.

## 2.2 Obtención de los extractos celulares de bacterias del género *Nocardia*.

Se tomaron 0.4 ml de la suspensión celular obtenida previamente, y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 2 L con 150 ml de medio BHI. Estos cultivos se incubaron a 37°C sin agitación durante 7 días. La masa bacteriana se recuperó por filtración con un sistema de vacío utilizando un embudo Buchner y filtro Whatman (número 1), realizando 4 lavados con agua destilada estéril. La masa bacteriana obtenida se deslipidizó con mezclas de etanol-éter etílico 1:1, 1:2, 1:3 varias veces hasta eliminar el color de la misma. Se eliminó la solución de etanol-éter y se dejó secando durante 12 h (28). La masa bacteriana seca se trituró en forma mecánica con polvo de vidrio (Pyrex) y se resuspendió en solución amortiguadora Tris-HCl 0.01 M, pH 7.4, con acetato de magnesio 0.01M, en una proporción de 10% p/v y se dejó en agitación

constante a 4°C durante 12 h. El polvo de vidrio se eliminó mediante centrifugación a 1800 x g durante 15 min (Beckman TJ-6). Para obtener cada uno de los extractos de *Nocardia*, el sobrenadante se filtró con membrana millipore de 0.45 µm y sistema de vacío. El sobrenadante filtrado se dializó durante 24 h contra agua destilada, en una membrana de diálisis con un poro de exclusión molecular de 12-14000 daltones (250-9U SIGMA, St. Louis MO). El dializado se separó en alícuotas y se liofilizó, dejando una alícuota para la determinación de proteínas. El liofilizado se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (122). Este extracto celular se utilizó como antígeno para inmunizar a los ratones y para la determinación de anticuerpos, mediante la técnica de Western-blot. Este procedimiento se realizó con cada una de las tres especies. El extracto celular se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (120, 121).

### **3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.**

La determinación de proteínas se realizó mediante la elaboración de una curva de calibración, realizada con una solución estándar de albumina sérica bovina (1 mg/ml). Las soluciones estándar se prepararon a una concentración entre 2 y 18 µg/ml. A la muestra diluida (0.25 ml) se le agregaron 0.25 ml del reactivo de Bradford (6 mg de azul de Coomassie G-250 en 100 ml de ácido perclórico al 3% v/v en agua destilada) y se dejó incubar a temperatura

ambiente por 25 minutos, posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro DU 7500 (Beckman Instruments, Fullerton CA).

#### 4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LOS EXTRACTOS CELULARES.

4.1 Análisis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), de los extractos celulares de *N. asteroides sensu stricto*, *N. farcinica* y *N. nova*.

El análisis de los componentes de los tres extractos se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% T con dodecilsulfato de sodio. Se utilizó el sistema de amortiguador discontinuo de Laemmli (123) con un gel de empaquetamiento de 4% T. El gel se preparó de la siguiente manera:

##### GEL DE CORRIMIENTO

Concentración (% T):	12%
Acrilamida-Bisacrilamida (30% T, 2.7% C)	2.0 ml
Amortiguador Tris-HCl 3M, pH 8.8	1.25 ml
Agua tridestilada	1.7 ml
Laurilsulfato de sodio 20% (Sodium Dodecyl Sulfato SDS)	0.025 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.025 ml
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED)	0.002 ml
<b>Volumen Total:</b>	<b>5.002 ml</b>

La mezcla se aplicó con una pipeta serológica a un mini cassette (Bio-Rad Laboratories, Richmond CA) de 10x10 cm, con espaciadores de 0.75 mm. Al terminar de aplicar la mezcla, se colocó una capa de agua para evitar el contacto de la acrilamida con el aire. Después de que el gel se polimerizó, se eliminó la capa de agua y se secó con papel filtro. Enseguida se colocó un peine de teflón para formar los carriles de las muestras, con una pipeta Pasteur se aplicó el gel concentrador, que se preparó de la siguiente manera:

#### GEL CONCENTRADOR AL 4% T.

Acrilamida-bisacrilamida (30% T, 2.7% C)	0.167 ml
Amortiguador Tris-HCl 1M, pH 6.8	0.312 ml
Agua tridestilada	0.768 ml
SDS al 20%	0.006 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.006 ml
TEMED	0.003 ml
	<hr/>
Volumen Total:	1.262 ml

Cuando el gel concentrador polimerizó, se quitó el peine y se cubrieron los carriles con amortiguador de electroforesis trizma-base 25 mM, glicina 192 mM, con SDS al 0.1%, pH 8.3. El cassette se insertó en la cámara de electroforesis y se realizó un pre-corrimento a 50 volts (v) durante 30 min. Cada antígeno (extractos de *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*) se mezcló, con amortiguador de muestra (SDS al 10%, 2-mercaptoetanol al 10% v/v, glicerol al 50% en buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 y 0.2% de azul

de bromofenol como indicador del frente de iones) y se calentaron en baño de agua en ebullición durante 2 min. Posteriormente los antígenos se aplicaron al gel, así como los estándares de peso molecular conocido (Dalton Mark VIII SIGMA) preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La electroforesis se inició a un voltaje de 80 v hasta que el indicador alcanzó el gel de corrimiento. En ese momento el voltaje se aumentó a 150 v hasta que el colorante llegó al extremo inferior del gel. El gel se tiñó con nitrato de plata y/o con azul de Coomassie como se describe a continuación.

#### 4.2 Tinción con nitrato de plata.

El gel obtenido después de la electroforesis, se colocó en solución de metanol al 50% y ácido acético al 12%, durante 20 min. El SDS se eliminó del gel, realizando tres lavados, de 10 min cada uno, con solución de etanol al 10% y ácido acético al 5%. El gel se transfirió a solución oxidante de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$  3.4 mM,  $HNO_3$  3.22 mM) durante 5 min. El oxidante se eliminó, mediante tres lavados de 10 min c/u, con agua tridestilada. Posteriormente el gel se incubó con solución de nitrato de plata ( $AgNO_3$  12 mM) durante 30 min, los primeros 5 min bajo luz intensa. Las bandas se hicieron evidentes, mediante el uso de solución reveladora ( $Na_2CO_3$  280 mM con 0.5 ml de formaldehído concentrado por litro de solución). Una vez que se observaron las bandas, la reacción se detuvo con ácido acético al 1%.

#### 4.3 Tinción con azul de Coomassie.

Después de cada corrimiento el gel se colocó durante 30 min en una solución de azul de Coomassie (R-250 SIGMA) al 0.1%, en metanol al 40% y

ácido acético al 10% y se destiló con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10%.

## **5. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DE *N. asteroides*, *N. farcinica* Y *N. nova* EN RATONES BALB/c.**

### **5.1 Animales.**

Se utilizaron 5 ratones BALB/c machos de 8-12 semanas de edad y un peso de 25-30 gramos. Los ratones se mantuvieron en cajas de acrílico, a una temperatura entre 16 a 20°C, se alimentaron con nutricubos (Purina México S.A. de C.V.) y agua destilada estéril *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL. Esta cepa se derivó de la cepa original de los Institutos Nacionales de Salud (NIH Bethesda, MD EUA).

### **5.2 Identificación de antígenos inmunodominantes de *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova* en ratones BALB/c inmunizados.**

Se formaron 3 grupos de 5 ratones c/u.

Grupo 1: Ratones BALB/c que se inmunizaron con extracto celular de *N. asteroides* sensu estricto.

Grupo 2: Ratones BALB/c que se inmunizaron con extracto celular de *N. farcinica*.

Grupo 3: Ratones BALB/c que se inmunizaron con extracto celular de *N. nova*.

### 5.2.1 Antígenos.

Se utilizaron como antígenos los extractos celulares de cada una de las cepas de *Nocardia*. Los antígenos para las tres primeras inmunizaciones se prepararon en forma de emulsión con 50% de adyuvante incompleto de Freund (SIGMA) y el otro 50% con solución salina 0.85%.

### 5.2.2 Esquema de inmunización.

Se utilizó el siguiente esquema de inmunización, aplicando un total de 3 inmunizaciones:

a) Primo-inmunización. A cada ratón se le administraron 30  $\mu$ g del extracto celular de *Nocardia*, por vía subcutánea (sc) 50  $\mu$ l en cada cojinete plantar posterior (Tiempo 0).

b) Primer reinmunización. Quince días después de la primo-inmunización, se aplicó a cada ratón 15  $\mu$ g del extracto celular, sc, 50 $\mu$ l en cada cojinete plantar posterior.

c) Segunda reinmunización. Treinta días después del tiempo 0, a cada ratón se le aplicaron 10 µg del extracto celular, por vía sc, 50µl en cada cojinete plantar posterior.

### 5.3 Identificación de antígenos inmunodominantes de *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova* en ratones BALB/c infectados.

Se formaron 3 grupos de 5 ratones c/u.

Grupo 4: Ratones BALB/c inoculados con *N.asteroides*.

Grupo 5: Ratones BALB/c inoculados con *N. farcinica*.

Grupo 6: Ratones BALB/c inoculados con *N. nova*.

#### 5.3.1 Inóculos.

Se utilizaron como inóculos, la suspensión bacteriana obtenida de cada una de las cepas. La cantidad de bacterias se determinó mediante unidades formadoras de colonias por el micrométodo de Miles y Misra (124).

#### 5.3.2 Esquema de infección.

Los ratones de los grupos 4 a 6 recibieron dos dosis de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC), de la bacteria correspondiente, en un volumen

de 0.1 ml por vía sc, en el dorso. La segunda dosis se administró 15 días después de la primera.

Los ratones se sangraron del plexo venoso retroorbitario, antes de la primoinmunización o inoculación y a los 15, 30, 45 y 60 días. Los sueros obtenidos (100-150  $\mu$ l por animal) se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## **6. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES MEDIANTE WESTER BLOT.**

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, con un gel de concentración al 4% y con un peine de 7.5 cm. Se aplicaron 50  $\mu$ g de antígeno (extracto celular) por cada 0.8 cm de gel. La electroforesis se realizó en las condiciones descritas. Al terminar la electroforesis, las proteínas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa con un poro de 0.45  $\mu$ m. Para la transferencia se utilizó solución amortiguadora trizma-base 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 con 20% de metanol. Para las transferencias se utilizaron las cámaras Mini Trans Blot II y Trans Blot (Bio-Rad Laboratories). La transferencia de las proteínas se realizó mediante la aplicación de voltaje constante a 100 v durante 90 min. Al terminar la transferencia, el papel se bloqueó con leche descremada (Svelty, Nestle) al 3% en PBS durante una h a 37°C. El papel se lavó, con leche descremada al 0.3% en PBS-Tween 20 1:1000 (solución de lavado), y se cortó en tiras de 0.4 cm. Las tiras se incubaron durante 12 h a 4°C, con los sueros

de ratón diluidos 1:75 en leche descremada 1.5% en PBS con Tween 20 1:1000, se realizaron 6 lavados de 5 min c/u y posteriormente las tiras se incubaron con anticuerpos anti-inmunoglobulinas conjugados con peroxidasa, a las diluciones recomendadas por el fabricante. El conjugado se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de esta incubación se realizaron 6 lavados. Finalmente las tiras se colocaron en la solución sustrato (3,3',-diaminobencidina [tetraclorohidrato] al 0.05% en PBS) la que se activó con peróxido de hidrógeno (40 µl de la solución al 30% por cada 20 ml de solución de aminobencidina). La reacción se detuvo con HCl 5N al aparecer las bandas (125).

## **7. AISLAMIENTO DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE *N. asteroides*.**

7.1 *Electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio.*

Se prepararon geles preparativos (14.2 x 10 x 0.3 cm) de poliacrilamida al 12% de T, 4% C. La electroforesis se realizó de la misma manera que con los geles analíticos (126). Se aplicaron 3 mg del extracto celular de *N. asteroides*.

## 7.2 Identificación del antígeno inmunodominante.

Una vez concluida la electroforesis del gel preparativo, se cortaron verticalmente el extremo izquierdo y derecho para realizar la tinción de Coomassie, durante este tiempo, el resto del gel se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar la difusión de las proteínas. Una vez teñido el gel, se determinó el sitio de migración electroforética de la proteína de interés (antígeno inmunodominante) (28).

## 7.3 Electroelución del antígeno inmunodominante.

Una vez determinado el sitio de migración del antígeno inmunodominante en el gel preparativo, se cortó la banda correspondiente con una hoja de bisturí. El gel se fragmentó en trozos pequeños y los fragmentos se colocaron en una cámara de electroelución modelo 422 (Bio-Rad Laboratories) utilizando una membrana de diálisis con poro de exclusión de 10-kDa como barrera de retención. El amortiguador de elución utilizado fue Tris-HCL 25 mM, glicina 0.12 M, pH 8.3. La electroelución se llevó a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ , aplicando 10 mA por 2.5 h. Al finalizar la electroelución, se retiró la solución amortiguadora, las muestras se colectaron y se dejaron dializando a  $4^{\circ}\text{C}$  por 12 h contra agua destilada y se liofilizó (28).

## **8. TRANSFERENCIA DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE A MEMBRANA POLYVINYLIDENE DIFLUORIDE (PVDF).**

8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes.

La muestra liofilizada se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua bidestilada y se le agregaron 60  $\mu$ l de amortiguador de muestra 4 X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% p/v, 2-mercaptoetanol 10% v/v, sacarosa al 50% p/v, con azul de bromofenol como indicador de frente de corrida). Se sometió a ebullición durante 2 m. Se preparó un gel analítico y la electroforesis se realizó como se describió previamente (inciso 4.1).

8.2 Transferencia del antígeno inmunodominante a membrana de PVDF.

Al terminar la electroforesis, la proteína se transfirió del gel a la membrana de PVDF (immobilon-P<sup>sq</sup> Millipore Corporation, Bedford, MA). Para la transferencia se utilizó como amortiguador 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid 10 mM, 10% de Metanol, pH 11 (CAPS) además de la cámara Trans Blot (Bio-Rad Laboratories). La transferencia de la proteína se realizó a 4°C con aplicación de voltaje constante a 100 v durante 2 h. Al terminar la transferencia, la membrana se lavó durante 5 min con agua desionizada.

### 8.3 Tinción de la membrana de PVDF con azul de Coomassie.

Después del lavado con agua desionizada, la membrana se colocó 30 segundos en metanol al 100%. Posteriormente se colocó durante 5 min en una solución de azul de Coomassie (R-250 SIGMA) al 0.1% en metanol al 40% y ácido acético al 10%. Finalmente la membrana se destiñó durante 5 min, con metanol al 50%. La banda teñida, se cortó y se colocó en un tubo de polipropileno.

## 9. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA N-terminal DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE.

La proteína aislada y transferida a membrana de PVDF fue enviada al Biothecnology Laboratory, The University of British Columbia, Vancouver BC Canadá. En este laboratorio se determinó la secuencia amino-terminal del antígeno inmunodominante seleccionado. La secuencia fue determinada con el sistema Applied Biosystems, este sistema se basa en el método de Edman y esta equipado con un cromatógrafo de líquidos de alta resolución más un sistema de análisis de datos. La separación y el análisis de la secuencia aminoterminal se realizó mediante la derivatización de los aminoácidos en una columna de afinidad de fase estacionaria RT-PTH-C18.

## 10. CLONACIÓN DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE *N. asteroides*.

### 10.1 Obtención de DNA genómico de *N. asteroides*.

Para la extracción de DNA se utilizó una modificación a la técnica descrita por Sambrook y Russell (127). Se preparó una suspensión bacteriana como se describió previamente eliminando por completo la solución salina. Se tomaron 30 µg del botón celular, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200 µl de solución de lisis TSNT (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). A esta mezcla se adicionaron 200 µl de fenol saturado pH 8.0 y 200 µl de cloroformo. El tubo se agitó con vortex hasta su completa homogenización y se dejó a temperatura ambiente (TA) durante 2 min. Se agregaron 200 µl de TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDT. : pH 8.0), se agitó con vortex y se centrifugó a 4 000 x g durante 5 min a TA. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 200 µl de cloroformo. Se agitó con vortex durante 30 segundos y se centrifugó a 4 000 x g durante 2 min. Nuevamente la fase acuosa se transfirió a un tubo, se agregó 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión. La muestra se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min a 4°C. Al terminar la centrifugación, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur. La pastilla precipitada se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 10 000 x g durante 10 minutos a 4°C. El etanol se retiró con pipeta Pasteur y el remanente se dejó secar, con el el tubo abierto a TA por 1 h. La pastilla de DNA se resuspendió en 20 µl de

amortiguador TE. La integridad y calidad del DNA se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa como se describe más adelante.

### 10.2 Diseño de iniciadores.

Con el uso de programas computacionales OLIGO y Amplify, se diseñaron y ensayaron virtualmente iniciadores específicos para el antígeno inmunodominante seleccionado, de acuerdo a las secuencias reportadas de esta proteína en bacterias de géneros relacionados.

### 10.3 Estandarización de la técnica de PCR.

Se realizaron diferentes ensayos de la PCR para determinar las concentraciones óptimas de DNA, magnesio y temperatura de alineamiento para obtener el menor número de productos inespecíficos. Las condiciones óptimas de la PCR se describen a continuación en la tabla I.

Tabla I. Condiciones de la PCR.

Reactivo	Concentración Final
Amortiguador 10X	1 X
Amplificador 10X	1 X
dNTPs 10 mM	200 $\mu$ M
Iniciador 5'	0.5 $\mu$ M
Iniciador 3'	0.5 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 mM
Taq DNA polimerasa	0.2 U/ $\mu$ l
DNAg	100 ng/25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O milliQ cbp	25 $\mu$ l

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, la PCR se realizó en 35 ciclos que incluyeron: un paso de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, un paso de alineamiento a 60°C por 30 segundos y un paso de extensión a 72°C por 1 min. El producto amplificado (PA) se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

#### 10.4 Electroforesis en geles de agarosa.

Los geles se prepararon a la concentración de agarosa requerida en amortiguador TBE (Tris-Borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, pH 8.5). Una vez solidificado, el gel se colocó en una cámara de electroforesis y se cubrió con amortiguador TBE. Las muestras se mezclaron con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25%, glicerol 30%) en una relación 5:1

(v/v). La electroforesis se llevó a cabo a 100 v. Al concluir la electroforesis, el gel se colocó en solución de bromuro de etidio (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 10 min. Posteriormente, el gel se lavó varias veces con agua corriente para eliminar el exceso de bromuro y proceder a su observación.

## 10.5 Clonación del producto amplificado en vector T.

### 10.5.1 Preparación del vector T.

Para preparar el vector T se utilizó el vector pBS-SK II (128). Este vector circular se linearizó con *Eco* RV, la cual deja extremos romos. Las condiciones de reacción se indican en la tabla II.

Tabla II. Digestión de pBS-SK II con *Eco* RV

Reactivos	Concentración Final
Amortiguador 2 NEB, 10X	1 X
BSA, 10 mM	0.1 mM
<i>Eco</i> RV	1 U/ $\mu\text{l}$
DNA pBS-SK II, 300 ng/ $\mu\text{l}$	50 ng/ $\mu\text{l}$
Volumen final	10 $\mu\text{l}$

La reacción se incubó a 37°C durante 12 h y la digestión total se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente se agregó una timidina en cada extremo 3' del fragmento, utilizando las condiciones de reacción descritas en la tabla III.

Tabla III. Condiciones de reacción para la preparación del vector T.

Reactivos	Conc. final
Amortiguador de Taq 10X	1 X
dTTP 10 mM	2 mM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 mM
DNA 50 ng/μl	10 ng/μl
Volumen final	50 μl

Se adicionó una gota de aceite al tubo y se incubó durante 2 h a 72°C en un termociclador (Perkin Elmer). Al terminar el periodo de incubación, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se realizó una extracción con un volumen de fenol:cloroformo. Se centrifugó durante 2 min a 4 000 x g y se recuperó la fase acuosa. El DNA se precipitó con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol al 100%. El tubo se colocó a -70°C por una h y se centrifugó a 12 000 x g durante 15 min a 4°C, se eliminó el etanol y la pastilla se lavó con etanol al 70%, se realizó una segunda centrifugación, se retiró el sobrenadante. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y el DNA se resuspendió en 5 μl de H<sub>2</sub>O ultrapura.

### 10.5.2 Ligación del vector T y el producto amplificado para formar el vector recombinante.

Una vez obtenido el vector T se realizó la reacción de ligación para formar el vector recombinante, utilizando las condiciones descritas en la tabla IV.

Tabla IV. Condiciones de ligación

Reactivos	Concentración Final	
Amortiguador 10X	1	X
ATP 10 mM	1	mM
T4 DNA Ligasa 1 U/ $\mu$ l	0.1	U/ $\mu$ l
Vector T	10	ng/ $\mu$ l
Producto amplificado	30	ng/ $\mu$ l
Volumen final	50	$\mu$ l

La reacción de ligación se incubó a 16°C durante toda la noche. Al finalizar la reacción se realizó la precipitación de los ácido nucleicos con 0.1 volumen de acetato de sodio 3.0M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. El tubo se colocó a -70°C, durante 1 h y posteriormente se centrifugó a 10 000 x g durante 20 min a 4°C. El etanol se eliminó con pipeta Pasteur, la pastilla se lavó con 1ml de etanol al 70%, se centrifugó a 10 000 x g durante 15 min a 4°C se retiró el sobrenadante. El remanente se dejó secar y se resuspendió en 5  $\mu$ l agua milliQ estéril.

### 10.5.3 Transformación de células *E. coli*.

Para la transformación se utilizó la cepa TOP 10 de *E. coli*, y se transformaron mediante la técnica de bacterias  $\text{Ca}^{++}$  competentes (127). Las bacterias transformadas, con el vector recombinante, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en placas de Petri con medio Luria-Bertani-agar (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1.5% de agar) suplementado con ampicilina ( $50\ \mu\text{g/ml}$ ), X-Gal e IPTG, durante un periodo de 18 h.

### 10.5.4 Caracterización de las clonas recombinantes.

Las bacterias de *E. coli* que recibieron un vector recombinante, se seleccionaron por su fenotipo  $\text{Amp}^r$ ,  $\beta\text{gal}^+$ , crecen como colonias blancas ante la presencia de IPTG y X-Gal (127). Las colonias blancas se recuperaron y se cultivaron en tubos de ensayo con 4 ml de medio Luria-Bertani (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl) suplementado con ampicilina ( $50\ \mu\text{g/ml}$ ) e incubadas en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 h y con agitación vigorosa.

### 10.5.5 Obtención del DNA plasmídico.

La obtención de DNA plasmídico se realizó mediante la técnica de minipreparaciones por lisis alcalina (127). Dos ml del cultivo, de cada tubo de ensayo se transfirieron a tubos Eppendorf. Estos tubos se centrifugaron

durante 30 segundos a 13 000 x g a TA y se descartó el sobrenadante. A cada tubo se agregaron 100 ml de solución I (50 mM glucosa, 25mM Tris-HCL, 10 mM de EDTA, pH 8.0) y se agitó por 30 segundos en vortex. La mezcla se incubó a 4°C durante 5 min, después se adicionaron 200 µl de solución II recién preparada (0.2N NaOH, 1% [p/v] SDS), se mezcló por inversión y los tubos se incubaron a 4°C durante 5 min. Se agregaron 150 µl de solución III (90 µl acetato de potasio 5M, 17.25 µl ácido acético glacial y 42.75 µl agua destilada), se mezcló por inversión y se incubaron a 4°C, 5 min. Los tubos se centrifugaron a 13 000 x g a TA, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos. Finalmente se realizó una extracción fenol/sevag y precipitación con etanol como se describió para la extracción de DNA genómico.

#### 10.5.6 Análisis de los plásmidos recombinantes.

Los DNAs plasmídicos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Los DNAs que presentaron una migración retrasada respecto al plásmido control (sin inserto) fueron seleccionados como posibles candidatos. Una pequeña alícuota de los DNAs seleccionados fue digerida con la enzima de restricción *EcoRI* la cual libera el inserto. Posteriormente se realizó la electroforesis del producto de digestión para evidenciar el tamaño del inserto. Se seleccionaron aquellas clonas que presentaron un inserto con el tamaño esperado.

## 11. DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.

Para determinar la secuencia nucleotídica, el producto amplificado y una clona se enviaron al DNA Core Facility, Health Canada Science Centre for Human and Health, Winnipeg Canadá. La secuencia nucleotídica se determinó por el método de Sanger, con un secuenciador automatizado (3130 DNA Analyzer for Sequencing, Applied Biosystems).

Una vez obtenida la secuencia se comparó con las otras secuencias reportadas en el GenBank mediante el uso del programa Blast. A partir de la secuencia nucleotídica, se dedujo la secuencia aminoacídica. Esta misma secuencia se alineó con las secuencias reportadas para *Mycobacterium*, y *N. farcinica*.

## RESULTADOS

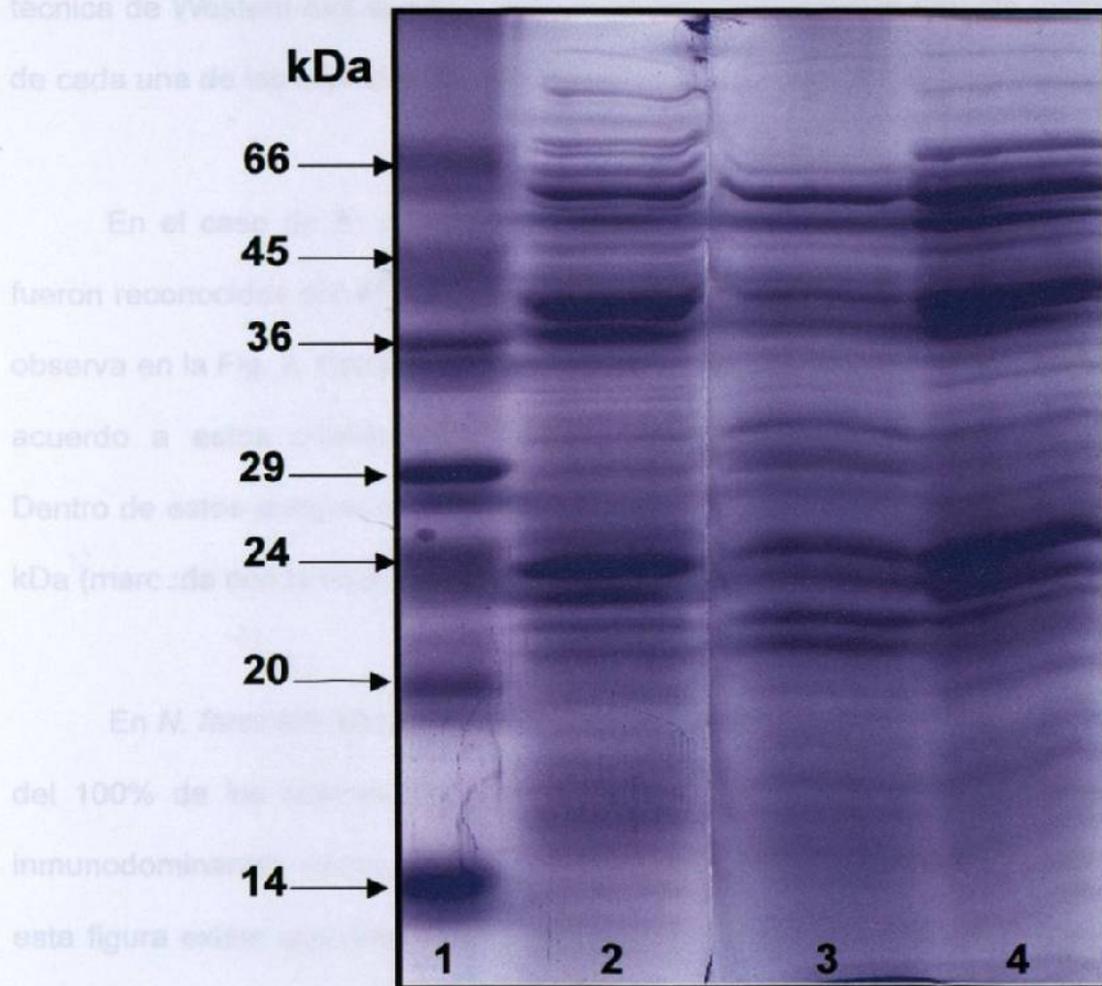
### 1. RENDIMIENTO DEL EXTRACTO CELULAR DE *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*.

Cada lote de cultivo de las especies de *Nocardia* en medio BHI, se obtuvo a partir de 6 L de medio. Del cultivo de *N. asteroides*, se obtuvieron 17.9 g de masa seca, el rendimiento obtenido de extracto celular fue de 190 mg de proteína total. De *N. farcinica*, la masa seca fue de 11.9 g y un rendimiento de extracto celular de 59.9 mg. En el caso de *N. nova*, se obtuvieron 11 g de masa seca y 57 mg de extracto celular.

### 2. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS CELULARES EN SDS-PAGE.

Se determinó la composición de cada uno de los extractos celulares obtenidos. En la Fig. 1, se muestra el patrón electroforético de los extractos celulares en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes. Observamos que los extractos están constituidos por una serie de bandas (35 a 40 aproximadamente) entre los marcadores de 66-kDa y 14-kDa. En el caso del extracto de *N. asteroides*, observamos cuatro proteínas intensamente teñidas; una de ellas con un peso molecular de aproximadamente 36-kDa. En *N. farcinica*, también observamos cuatro proteínas intensamente teñidas entre

20 y 24-kDa y una proteína de aproximadamente 61-kDa. Para *N. nova* las proteínas más abundantes se encuentran por arriba de los 36-kDa.



**Figura 1. Patrón electroforético de los extractos celulares de *Nocardia*.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. 1; Marcadores de peso molecular, 2; *N. asteroides*. 3; *N. farcinica*. 4; *N. nova*. Tinción con azul de Coomassie.

proteínas de peso

### 3. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES EN SUERO DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS.

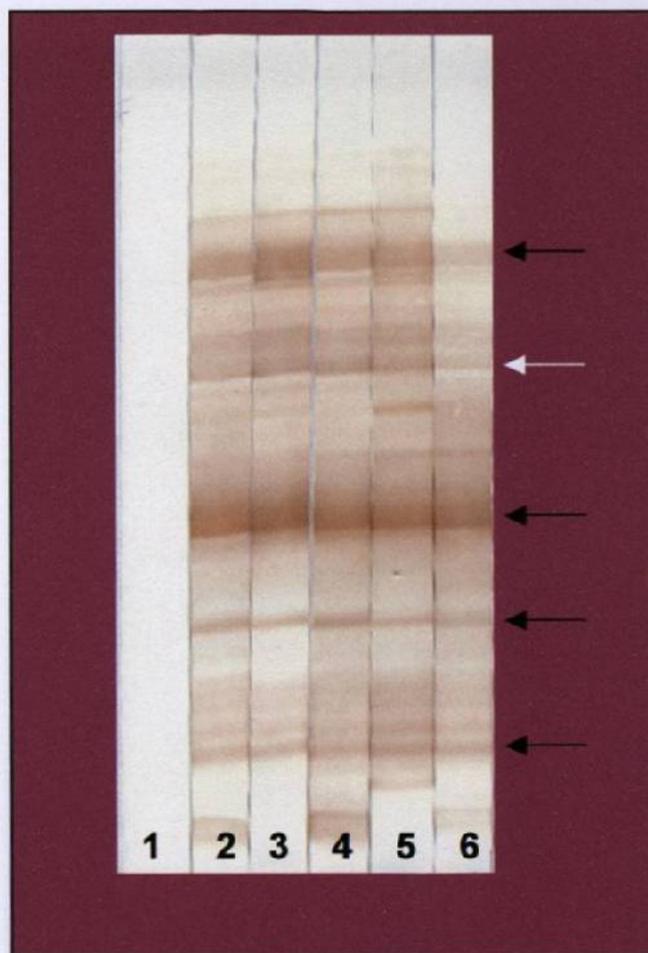
La identificación de antígenos inmunodominantes se realizó mediante la técnica de Western-blot con el suero de ratones inmunizados con los extractos de cada una de las especies de *Nocardia*.

En el caso de *N. asteroides*, identificamos al menos 5 antígenos que fueron reconocidos por el suero del 100% de los ratones inmunizados como se observa en la Fig. 2. Estos antígenos fueron reconocidos más intensamente, de acuerdo a estos criterios son considerados antígenos inmunodominantes. Dentro de estos antígenos se encuentra una proteína de aproximadamente 36-kDa (marcada con la flecha blanca).

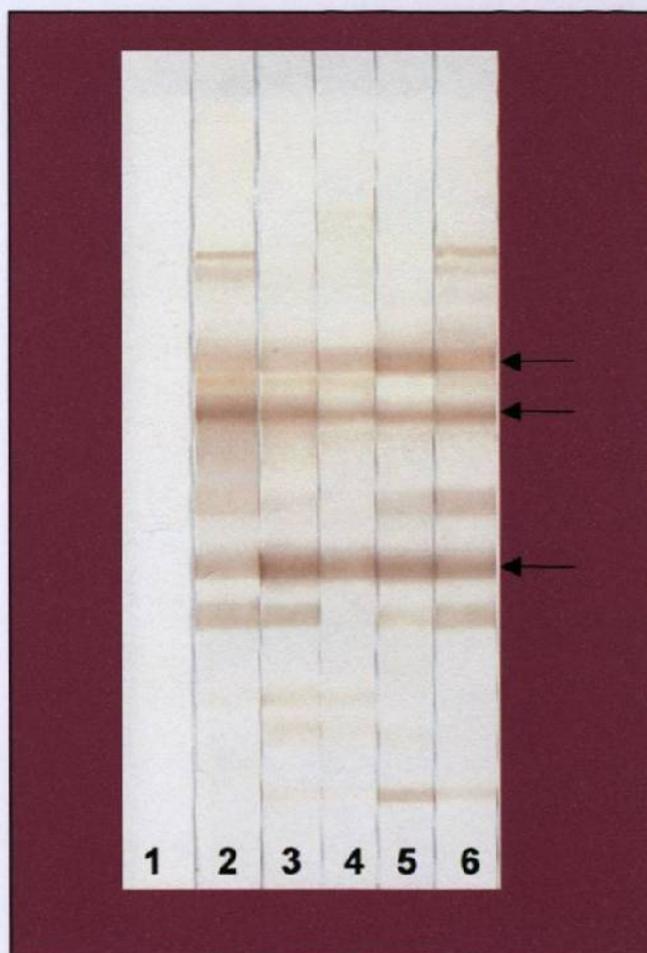
En *N. farcinica*, identificamos 3 antígenos que reaccionaron con el suero del 100% de los ratones inmunizados (Fig. 3). Ninguno de estos antígenos inmunodominantes corresponde a la proteína de 36-kDa. Como se observa en esta figura existe una gran diferencia en la capacidad de inducir producción de anticuerpos del extracto de *N. farcinica*, de acuerdo a las condiciones utilizadas en este trabajo.

En la Fig. 4, observamos el Western blot con extracto de *N. nova* donde identificamos 3 antígenos inmunodominantes. A pesar de la presencia de proteínas de peso molecular mayor a 29-kDa en el extracto celular (Fig 1), los

antígenos inmunodominantes identificados con el suero de los ratones inmunizados, se encuentran por debajo de 29-kDa y además se observa un barrido sin definición de bandas.



**Figura 2. Respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados con extracto de *N. asteroides*.** Inmunoelectrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. asteroides*. Carril 1; suero de ratón no inmune. Carriles 2 a 6; suero de ratones inmunizados con extracto de *N. asteroides*. Las flechas señalan los antígenos inmunodominantes, la flecha en blanco indica al antígeno inmunodominante de 36-kDa.



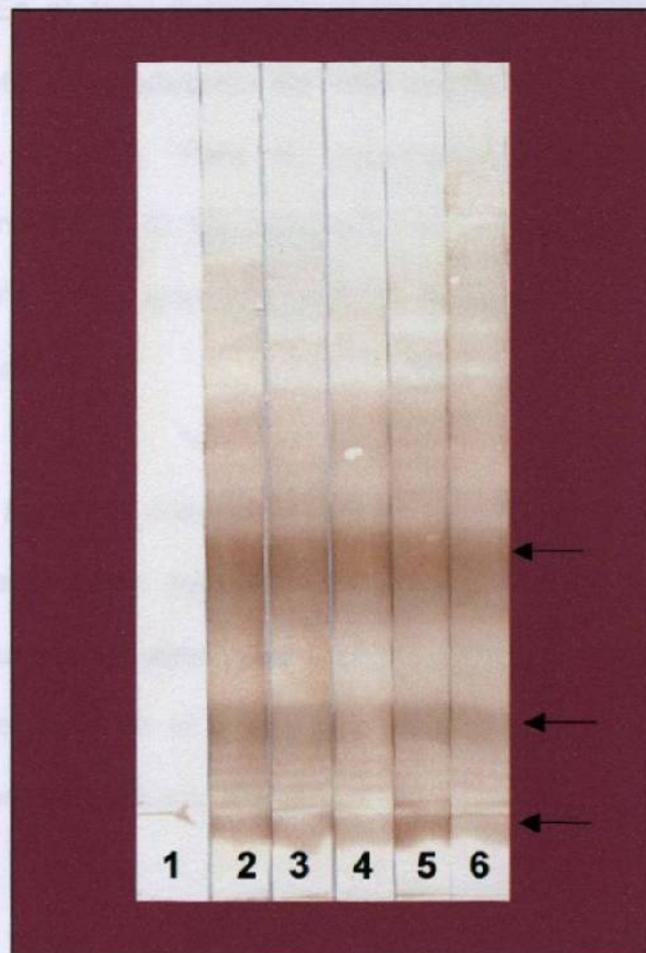
**Figura 3. Respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados con extracto de *N. farcinica*.** Inmunoelctrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. farcinica*. Carril 1; suero de ratón no inmune. Carriles 2 a 6; suero de ratones inmunizados con extracto de *N. farcinica*. Las flechas señalan los antígenos inmunodominantes.

#### 4. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES EN SUERO DE RATONES BALB/c INFECTADOS

Esta identificación se realizó mediante el método de Western-blot, analizando el suero de ratones infectados con cada una de las especies de *Nocardia*. En el Western-blot se evidencia la pobre respuesta inmune de los ratones infectados con las especies de *Nocardia* (Fig. 4). Los antígenos inmunodominantes en el suero del ratón infectado con *N. nova* se señalan con la flecha blanca.

Para *N. nova* se observó una respuesta inmune débil. Los ratones infectados presentan una respuesta inmune débil a los antígenos inmunodominantes. La reacción, a diferencia de los ratones inmunizados con *N. nova*, es débil.

En el Western-blot se evidencian los antígenos inmunodominantes que fueron reconocidos por el suero de ratones infectados, como se puede observar en el Western-blot.



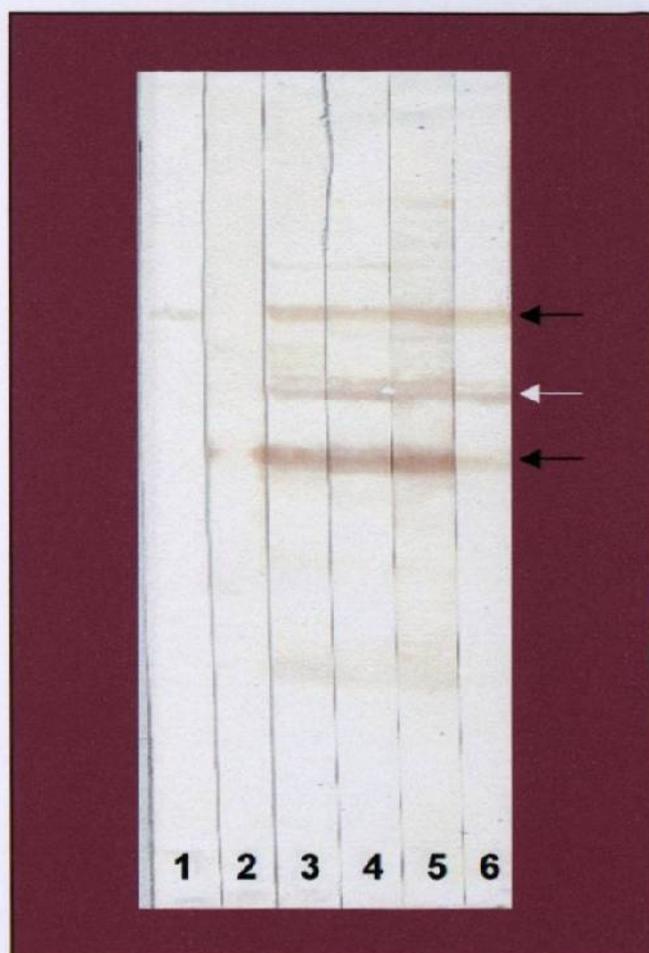
**Figura 4. Respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados con extracto de *N. nova*.** Inmunoelctrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. nova*. Carril 1; suero de ratón no inmune. Carriles 2 a 6; suero de ratones inmunizados con extracto de *N. nova*. Las flechas señalan los antígenos inmunodominantes.

#### 4. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES EN SUERO DE RATONES BALB/c INFECTADOS.

Esta identificación también se realizó mediante la técnica de Western-blot, analizando el suero de ratones infectados con cada una de las especies de *Nocardia*. En el caso del suero de los ratones infectados, es evidente la pobre respuesta de producción de anticuerpos contra las tres especies de *Nocardia* (Fig. 5 a 7). Para *N. asteroides*, observamos tres antígenos inmunodominantes (Fig. 5). Sin embargo, uno de los antígenos reconocidos por el suero del 80% de los ratones infectados es la proteína de 36-kDa (marcada con la flecha blanca).

Para *N. farcinica*, observamos en la Fig. 6 que el suero de los ratones infectados presentó una respuesta heterogénea. Aunque identificamos tres antígenos inmunodominantes, cada suero presenta diferente intensidad de reacción, a diferencia de lo observado en el caso del suero de los ratones inmunizados con este extracto (Fig. 3).

En el caso de *N. nova* solo identificamos dos antígenos inmunodominantes que fueron reconocidos por el suero del 80% de los ratones infectados, como se puede observar en la Fig. 7. Los antígenos reconocidos por el suero de los ratones infectados se encuentran por arriba de 29-kDa a diferencia de los antígenos reconocidos por ratones inmunizados.



**Figura 5. Respuesta de anticuerpos en ratones infectados con *N. asteroides*.** Inmunoelctrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. asteroides*. Carril 1; suero de ratón no inmune. Carriles 2 a 6; suero de ratones infectados con *N. asteroides*. Las flechas señalan los antígenos inmunodominantes, la flecha en blanco indica al antígeno inmunodominante de 36-kDa.



**Figura 6. Respuesta de anticuerpos en ratones infectados con *N. farcinica*.** Inmunoelctrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. farcinica*. Carril 1; suero de ratón no inmune. Carriles 2 a 6; suero de ratones infectados con *N. farcinica*. Las flechas señalan los antígenos inmunodominantes.

## 5. SELECCIÓN DE UN ANTÍGENO IMMUNODOMINANTE ESPECÍFICO DE *N. asteroides*.

Para la selección del antígeno inmunodominante específico de *N. asteroides*, y con el objetivo de determinar los anticuerpos que reaccionan con antígenos

con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

En la Fig. 9 se muestra el resultado de la inmunoelectrotransferencia (Western-blot) del suero de ratones

*N. farcinica* reaccionando con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*, este

antígeno se encuentra en el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

infectados con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

extracto de *N. asteroides* reaccionando con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

inmunizados con extractos de *N. asteroides* reaccionando con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

celular de *N. farcinica* reaccionando con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. nova*.

(Fig. 10) en el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

reconoce a un antígeno específico del suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

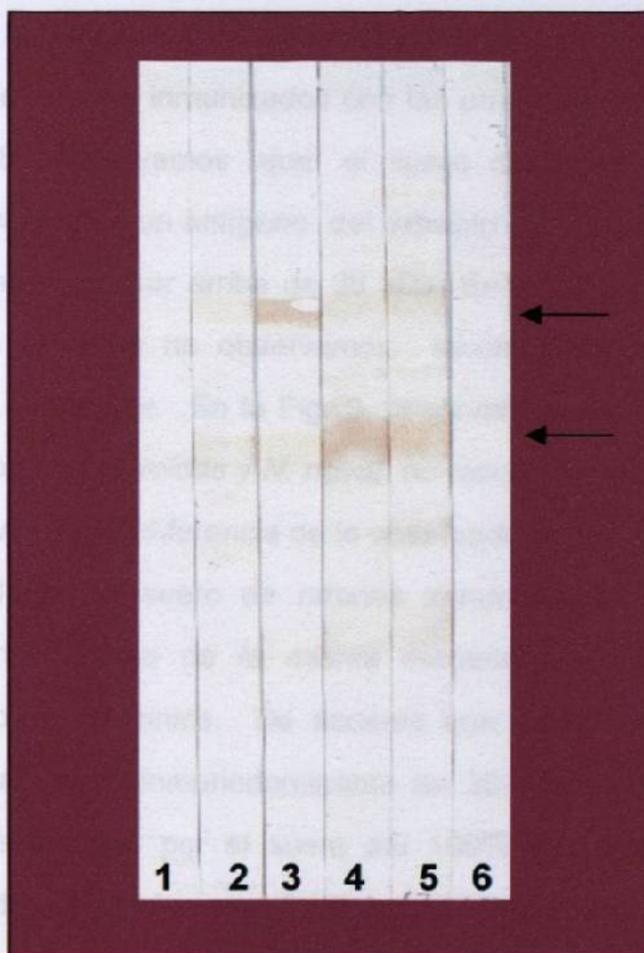
inmunizados con extractos de *N. asteroides* reaccionando con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

seleccionar al antígeno inmunodominante específico de *N. asteroides*.

antígeno fue reconocido por el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

ratones infectados con *N. nova* reaccionando con el suero de ratones inmunizados con extractos de *N. asteroides*.

los sueros de ratones inmunizados con extractos de *N. farcinica* y *N. nova*.



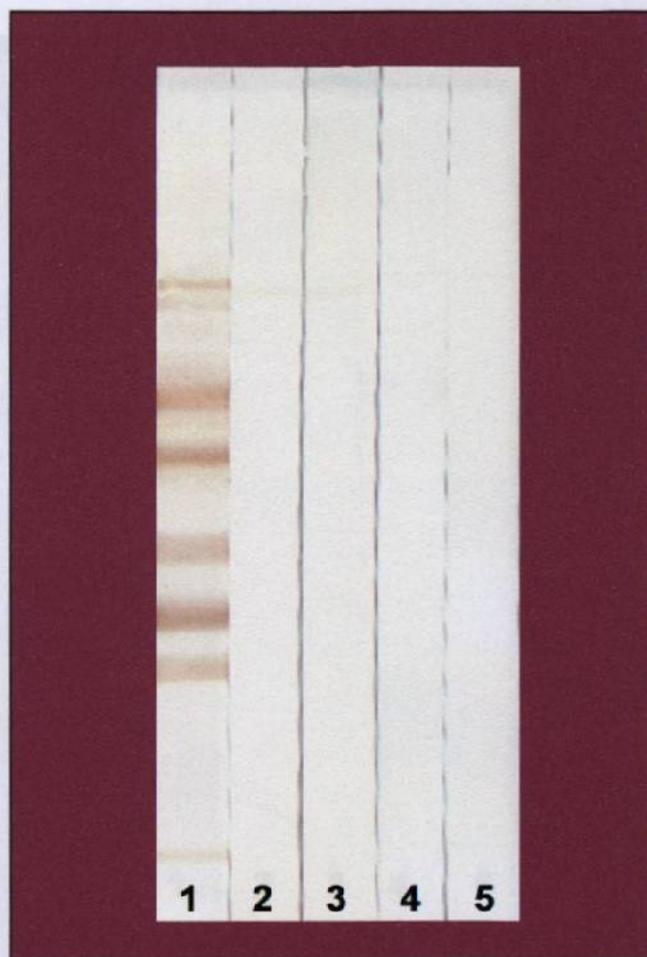
**Figura 7. Respuesta de anticuerpos en ratones infectados con *N. nova*.** Inmunoelectrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. nova*. Carril 1; suero de ratón no inmune. Carriles 2 a 6; suero de ratones infectados con *N. nova*. Las flechas señalan los antígenos inmunodominantes.

## 5. SELECCIÓN DE UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE ESPECÍFICO DE *N. asteroides*.

Para la selección del antígeno inmunodominante específico de *N. asteroides*, y con el objetivo de determinar los anticuerpos que reaccionan con antígenos heterólogos (reacción cruzada), cada extracto celular se analizó con el suero de ratones inmunizados con las otras dos especies de *Nocardia*. En la Fig. 8, observamos que el suero de un ratón inmunizado con *N. farcinica* reconoció a un antígeno del extracto celular de *N. asteroides*, este antígeno se encuentra por arriba de 36 kDa. En el caso de suero de ratones infectados con *N. nova* no observamos reconocimiento de antígenos del extracto de *N. asteroides*. En la Fig. 9, observamos que el suero de ratones inmunizados con *N. asteroides* y *N. nova*, no reconocen antígenos del extracto celular de *N. farcinica*. A diferencia de lo observado con el antígeno de *N. nova*, (Fig. 10) en donde el suero de ratones inmunizados con *N. asteroides*, reconoce a un antígeno de la misma manera que el suero de ratones inmunizados con *N. farcinica*. De acuerdo con estos resultados, decidimos seleccionar al antígeno inmunodominante de 36-kDa de *N. asteroides*. Este antígeno fue reconocido por el suero del 100% de ratones inmunizados y ratones infectados. Además, este antígeno no presentó reacción cruzada con los sueros de ratones inmunizados o ratones infectados con *N. farcinica* y *N. nova*.



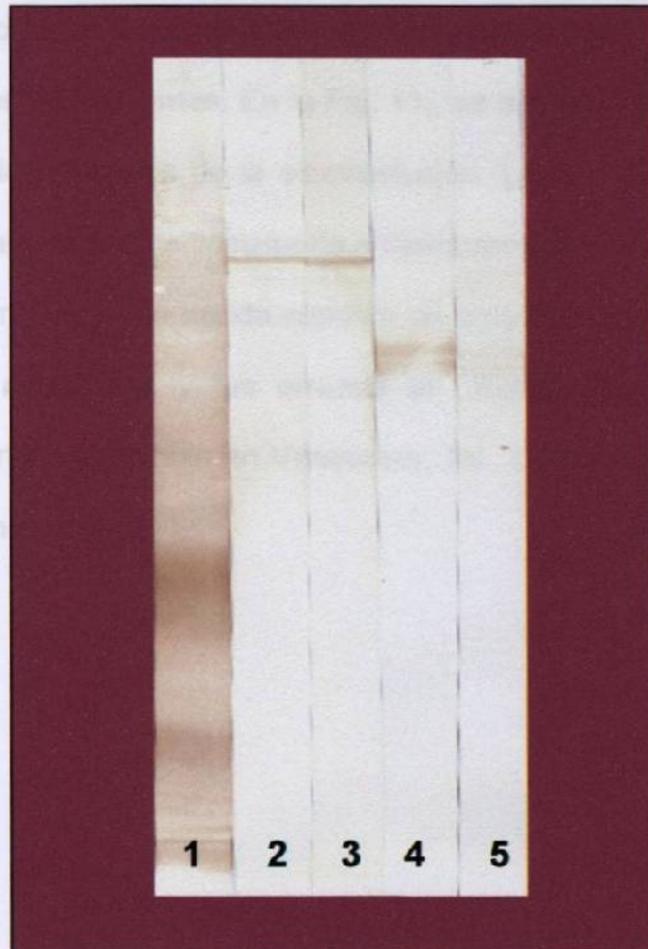
Figura 8. Análisis de anticuerpos de reacción cruzada, producidos por ratones inmunizados con *Nocardia*. Inmunoelctrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. asteroides*. Carril 1; suero de ratón inmunizado con *N. asteroides*. Carriles 3 y 4; suero de ratón inmunizado con extracto de *N. farcinica*. Carriles 4 y 5; suero de ratón inmunizado con extracto de *N. nova*.



**Figura 9. Análisis de anticuerpos de reacción cruzada, producidos por ratones inmunizados con *Nocardia*.** Inmuno-electrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. farcinica*. Carril 1; suero de ratón inmunizado con *N. farcinica*. Carriles 1 y 2; suero de ratón inmunizado con extracto de *N. asteroides*. Carriles 3 y 4; suero de ratón inmunizado con extracto de *N. nova*.

## 6. AISLAMIENTO DEL ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE *N. asteroides*.

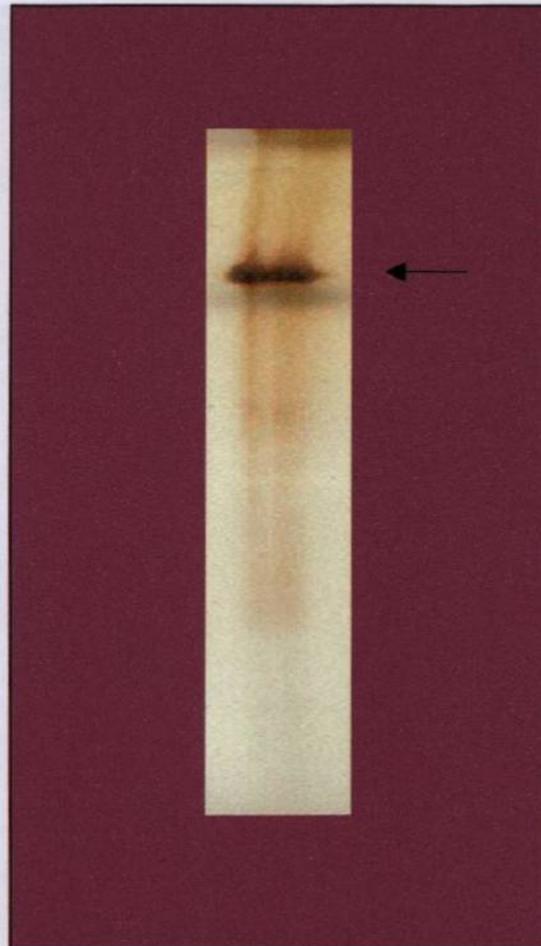
Para el aislamiento del antígeno inmunodominante de 36-kDa de *N. asteroides*, se realizó la electroforesis del extracto celular y el área del gel correspondiente a la proteína de 36-kDa se sometió a electroelución. El producto eluido se poliacrilamida en condiciones de electroforesis de la proteína obtenida. En la membrana de PVDF observada por inmunotransferencia se recortó de la misma proteína. En la membrana de PVDF observada por inmunotransferencia se recortó de la misma proteína. En la membrana de PVDF observada por inmunotransferencia se recortó de la misma proteína. University of Br... su secuencia amin...



**Figura 10. Análisis de anticuerpos de reacción cruzada, producidos por ratones inmunizados con *Nocardia*.** Inmunoelctrotransferencia (Western-blot) del antígeno de *N. nova*. Carril 1; suero de ratón inmunizado con *N. nova*. Carriles 2 y 3; suero de ratón inmunizado con extracto de *N. asteroides*. Carriles 4 y 5; suero de ratón inmunizado con extracto de *N. farcinica*.

## **6. AISLAMIENTO DEL ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DE *N. asteroides*.**

Para el aislamiento del antígeno inmunodominante de 36-kDa de *N. asteroides*, se realizó la electroforesis del extracto celular y el área del gel correspondiente a la proteína de 36-kDa se sometió a electroelución. El producto eluido se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En la Fig. 11, se observa la electroforesis de la proteína obtenida después de la electroelución. La Fig. 12, nos muestra esta misma proteína después de transferirla a membrana de PVDF. En la membrana de PVDF observamos una banda superior de mayor intensidad, esta banda se recortó de la membrana y fue enviada al Biotechnology Laboratory, The University of British Columbia en Vancouver, BC. Canadá, para determinar su secuencia aminoterminal.



**Figura 11. Análisis electroforético de la proteína de 36-kDa de *N. asteroides*.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. La flecha señala a la proteína aislada de *N. asteroides*. Tinción con nitrato de plata.

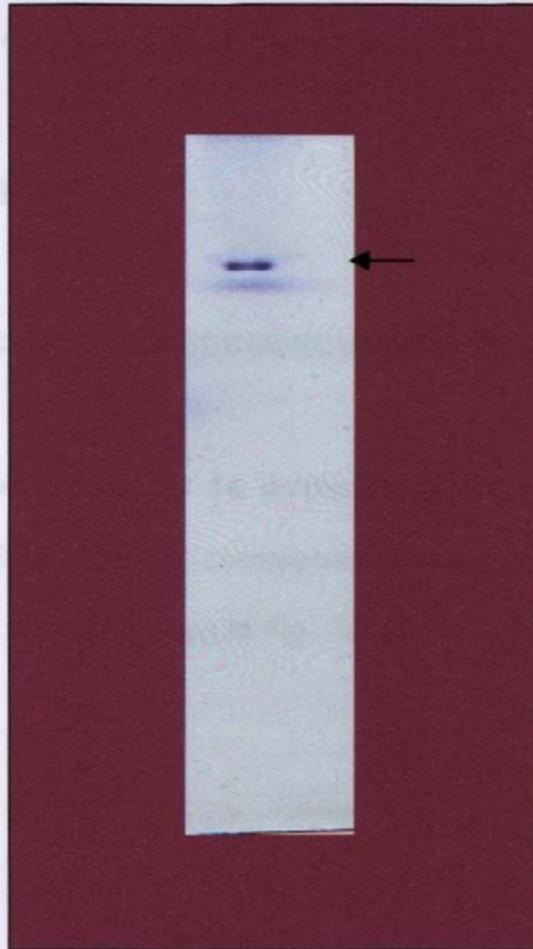
## 7. SECUENCIA AMINOACÍDICA N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA DE 36-KDa DE *N. asteroides*.

Mediante la determinación de la secuencia del antígeno inmunodominante de 36-kDa de *N. asteroides*, fue posible obtener la secuencia N-terminal de la proteína de 36-kDa de *N. asteroides*. La secuencia siguiente:

PEAVIVSTA

## 8. COMPARACIÓN

La secuencia de aminoácidos de la proteína de 36-kDa de *N. asteroides* reportada en este trabajo se comparó con las secuencias reportadas en la literatura para proteínas de *N. asteroides* (Tiolasa) como



**Figura 12. Análisis de la proteína de 36-kDa de *N. asteroides* transferida a membrana de PVDF. La flecha señala a la proteína aislada de *N. asteroides*. Tinción con azul de Coomassie.**

## **7. SECUENCIA AMINOACÍDICA N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA DE 36-kDa DE *N. asteroides*.**

Mediante la determinación de la secuencia del antígeno inmunodominante de 36-kDa de *N. asteroides*, fue posible obtener la secuencia N-terminal de 14 aminoácidos que corresponde a la secuencia siguiente:

**PEAVIVSTARSPIV**

## **8. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA N-TERMINAL.**

La secuencia de los 14 aminoácidos fue comparada con secuencias reportadas. Esta proteína corresponde a una acetyl-CoA acetyltransferasa (Tiolasa) como se muestra en la Fig. 13.

Sequences producing significant alignments:		(bits)	Value
<u>gi 29830055 ref NP_824689.1 </u>	putative thiolase [ <i>Streptomyce...</i>	.43	3e-04
<u>gi 4140711 ref NP_959955.1 </u>	hypothetical protein MAP1021c ...	43	3e-04
<u>gi 12082816 gb AAG48622.1 </u>	putative acetyl-CoA acetyltransf...	43	3e-04
<u>gi 15608214 ref NP_215590.1 </u>	fadA3 [ <i>Mycobacterium tuberculo...</i>	43	3e-04
<u>gi 15806445 ref NP_295151.1 </u>	acetyl-CoA acetyltransferase [...	40	0.002
<u>gi 23019634 ref ZP_00059344.1 </u>	COG0183: Acetyl-CoA acetyltr...	40	0.002
<u>gi 21221520 ref NP_627299.1 </u>	putative thiolase [ <i>Streptomyce...</i>	39	0.003
<u>gi 33599655 ref NP_887215.1 </u>	probable thiolase [ <i>Bordetella ...</i>	37	0.016
<u>gi 39936776 ref NP_949052.1 </u>	acetyl-CoA acetyltransferase [...	37	0.016
<u>gi 29827925 ref NP_822559.1 </u>	putative acyl-CoA thiolase [ <i>St...</i>	37	0.016
<u>gi 33595356 ref NP_882999.1 </u>	probable thiolase [ <i>Bordetella ...</i>	37	0.016
<u>gi 33598704 ref NP_886347.1 </u>	probable thiolase [ <i>Bordetella ...</i>	34	0.096

**Figura 13. Comparación del péptido N-terminal de *N. asteroides*. Esta secuencia corresponde a tiolasa (Programa Blast).**

## **9. DISEÑO DE INICIADORES PARA EL GEN QUE CODIFICA A LA PROTEÍNA DE 36-kDa DE *N. asteroides*.**

Se diseñaron iniciadores 3' y 5' para el gen de tiolasa, sobre regiones conservadas de la proteína. Estas se identificaron mediante el alineamiento (con el programa GeneDoc) de las secuencias homólogas disponibles en el GenBank de bacterias relacionadas con el género *Nocardia* Fig. 14.

```

+1                                     +36
Streptomyces avermitilis MMPEAVIVSTARSPIGRAFKGSLKDLRPDDLTATII
Streptomyces venezuelae MPEAVIVSTARSPIGRAFKGSLKDLRPDDLTATIV
Streptomyces coelicolor MPEAVIVSAARSPIGRAFKGSLKDLRADDLAATII
Thermobifida fusca      MPEAVIVATARSPIGRAFKGSLKDIRPDDLTAQII
Mycobacterium t. H37Rv  MPEAVIVSTARSPIGRAMKGSVGMRPDDLAVQMV
Deinococcus             VMPEAVIVSTARTPIGKAYRGFLNDTHGSDLGAHAV
                        * *****:***:***:* :* : . * :

+373                                     +407
Streptomyces avermitilis GTLINSLQFHDRKQFGLETMCVGGGQGMAMVIERLS
Streptomyces venezuelae GTLINSLQFHDRKQFGLETMCVGGGQGMAMVIERLS
Streptomyces coelicolor GTLINSLRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVIERLS
Thermobifida fusca      TTLINALQFHDKTFGLETMCVGGGQGMAMVIERLS
Mycobacterium t. H37Rv  TTLNNLQTYDKTFGLETMCVGGGQGMAMVIERLA
Deinococcus             GHILLEGQRRGAKHVVVVTCVGGGGAAGLFEVL-
                        : : : :***** * * : :*

```

**Figura 14. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de tiolasa.** Las secuencias en rojo corresponden a la región N-terminal, las secuencias en verde a la región C-terminal. Estas secuencias corresponden a las regiones de alineamiento de los iniciadores (Programa GeneDoc).

Una vez identificadas las dos regiones de la proteína, se dedujo la secuencia nucleotídica de los dos iniciadores tomando en cuenta la frecuencia de uso de codones por bacterias del género *Nocardia*. Los iniciadores diseñados son los siguientes:

### Tiol 1

**5'-GAC CGC ACG CTC CCC SAT-3'**

### Tiol 2

**5'-TCG CCG CCA ACG CAC AT-3'**

11. Estos iniciadores permitieron la amplificación de un fragmento de 1130-pb del gen de tiolasa en las especies contempladas para su diseño.

#### 10. OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO DE *N. asteroides*.

El DNA se extrajo a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial de *N. asteroides* en medio BHI. Con la metodología empleada y utilizando 30  $\mu\text{g}$  del botón celular, fue posible obtener DNA genómico de buena calidad como se observa en la Fig. 15.



**Figura 15. Análisis del DNA genómico de *N. asteroides*.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se depositó 1  $\mu\text{l}$  de la muestra de DNA genómico de *N. asteroides*. La flecha indica el DNA.

## 11. AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN QUE CODIFICA UNA TIOLASA DE *N. asteroides*.

El producto amplificado de 1130 pb, se clonó en vector p. Las clones recombinantes A partir del DNA genómico de *N. asteroides* y con los iniciadores Tiol 1 y Tiol 2, se obtuvo un producto de buena intensidad, del tamaño esperado de 1130 pb (Fig. 16).

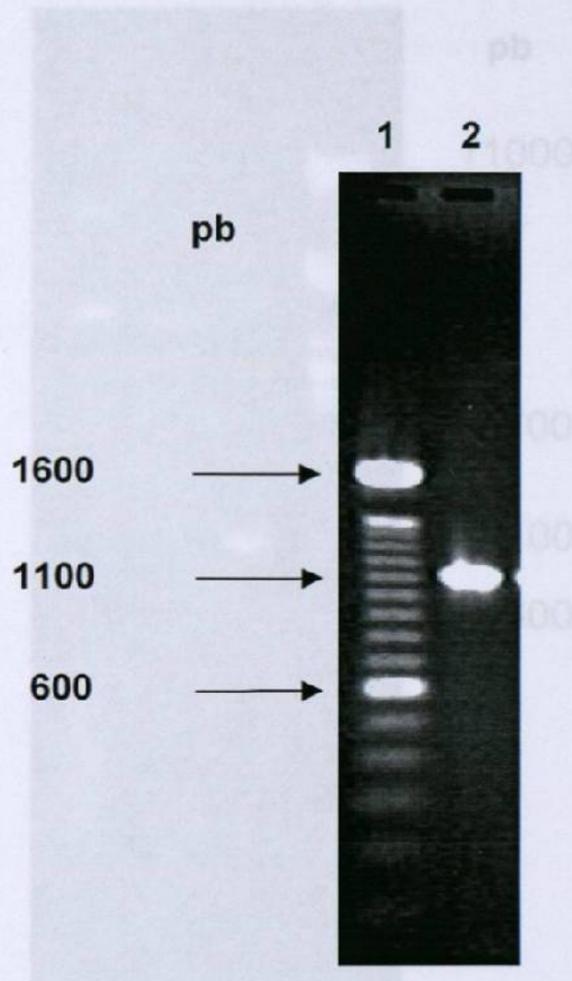
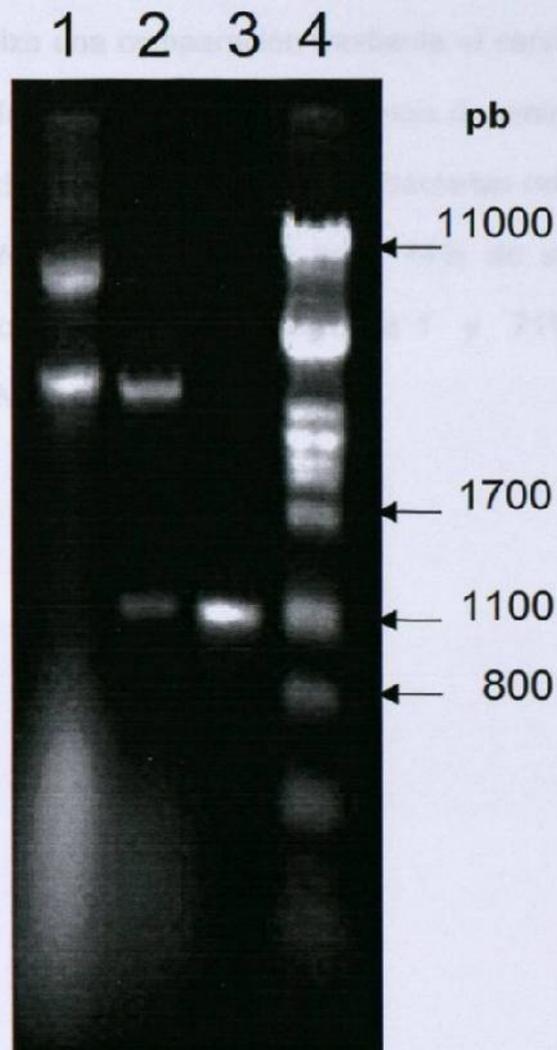


Figura 16. Amplificación del fragmento del gen de tiolasa de *N. asteroides*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1. Marcador de peso molecular (DNA leader). Carril 2. Producto amplificado con los iniciadores Tiol 1 y Tiol 2.

## 12. CLONACIÓN EN VECTOR T.

El producto amplificado de 1130 pb, se clonó en vector T. Las clonas recombinantes se seleccionaron de acuerdo al tamaño del inserto (Fig. 17).

se tradujo a su secuencia de aminoácidos (Fig. 18). Una vez obtenida la secuencia, se hizo un análisis de homología en el servicio Blast, y se corroboró que correspondía a la proteína de la familia de las tiolasa de *A. nidulans*. La secuencia de tiolasa de *A. nidulans* reportada en la literatura es de 1130 pb, y 77% con la otra secuencia reportada para *A. nidulans*.



**Figura 17. Análisis de las clonas recombinantes.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1; Clona T2, 2; Clona T2 digerida con *EcoR* I, 3; Producto amplificado, 4; Marcador de peso molecular ( $\lambda$  cortado con *Pst* I).

### 13. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL PRODUCTO AMPLIFICADO DE TIOLASA DE *N. asteroides*.

Se determinó la secuencia del producto amplificado de 1130-pb y se tradujo a su secuencia de aminoácidos (Fig. 18). Una vez obtenida la secuencia, se hizo una comparación mediante el servicio *Blast*, y se corroboró que correspondía a una Tiolasa. La secuencia de aminoácidos se comparó con las secuencias de tiolasa reportadas para bacterias relacionadas. La secuencia de tiolasa de *Nocardia asteroides* tiene 74% de similitud con una de las secuencias reportadas para *N. farcinica* 1 y 71% con la otra secuencia reportada para *N. farcinica* 2 (Tabla V).

```

N. a : -----TARSPIGRAGKGSIVSMRPDDLATQVMVRAALDKVPAIDPAQIDDLMLGCGQPGCEAGFNMAKVVAATQLGYDF : 72
N. f1: -MPEAVIVSTARSPIGRARKGSLVDMRPDDLASQIVRAALDKVPAIDPPTQIDDLILGCGSPAGEQGFNIARNVAVMLGYDT : 80
N. f2: -MPEAVIVAAARSPIGRAGKGSLEKEMPPDLTVQMVRAALQVPAIDPAQVEDLLLGCGQPAGESGFNIMARTVAVLAGLDT : 80
M. t : -MPEAVIVSTARSPIGRAMKGSIVSMRPDDLAVQMVRAALDKVPAIDNEHQIDDLMLGCGLPGGSEGFNIARVVAVALGYDF : 80
T. f : -MPEAVIVATARSPIGRAFKGSLKDIRPDDLTAQIISAALAKVPEIDFEATIDDLMLGCGLPGGCEQGFNMARVVAVALGLDS : 80
S. v : -MPEAVIVSTARSPIGRAFKGSLKDLRPDDLTAIVQAAALAKVPEIDFERDIDDLMLGCGLPGGCEQGNLGRIVAVQMGMDH : 80
S. a : -MPEAVIVSTARSPIGRAFKGSLKDLRPDDLTAIIQAAALAKVPEIDFKDIDDLMLGCGLPGGCEQGNLGRIVAVQMGMDH : 81
S. c : -MPEAVIVSAARSPIGRAFKGSLKDLRADDLAATIIQAAALAKVPEIDFERDIDDLMLGCGLPGGCEQGNLGRIVAVEMGMHDH : 80
      mpeaviv tarspigrag kgsi 6rpddl 66 aal kvp e1e 6cdl66gcg pgce g n6 4 vav g d

      *           100           *           120           *           140           *           160
N. a : LPGVTLNRYCSSLQCTTRMALHAIKAGEGDVVISAGVETVSRFFPKTSDGWEDTHNEKFAEAEARTVKAIEGGSDGWADPR : 153
N. f1: LPGTLVHRYCASSLQCTTRMALHAIKAGEGHAFISAGVETVSRVYVHGSADSWENTQNPINADAQARTAKAIEGGAGIWHDFR : 161
N. f2: VPGTLVNRYSSSLQCTTRMALHAIKAGEGEVVISAGVETVSRVYVHGSADSWEDTQNPVFAVARTAEASGGADWADPR : 161
M. t : LPGTLVNRYSSSLQCTTRMALHAIKAGEGDVVISAGVETVSRVYVHGSADSWEDTQNPVFAVARTAEASGGADWADPR : 160
T. f : VPGTLVNRYSSSLQCTTRMALHAIKAGEGDVVISAGVEMVSRFTKNSDLEDTKPNLFAEAEARTARRIEGGAFWRDFR : 161
S. v : LPGTLVNRYSSSLQCTTRMALHAIKAGEGDVVISAGVEMVSRVYVHGSADSWEDTQNPVFAVARTAEASGGADWADPR : 161
S. a : LPGTLVNRYSSSLQCTTRMALHAIKAGEGDVVISAGVEMVSRVYVHGSADSWEDTQNPVFAVARTAEASGGADWADPR : 162
S. c : LPGTLVNRYSSSLQCTTRMALHAIKAGEGDVVISAGVEMVSRVYVHGSADSWEDTQNPVFAVARTAEASGGADWADPR : 161
      6PG 66 RYCSSLQ33RMA HAIKAGEGDVVISAGVE VSR kg sd e1e Np Fa A ar3a A W DFR

      *           180           *           200           *           220           *           240
N. a : ESGELPDVYIAMGQTAENVAQYTGISRQDQDHWGVRSONRAEAIKAGFFEREITPVTLFDGTVVSTDDGPRPGTTEYKIS : 234
N. f1: EDGLLPDVYIAMGQTAENVAQYTGITREDQDRWGVRSQNLAEAIKNGFFEREITPVTLFDGTVVSKDDGPRAGVTEYAVS : 242
N. f2: AQGLLPDVYIAMGQTAENVAQYTGITRAEQDQAFGVRSQNLAEAIKADGFWATDITPVTLFDGTVVSKDDGPRAGVTEYAVS : 242
M. t : TDQKLPDIYIAMGQTAENVAQYTGISREQDRWGVRSQNLAEAIKNGFFEREITPVTLFDGTVVSTDDGPRPGTTEYKVS : 241
T. f : EGKLPDIYIAMGQTAENVAQYTGISRQDQDHWGVRSONRAEAIKADNGFWEREITPVTLFDGTVVSTDDGPRPGTTEYKVA : 242
S. v : EDGLVPDAYIAMGQTAENLARKGITRQDMDFGVRSQNLAEAIKNGFWEREITPVTLFDGTVVSKDDGPRAGVTEYAVS : 242
S. a : EDGLVPDAYIAMGQTAENLARKGITRQDMDFGVRSQNLAEAIKNGFWEREITPVTLFDGTVVSKDDGPRAGVTEYAVS : 243
S. c : EDGLVPDAYIAMGQTAENLARKGITRQDMDFGVRSQNLAEAIKNGFWEREITPVTLFDGTVVSKDDGPRAGVTEYAVS : 242
      e g 6PD YIAMGQTAEN6A G63R D 5gVRSQNL AE A6 G5ereITPVTLFDGTVVSKDDGPR G T E 6

      *           260           *           280           *           300           *           320
N. a : QLKPVFRPDGTVTAGNCCPLNDGAAALVIMSDTKARELGLTFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEAVRKALKIAGKTIDDI : 315
N. f1: QLKPVFRPDGTVTAGNCCPLNDGAAALVIMSDVRAKELGLTFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEAVRKALKIAGKTIDDI : 323
N. f2: QLKPVFRPDGTVTAGNCCPLNDGAAALVIMSDTKARDLGITFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEASKQALGRAGLTIDDI : 323
M. t : ELKPAFRPNGTVTAGNCCPLNDGAAAVVITSDTKARELGLTFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEASKKALERAGMAIDDI : 322
T. f : ALDPVFRPDGTVTAGNCCPLNDGAAALIIMSDRKAELGITFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEASRQALARANMSIRDI : 323
S. v : GLKPVFRPDGLVTAGNCCPLNHGAALVIMSDTKARELGLTFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEASKQALGRAGLTIDDI : 323
S. a : GLKPVFRPDGLVTAGNCCPLNDGAAALVIMSDTKARELGLTFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEASKQALRRAGLTIDDI : 324
S. c : GLKPVFRPDGLVTAGNCCPLNDGAAALVIMSDTKARELGLTFLARIVSTGVSGLSPEIMGLGPIEASKQALSRAGLVGDI : 323
      LkPvFRP1G VTAGNCCPLNDGAA66IMSDT4A eL6TFLARIVSTGV3gLSPEIMGLG6Eas4 AL rAg 6 DI

      *           340           *           360           *           380           *           400
N. a : DLVEINEAFVAVLGSARELNMDLD-RLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQ----- : 376
N. f1: DLVEINEAFVAVLGSARELKIDED-KLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVLE : 403
N. f2: DLVEINEAFVAVLGSARELGIPEL-KLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVLE : 403
M. t : DLVEINEAFVAVLGSARELGIDED-KLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVLE : 402
T. f : DLVEINEAFVAVLGSARELGIPEL-KLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVLE : 404
S. v : DLAEINEAFVAVLGSARELGIPEL-KLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVLE : 403
S. a : DLVEINEAFVAVLGSARELGIPEL-KLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVLE : 404
S. c : DLVEINEAFVAVLGSARELGIPEL-KLNVSGGAIALGHPPGMTGARITATLINSRTHDKQFGLETMCVGGGQGMAMVLE : 403
      DL EINEAFA QV6 g r Lg6d d 6N6 CGAIA6GHPPGMTGARIT TL6N Lq hDKqfg etm cvgggqgmam e

      *
N. a : ----- : -
N. f1: RLS*----- : 406
N. f2: RLS----- : 406
M. t : RLA----- : 405
T. f : RLS----- : 407
S. v : RLS----- : 406
S. a : RLS----- : 407
S. c : RLS----- : 406
      rls

```

Figura 18. Alineamiento y comparación de la secuencia aminoacídica del producto amplificado de *N. asteroides*, con secuencias de tiolasa de bacterias relacionadas. *N. f1*; *N. farcinica* 54018317, *N. f2*; 54016890, *M. t*; *M. tuberculosis* CDC1551, *T. f*; *T. fusca*, *S. v*; *S. venezuelae*, 12082816, *S. a*; *S. avermitilis* 29830055, *S. c*; *S. coelicolor* 21221520.

**Tabla V. Porcentaje de similitud entre las secuencias aminoacídicas de tiolasa de *N. asteroides* con secuencias de bacterias relacionadas.**

	<i>N. f1</i>	<i>N. f2</i>	<i>M. t</i>	<i>S. a</i>	<i>S. c</i>
<i>N. asteroides</i>	74%	71%	75%	68%	67%
<i>N. farcinica</i> : 1		79%	81%	74%	75%
<i>N. farcinica</i> 2			75%	76%	76%
<i>M. tuberculosis</i>				73%	74%

## DISCUSIÓN

*Nocardia asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*, son los principales agentes causantes de infección sistémica por bacterias del género *Nocardia* (4). Sin embargo, *Nocardia asteroides* es la principal agente causal de infecciones sistémicas graves, y en el 50% de los casos produce la muerte de las personas afectadas (69).

Algunos de los casos de infección por *Nocardia* son diagnosticados posterior a la muerte del paciente (67), esto se debe, en primer lugar a que no se sospecha de este agente infeccioso y en segundo, a que no se tiene una prueba diagnóstica rápida que permita identificar a la especie de *Nocardia* causante de la infección.

Hasta la fecha, las pruebas serológicas para el diagnóstico de estas bacterias, utilizaron antígenos al azar sin conocer su importancia desde el punto de vista de la respuesta inmune. Además las pruebas serológicas, no permiten diferenciar *Nocardia*, de bacterias relacionadas (105, 106).

Existe un antecedente del desarrollo de una prueba serológica para el diagnóstico de infección localizada (actinomicetoma) por *N. brasiliensis*, basándose en un antígeno inmunodominante. Esta prueba además de confirmar el diagnóstico de micetoma por *N. brasiliensis*, permite hacer la

correlación clínica de la enfermedad, ya que cuando el paciente cura de la infección existe una disminución de los niveles de anticuerpos anti-*Nocardia brasiliensis* (107).

Para seleccionar una proteína que pueda ser blanco en pruebas diagnósticas es indispensable conocer su inmunogenicidad. Tanto la inmunidad celular como la humoral juegan un papel importante en la resistencia a la infección causada por *Nocardia spp* (31, 32). Sin embargo, la respuesta inmune humoral es más fácil de evaluar y permite determinar la inmunogenicidad de los componentes bacterianos, primordialmente proteínas. Anteriormente se pensaba que los anticuerpos no tenían actividad protectora, e incluso se proponía que pudieran favorecer o empeorar la infección (129). Recientemente Salinas y Pérez observaron que los anticuerpos del isotipo IgM presentes al séptimo día postinfección, tienen actividad protectora (31).

En esta tesis decidimos seleccionar a un antígeno inmunodominante de *Nocardia asteroides* debido a la mayor frecuencia de este agente en las infecciones graves (72). Para determinar los antígenos inmunodominantes utilizamos la técnica de Western blot por su resolución y alta sensibilidad (125). Los sueros utilizados en esta prueba corresponden al día 30 post-inmunización y post-infección, ya que en este tiempo, observamos mejor respuesta de anticuerpos.

Consideramos que al evaluar la respuesta inmune humoral, debemos de utilizar además de extractos bacterianos, bacterias enteras ya que como observamos la respuesta inmune humoral contra las bacterias es menor que la observada contra los extractos bacterianos. Sin embargo, la respuesta observada contra las bacterias enteras, refleja mejor lo que ocurre en la infección natural. Probablemente la pobre respuesta de anticuerpos en ratones infectados, se debe a la dosis de bacterias utilizada y la vía de administración (subcutánea), que no es la vía de entrada natural de las especies del género *Nocardia* causantes de infección sistémica. No utilizamos dosis de bacterias mayores, por el riesgo de provocar la muerte de los ratones, sin embargo es importante resaltar que al momento de sacrificar a los ratones, al día 60 postinfección, recuperamos del sitio de inoculación (en el 80% de los ratones) bacterias viables (demostrado por crecimiento en cultivo).

Al comparar mediante electroforesis, el patrón de antígenos proteicos de *Nocardia asteroides sensu stricto*, *N. farcinica* y *N. nova*, observamos que existe cierta similitud entre ellos, por ejemplo en *N. asteroides* y *N. nova* la proteína de 24-kDa es abundante, ambos extractos poseen proteínas de más de 66-kDa y la banda de 61-kDa es abundante en las tres especies.

A pesar de que la respuesta humoral de los ratones infectados con *Nocardia* no fue tan intensa como en el caso de los ratones inmunizados, ayudó a seleccionar un antígeno inmunodominante de *N. asteroides*. Si la selección del antígeno se hubiese realizado solo sobre la base de la respuesta humoral

de ratones inmunizados, probablemente se habría seleccionado a la proteína de 24-kDa que es la más inmunogénica y abundante, pero esta proteína no desencadenó respuesta de anticuerpos en los ratones infectados. Por este motivo, se seleccionó a la proteína de 36-kDa de *Nocardia*. Para verificar la ausencia de reacción cruzada, se realizaron análisis de Western blot utilizando el suero de ratones inmunizados, que son los que presentaron mejor respuesta.

Finalmente con los diferentes ensayos de Western blot, se seleccionó la proteína inmunodominante de 36-kDa de *Nocardia asteroides sensu stricto* basándose en los siguientes criterios: 1. Es una proteína abundante en los extractos celulares de la bacteria (Fig. 1). 2. Es un antígeno inmunodominante, ya que fue reconocido por el suero del 100% de ratones BALB/c inmunizados (Fig. 2). 3. También fue uno de los antígenos inmunodominantes que indujé producción de anticuerpos en ratones infectados (Fig. 5). 4. Este antígeno no desencadenó reacción cruzada con los antígenos de las otras bacterias estudiadas (Fig. 8, 9, 10).

La secuencia aminoacídica del antígeno inmunodominante de 36-kDa de *N. asteroides* seleccionado, permitió identificarlo como una tiolasa. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de tiolasas de especies cercanas a *N. asteroides* permitió definir una región conservada al inicio de la proteína y otra muy cercana al extremo C-terminal. Los iniciadores diseñados sobre estas regiones nos permitieron amplificar la mayor parte del gen que codifica para esta tiolasa de *Nocardia asteroides*, la cual se clonó.

Las tiolasas son enzimas que participan en el metabolismo de los ácidos grasos, cetonas y esteroides. En particular, están involucradas en la  $\beta$  oxidación, específicamente en el paso final. Esta vía metabólica se presenta en procariotes y eucariotes y estas enzimas se localizan en citosol, peroxisomas y mitocondrias (130). Los genes de tiolasas, se encuentran conservados y evolucionaron a partir de un ancestro común. Desde el punto de vista funcional, existen dos clases de tiolasa: Tiolasa I (3-cetoacyl-CoA tiolasa) y Tiolasa II (acetoacetyl-CoA tiolasa). La Tiolasa I escinde ácidos grasos de cadena larga, mientras que la Tiolasa II participa en la síntesis de acetoacetyl-CoA.

De acuerdo con la comparación de la secuencia aminoácídica, con la reportada de otras tiolasas, observamos que existe similitud con las secuencias de Tiolasa I, sin embargo, esta caracterización se tendrá que complementar con ensayos bioquímicos de especificidad de sustrato. La tiolasa de *Nocardia asteroides sensu stricto* presenta varias substituciones con las tiolasas de especies cercanas, como *N. farcinica*. Estas substituciones podrían explicar la ausencia de reacción cruzada en los análisis de Western blot. Por lo tanto esta proteína podría ser un buen candidato para el desarrollo de una prueba diagnóstica mediante serología en pacientes inmunocompetentes, y/o biología molecular utilizando PCR y RFLPs en pacientes inmunocomprometidos.

## CONCLUSIONES

1. Identificamos el antígeno inmunodominante de 36-kDa de *Nocardia asteroides sensu stricto*, que no presenta reacción cruzada con antígenos de *Nocardia farcinica* ni con *Nocardia nova*.
2. Se aisló el antígeno inmunodominante de 36 kDa de *N. asteroides sensu stricto* y se clonó el gen que codifica para este antígeno.
3. Este antígeno inmunodominante de *Nocardia asteroides sensu stricto*, corresponde a una Tiolasa.
4. Se corroboró que existen diferencias en la secuencia de aminoácidos entre tiolasa de *Nocardia asteroides* y *Nocardia farcinica*, lo que hace a este antígeno un buen candidato para desarrollar una prueba diagnóstica.

**LITERATURA CITADA**

1. Gebhardt, P. L. 1972. Microbiología. 4a. ed. p 338-9. Ed. Interamericana. México.
2. González-Ochoa, A. 1975. Geografía de las Micosis Profundas. Rev. Inv. Salud Pub. 35:85-96.
3. Kenneth, S. W., and A. F. Mahmoud. 1984. Tropical and geographical medicine. 11a ed. p 934-94 Ed. McGraw-Hill. USA.
4. Beaman, L. B., and L. Beaman. 1994. Nocardia Species: Host-Parasite Relationship. Rev. Clin. Microbiol. Rev. 7(2):213-64.
5. Lechevalier, H. A. 1989. Nocardioform Actinomycetes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4. p 2348-404 ( S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore MD. USA.
6. Sneath, P. H. A. 1994. Nocardioform Actinomycetes. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. p 605-703. (J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore MD. USA.
7. Goodfellow, M. 1989. The actinomycetes I. Suprageneric clasification of actinomycetes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacterology. Vol 4. p 2333-339 (S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Eds), Williams and Wilkins, Baltimore MD. USA.
8. Krech, T., and D. G. Hollis. 1991. *Corynebacterium* and Related Organisms. In: Manual of Clinical Microbiology. p 277-86. (A. Ballows, W. J. Hauser, K. L.

Herman, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy Eds.) American Society of Microbiology. Washington D.C. USA.

9. Sykes, G., and F. A. Skinner. 1973. Actinomycetales: characteristics and practical importance. Academic Press. London New York.

10. Jiménez, T., A. M. Díaz, and H. Zlotnik. 1990. Monoclonal Antibodies to *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* antigens. J. Clin. Microbiol. 28:87-91.

11. Tsukamura, M. 1970. Relationship between *Mycobacterium* and *Nocardia*. Japan J. Microbiol. 14:187-195.

12. Williams, T., M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1989. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. p 2333-62. Williams & Wilkins Co. Baltimore, MD.

13. Serrano, J. A., and H. A. Sandoval. 1992. Actinomicetos y organismos relacionados, En: Manual de laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos. Universidad de los Andes. Consejo de publicaciones. Mérida Venezuela.

14. Boiron, P., R. Locci, M. Goodfellow, S. A. Gumma, K. Isik, B. Kim, M. M. McNeil, M. C. Salinas-Carmona, and H. Shojaei. 1998. *Nocardia*, nocardiosis and mycetoma. Medical Mycology. 36(1):26-37.

15. Hornick, P., P. Harris, and P. Smith. 1995. *Nocardia asteroides* purulent pericarditis. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 9(8):468-70.

16. Beaman, B. L. 1993. Nocardial Infections, *in*: Fungal Infections and Immune Response. p 533-54 ( J. W. Murphy, H. Friedman. M. Bendinelli Eds.) Plenum Press New York and London.
17. Folb, P. I., A. Timme, and A. Horowitz. 1977 *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect. Immun.* **18**:459-66.
18. González-Ochoa, A., H. Shibayama, D. Felix, and M. Anaya. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. *Excerpta Med. Int. Cong. Ser.* **55**:542-51.
19. Hironaga, M., T. Mochizuki, and S. Watanabe. 1990 Acute primary cutaneous nocardiosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **23**:399-400.
20. Clyde, M. C. 1967. Los hongos y el hombre. 2a. ed. p 155 Ed. Interamericana. México.
21. McNeil, M. M., and J. M. Brown. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:357-417.
22. Lerner, P. I. 1996. Nocardiosis. *Clin. Infect. Dis.* **22**:891-905.
23. Land, G., M. R. McGinnis, J. Staneck, and A. Gaston. 1991. Aerobic Pathogenic Actinomycetales. *in*: Manual of Clinical Microbiology. p 340-59. 5th Ed. (A. Ballows , W.J. Hauser, K.L. Herman, H.D. Isenberg and h.J. Shadomy eds.) American Society of Microbiology Washington, DC USA.
24. Beaman, B. L. 1979. Interaction of *Nocardia asteroides* at different phases of growth with *in vitro*-maintained macrophages obtained from the lungs of normal and immunized rabbits. *Infect. Immun.* **26**:355-61.

25. Davis Scibienski, C., and B. L. Beaman. 1980. Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: Immunological enhancement of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion, and microbicidal activity. *Infect. Immun.* **30**:578-87.
26. Filice, G. 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**(3):432-8.
27. Ortiz-Ortiz, J., E. I. Melendro, and C. Conde. 1984. Host-parasite relationship in infections due to *Nocardia brasiliensis*. *In: Biological Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. pp.119-113. (L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil and V. Yakoleff eds.) Academic Press, San Diego. CA. USA.
28. Licon-Trillo, A. 1997. Estudio de la inmunogenicidad de las proteasas de *Nocardia brasiliensis* y su efecto inductor de protección en el micetoma experimental en ratones BALB/c. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina, UANL.
29. Salinas-Carmona, M. C., and Torres-López E. 1996. Role of Passive Humoral Immunity in Experimental Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **797**:263-5.
30. Licón-Trillo, A., A. Castro-Corona, and M. C. Salinas-Carmona. 2002. Immunogenicity and biophysical properties of *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* **37**:37-44.
31. Salinas-Carmona, M. C., and Perez-Rivera I. 2004. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immun.* **72**(10):5597-604.

32. Deem, R. D., B. L. Beamari, and M. E. Gershwin. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infect. Immun.* **38**(3):914-20.
33. Martínez-Marcos, F. J., P. Viciano, E. Canas, J. Martín-Juan, I. Moreno, and J. Pachon. 1997. Etiology of solitary pulmonary nodules in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **24**(5):908-13.
34. Miralles, G. D. 1994. Disseminated *Nocardia farcinica* infection in an AIDS patient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**(6):497-500.
35. Holtz, H. A., D.P. Lavery, and R. Kapila. 1985. Actinomycetales infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine* **102**:203-5.
36. Poonwan, N., M. Kusum, Y. Mikami, K. Yazawa, Y. Tanaka, T. Gono, S. Hasegawa, and K. Konyama. 1995. Pathogenic *Nocardia* isolated from clinical specimens including those of AIDS patients in Thailand. *Eur. J. Epidemiol.* **11**(5):507-12.
37. Arbi, Y., M. R. Fairfax, M. J. Suba, L. Crane, and P. Schuman. 1996. Adrenal insufficiency, recurrent bacteremia, and disseminated abscesses caused by *Nocardia asteroides* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **24**(1):47-51.
38. Sánchez-Muñoz-Torero, J. F., T. R. Iñiguez, E. García-Onieva, F. J. Pascua, L. Crespo, A. Bacaicoa, and C. Martín. 1995. Nocardiosis en enfermos con infección por virus de la inmunodeficiencia humana en España. *Rev. Clin. Esp.* **195**(7):468-72.

39. LeBlang, S., D., M. L. Whiteman, M. J. Post, R. B. Uttamchandani, M. D. Bell, and J. G. Smirniotopolous. 1995. CNS *Nocardia* and AIDS patients: CT and MRI with pathologic correlation. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **19**(1):15-22.
40. Singh, M., R. S. Sandhu, H. S. Randhawa, and B. M. Kallan. 2000. Prevalence of pulmonary nocardiosis in a tuberculosis hospital in Amritsar, Punjab. *Indian. J. Chest. Dis. Allied. Sci.* **42**(4):325-39.
41. Kageyama, A., K. Yazawa, J. Ishikawa, K. Hotta, K. Nishimura, and Y. Mikami. 2004. Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. *Eur. J. Epidemiol.* **19**(4):383-9.
42. Pieroth, L., J. M. Winterkorn, H. Schubert, W. S. Millar, and M. Kazim. 2004. Concurrent sino-orbital aspergillosis and cerebral nocardiosis. *J. Neuroophthalmol.* **24**(2):135-7.
43. Canet, S., V. Garrigue, J. Bismuth, G. Chong, A. Lesnik, P. Taourel, and G. Mourad. 2004. Nocardiosis is it frequently observed after the introduction of new immunosuppressive agents in renal transplantation? *Nephrologie.* **25**(2):43-8.
44. Menku, A., A. Kurtsoy, B. Tucer, O. Yildiz, and H. Akdemir. 2004. *Nocardia* brain abscess mimicking brain tumour in immunocompetent patients: report of two cases and review of the literature. *Acta. Neurochir.* **146**(4):411-4
45. Verghese, S., V. M. Kurian, C. F. Maria, P. Padmaja, S. J. Elizabeth, and K. M. Cherian. 2003. *Nocardia asteroides* mediastinitis complicating coronary artery bypass surgery. *J. Assoc. Physicians. India.* **51**:1009-10.
46. Salinas-Carmona, M. C., J. M. Zúñiga-De Jesús, and M. A. Castro-Corona. 1999. Actinomicetos patógenos para el hombre y la nocardiosis. *Medicina Universitaria.* **1**(4):178-81.

47. Barmicoat, M. J., A. S. Wierzbicki, and P. M. Norman. 1989. Cerebral nocardiosis in immunosuppressed patients: five cases. *Q. J. Med.* **72**(268):689-98.
48. Bani-Sadr, F., M. Hamidou, F. Raffi, C. Chamous, J. Caillon, and C. Freland. 1995. Clinical and bacteriological aspects of Nocardiosis. 9 cases. *Presse. Med.* **24**(23):1062-6.
49. Desfemmes-Baleyte, T., C. Mayaud, and J. Caranel. 1996. Current aspects of pulmonary nocardiosis. *Rev. Mal. Respir.* **13**(4):321-5.
50. Marck, Y., L. Meunier, C. Pérez, and J. Meynadier. 1995. Primary cutaneous *Nocardia asteroides* nocardiosis in an immunocompromised patient. *Ann. Dermatol. Venereol.* **122**(10):675-7.
51. Rees, W., S. Schuler, M. Hummel, and R. Hetzer. 1995. Primary cutaneous *Nocardia farcinica* infection following heart transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **109**(1):181-3.
52. Monte'orte, J.,S., and C.,A. Wood. 1993. Pneumonia caused by *Nocardia nova* and *Aspergillus fumigatus* after cardiac transplantation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**(2):112-4
53. Farina, C., P. Boiron, A. Goglio, and F. Provost. 1995. Human nocardiosis in northern Italy from 1982 to 1992. Northern Italy Collaborative Group on Nocardiosis. *Scand. J. Infect. Dis.* **27**(1):23-7.
54. Farina, C., P. Boiron, I. Ferrari, F. Provost, and A. Goglio. 2001. Report of human nocardiosis in Italy between 1993 and 1997. *Eur. J. Epidemiol.* **17**(11):1019-22.

55. Pintado, V., E. Gómez-Mampaso, J. Fortún, M. A. Meseguer, J. Cobo, E. Navas, C. Quereda, P. Martín-Dávila, and S. Moreno. 2002. Infection with *Nocardia* Species: Clinical Spectrum of Disease and Species Distribution in Madrid, Spain, 1978-2001. *Infection*. 30(6):338-40.
56. Miguel-Noriega, L., P. González, D. Oddo, J. Pérez, J. Frenkel, F. Hurtado, L. Canales, C. Canals, and P. Michaud. 1995. Disseminated nocardiosis in 3 immunocompetent patients. *Rev. Med. Chil.* 123(10):1263-9.
57. Toro, J., L. Díaz, H. Poblete, V. Nicovani, and G. Peralta. 1996. Nocardiosis in a renal transplant recipient. *Rev. Med. Chil.* 124(3):348-52.
58. Márquez-Díaz, F., L. E. Soto-Ramírez, and J. Sifuentes-Osornio. 1998. Nocardiosis in patients with HIV infection. *AIDS Patient Care STDS* 12(11):825-32.
59. Pourmand, G., S. A. Jazaeri, A. Mehraei, S. Kalhori, and K. Afshar. 1995. Nocardiosis: report of four cases in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 27(5):2731-3.
60. Nampoory, M. R., Z. U. Khan, K. V. Johny, J. Nessim, R. K. Gupta, I. Al-Muzairai, M. Samham, and T. D. Chugh. 1996. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11(6):1134-8.
61. Kalender, B., S. Apaydin, M. R. Altiparmak, M. Pekpak, M. Saniyar, R. Ataman, K. Serdengeçti, and E. Erek. 2000. Opportunistic pulmonary infection after renal transplantation. *Transplant. Proc.* 32(3):563-5.
62. Palmer, S. M. Jr., S. S. Kanj, R. D. Davis, and V. F. Tapson. 1997. A case of disseminated infection with *Nocardia brasiliensis* in a lung transplant recipient. *Transplantation* 63(8):1189-90.

63. Exmelin, L., B. Malbruny, M. Vergnaud, F. Prosvost, P. Boiron, and C. Morel. 1996. Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **34**(4):1014-6.
64. van Burik, J. A., R. C. Hackman, S. Q. Nadeem, J. W. Hiemenz, M. H. White, M. E. Flowers, and R. A. Bowden. 1997. Nocardiosis after bone marrow transplantation: a retrospective study. *Clin. Infect. Dis.* **24**(6):1154-60.
65. Ugedo, J., A. Pérez, J. L. Orcastegui, C. Ruiz, R. Gómez, and C. García. 1997. Pulmonary nocardiosis: presentation of 3 clinical cases. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **15**(1):19-21
66. De La Iglesia, P., G. Viejo, B. Gómez, D. De Miguel, A. Del Valle, and L. Otero. 2002. Fatal pulmonary *Nocardia farcinica* infection. *J. Clin. Microbiol.* **40**(3):1098-9.
67. Eckardt, K., and J. Pilcher. 1950. Brain abscess due to *Nocardia asteroides*. Report of a case. *Tex. State. J. Med.* **46**(12):915-9.
68. Sabuncuoglu, H., Z. Z. Cibali Acikgo, M. Caydere, H. Ustun, and I. Semih Keskil. 2004. *Nocardia farcinica* brain abscess: a case report and review of the literature. *Neurocirugia (Astur)*. **15**(6):600-3.
69. Cupp, C. M., W. M. Edwards, and E. A. Cleve. 1960. Nocardiosis of the central nervous system: report of two fatal cases. *Ann. Intern. Med.* **52**:223-9
70. Hoepflich, P. D., D. Brandt, and R. H. Parker. 1968. Nocardial brain abscess cured with cycloserine and sulfonamides. *Am. J. Med. Sci.* **255**:208-16.
71. Shuster, M., M. M. Klein, H. C. Pribor, and W. Kozub. 1967. Brain abscess due to *Nocardia*. Report of a case. *Arch. Intern. Med.* **120**(5):610-4.

72. Mamelak, A. N., W. G. Obana, J. F. Flaherty, and M. L. Rosenblum. 1994. Nocardial brain abscess: treatment strategies and factors influencing outcome. *Neurosurgery*. **35**(4):622-31.
73. Maraki, S., S. Chochlidakis, E. Nioti, and Y. Tselentis. 2004. Primary lymphocutaneous nocardiosis in an immunocompetent patient. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **3**(1):24.
74. Baroni, M.R., M. Norona, S. Ronchi, and C. Mayoral. 2004. Necrotizing lymphadenitis caused by *Nocardia asteroides* in a healthy girl. *Rev. Argent. Microbiol.* **36**(2):75-7.
75. Lazo Torres, A. M., C. Galvez Contreras, A. Collado Romacho, F. J. Gamir Ruiz, F. Yelamos Rodriguez, and G. Lopez Martinez. 2004. *Nocardia* endocarditis in a native mitral valve. *Rev. Esp. Cardiol.* **57**(8):787-8
76. Figgis, P.A., A. R. Glanville, and J. L. Harkness. 2003. *Nocardia asteroides* pneumonia with bacteraemia. *Med. J. Aust.* **179**(3):171-2.
77. Comellas, J., M. Morales, and F. Granell. 2000. Nodular lymphangitis caused by *Nocardia asteroides*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **18**(8):385-8.
78. Dorman, S., E., S. V. Guide, P. S. Conville, E. S. DeCarlo, H. L. Malech, J. I. Gallin, F. G. Witebsky, and S. M. Holland. 2002. *Nocardia* infection in chronic granulomatous disease. *Clin. Infect. Dis.* **35**(4):390-4.
79. Moylett, E. H., S. E. Pacheco, B. A. Brown-Elliott, T. R. Perry, E. S. Buescher, M. C. Birmingham, J. J. Schentag, J. F. Gimbel, A. Apodaca, M. A. Schwartz, R. M. Rakita, and R. J. Wallace Jr. 2003. Clinical experience with linezolid for the treatment of nocardia infection. *Clin. Infect. Dis.* **36**(3):313-8.

80. Guide, S. V., F. Stock, V. J. Gill, V. L. Anderson, H. L. Malech, J. I. Gallin, and S. M. Holland. 2003. Reinfection, rather than persistent infection, in patients with chronic granulomatous disease. *J. Infect. Dis.* **187**(5):845-53.
81. Wang, S. M., C. C. Liu, C. T. Chen, A. C. Chen, and M. H. Wu. 1995. Pulmonary nocardiosis in a child with systemic lupus erythematosus: report of a case. *J. Formos. Med. Assoc.* **94**(8): 506-8.
82. Pintado, V, E. Gomez-Mampaso, M. A. Meseguer, F. Gonzalez-Palacios and R. Yturriaga. 2000. Systemic nocardiosis of fatal outcome in a previously health girl. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **18**(9):485-6.
83. Singh, N. P., R. Goyal, V. Manchanda, and P. Gupta. 2003. Disseminated nocardiosis in an immunocompetent child. *Ann. Trop. Paediatr.* **23**(1):75-8.
84. Schiff, T. A., M. M. McNeil, and J. M. Brown. 1993. Cutaneous *Nocardia farcinica* infection in a nonimmunocompromised patient: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **16**(6):756-60.
85. Ingole, K. V., R. P. Fule, and S. V. Jalgaonkar. 1995. Primary cutaneous disease due to *Nocardia asteroides* a case report. *Indian. J. Med. Sci.* **49**(10):231-2.
86. Freitas, V., A. Sumoza, R. Bisotti, M. Mujica, A. Cabrera, M. Costa, R. Anguilo, and K. Rolston. 1995. Subcutaneous *Nocardia asteroides* abscess in a bone marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplant.* **15**(1):135-6.
87. Kannon, G. A., M. K. Kuechle, and A. B. Garrett. 1996. Superficial Cutaneous *Nocardia asteroides* infection in an immunocompetent pregnant woman. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**(5):1000-2.

88. Coutant-Perronne, V., V. Lutz, J. L. Mainardi, J. F. Acar, P. Kugelstadt, and F. Goldstein. 1995. Meningitis caused by *Nocardia* without brain abscess detectable by computed tomography. *Presse. Med.* **24**(27):1271.
89. Roberts, S. A., J. Bartley, G. Braatvedt, and R. B. Ellis-Pegler. 1995. *Nocardia asteroides* as a cause of sphenoidal sinusitis: case report. *Clin. Infect. Dis.* **21**(4):1041-2.
90. Clenney, T. L., M. D. Hammond, P. P. McKeown, D. A. Holt, and P. M. Wallach. 1993. Cardiac tamponade due to *Nocardia asteroides*. *Chest.* **103**(2):641-2.
91. Salinas-Carmona, M. C., M. A. Castro- Corona, A. Licón Trillo, P. Boiron, O. Welsh, S. Nagesh, K. D. Eisenach, and A. Rendon. 1997. Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* in non-immunocompromised patient. *J. Mycol. Med.* **7**:47-50.
92. Jastrzemski, S. A., A. S. Teirstein, S. D. Herman, L. R. DePalo, and P. A. Lento. 2002. Nocardiosis presenting as an anterior mediastinal mass in a patient with sarcoidosis. *Mt. Sinai. J. Med.* **69**(5):350-3.
93. Simpson, A. J., P. A. Jumaa, and S. S. Das. 1995. Breast abscess caused by *Nocardia asteroides*. *J Infect.* **30**(3):266-7.
94. Valbuena Alvarez, R., J. Cajide Montero, R. Ortiz Cabria, L. Santos-Ascarza Tabares, J. Rodriguez de la Rúa Roman, M. de la Rosa Kehrmann, S. Losada Palmon, and A. Barreiro Mouro. 1996. Nocardiosis sistémica aguda. Absceso renal. *Arch. Esp. Urol.* **49**(5):529-31.

95. Carriere, C., H. Marchandin, J. M. Andrieu, A. Vandome, and C. Perez. 1999. *Nocardia* thyroiditis: unusual location of infection. *J. Clin. Microbiol.* **37**(7):2323-5.
96. Eggink, C. A., P. Wesseling, P. Boiron, and J. F. Meis. 1997. Severe keratitis due to *Nocardia farcinica*. *J. Clin. Microbiol.* **35**(4):999-1001.
97. Perez-Santonja, J. J., H. F. Sakla, J. L. Abad, A. Zorraquino, J. Esteban, and J. L. Alio. 1997. Nocardial keratitis after laser in situ keratomileusis. *J. Refract. Surg.* **13**(3):314-7.
98. Nascimento, E. G., M. J. Carvalho, D. de Freitas, and M. Campos. 1995. Nocardial keratitis following myopic keratomileusis. *J. Refract. Surg.* **11**(3):210-1.
99. Colomina, J., L. Esparza, J. Buesa, and J. Mari. 1997. Corneal ulcer caused by *Nocardia asteroides* after penetrating keratoplasty. *Med. Clin.* **108**(11):424-5.
100. Friling, R., P. Yagupsky, I. Rosenblatt, N. Keller, T. Tessler, B. Z. Biedner, T. Lifshitz, and Y. Yassur. 1995. Corneal ulcer in a child caused by *Nocardia asteroides* following corneal perforation. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus.* **32**(1):55-6.
101. Knox, C. M., J. P. Whitcher, V. Cevallos, T. P. Margolis, and A. R. Irvine. 1997. *Nocardia* scleritis. *Am. J. Ophthalmol.* **123**(5):713-4.
102. Choudhry, S., S. K. Rao, J. Biswas, and H. N. Madhavan. 2000. Necrotizing nocardial scleritis with intraocular extension: a case report. *Cornea.* **19**(2):246-8.
103. Welsh, O. M. C. Salinas, M. A. Rodríguez. 1995. Mycetoma. *In: Infectious*

Diseases. 6a ed. p. 1402-1406. P.D. Hoeprich, M.C. Jordan, A.L. Ronald. (eds.). J.B Lippincott Co. Philadelphia. USA.

104. Cross, T. 1993. Nocardioform Actinomycetes. *In*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. p 625-650. S. T. Williams. M. E. Sharpe, and J.G. Holt (Ed.).The Williams & Wilkins Co., Baltimore. USA

105. Angeles, A. M., and A. M. Sugar. 1987. Rapid Diagnosis of Nocardiosis with and enzyme Immunoassay. *J. Infect. Dis.* **155**(2):292-6.

106. Kjelstrom, J. A., and B. L. Beaman. 1993. Development of Serological Panel for the Recognition of Nocardial Infections in Murine Model. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:291-301.

107. Salinas-Carmona, M. C., O. Welsh, and S. M. Casillas. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2901-6.

108. Ortiz-Ortiz, L., and L. F. Bojalil. 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of *Nocardia* organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of *Nocardia* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **12**:225-9.

109. Wallece, R. J. Jr., M. Tsukamura, B. A. Brown, J. Brown, V. A. Steingrube, Y. Zhang, and D. R. Nash. 1990. Cefotaxime-resistant *Nocardia asteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica*. *J. Clin. Microbiol.* **28**(12):2726-32.

110. Carson, M., and A. Hellyar. 1994. Opacification of Middlebrook agar as an aid in distinguish *Nocardia farcinica* within the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* **32**(9):2270-1.

111. Provost, F., L. Polonelli, S. Conti, P. Fisicaro, M. Gerloni, and P. Boiron. 1995. Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* **33**(1):8-10.
112. Biehle, J. R., S. J. Cavalieri, T. Felland, and B. L. Zimmer. 1996. Novel Method for Rapid identification of *Nocardia* species by detection of preformed enzymes. *J. Clin. Microbiol.* **34**(1):103-7.
113. Steingrube, V. A., B. A. Brown, J. L. Gibson, R. W. Wilson, J. Brown, Z. Blacklock, K. Jost, S. Locke, R. F. Ulrich, and R. J. Wallace Jr. 1995. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* **33**(12):3096-101.
114. Workman, M. R., J. P. Howard, M. Yates, D. Beighton, and M. W. Casewell. 1998. Identification and antibiotic susceptibility of *Nocardia farcinica* and *Nocardia nova* in the UK. *J. Med. Microbiol.* **47**:85-90.
115. Laurent, F. J., F. Provost, and P. Boiron. 1999. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**(1):99-102.
116. Conville, P. S., S. H. Fischer, C. P. Cartwright, and F. G. Witebsky. 2000. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **38**(1):158-64.
117. Kiska, D. L., K. Hicks, and D. J. Pettit. Identification of Medically relevant *Nocardia* species with and abbreviated battery of test. 2002. *J. Clin. Microbiol.* **40**(4):1346-51.

118. Salinas-Carmona, M. C., L. Vera, O. Welsh, and M. Rodríguez-Quintanilla. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl. Bakt.* **276**:390-397.
119. Myrvick, N. Q., N. Pearsall, and R. S. Weiser. 1977. *Bacteriología y Micología Médica*. 1a ed. p 35-428. Ed. Interamericana. México.
120. Vera Cabrera, L. 1990. Aislamiento y Purificación de dos antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis*. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina, UANL.
121. Vera-Cabrera, L., M. C. Salinas-Carmona, O. Welsh, and M. Rodríguez-Quintanilla. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbil.* **30**(5):1183-1188.
122. Bradford, M. 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**:248-54.
123. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
124. Rivera-Morales, L. G. 1990. Evaluación de la Fagocitosis y Digestión Intracelular por Leucocitos Polimorfonucleares de Individuos Sanos Para Dos Especies de Estafilococos Coagulasa Negativos. Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica. Facultad de Medicina, UANL.
125. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:4350-4354

126. Salinas-Carmona, M. C., M. A. Castro-Corona, J. Sepulveda-Saavedra, and L. I. Pérez. 1997. Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4(2):133-7.
127. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, USA.
128. Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino, and F. S. Collins. 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acids. Res. 19(5):1154.
129. Rico, G., R. Ochoa, A. Oliva, A. Gonzalez-Mendoza, S. M. Walker, and L. Ortiz-Ortiz. 1982. Enhanced resistance to *Nocard*

126. Salinas-Carmona, M. C., M. A. Castro-Corona, J. Sepulveda-Saavedra, and L. I. Pérez. 1997. Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4(2):133-7.
127. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, USA.
128. Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino, and F. S. Collins. 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucleic Acids. Res. 19(5):1154.
129. 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(4):1688-93.
130. Graham, I. A., and P. J. Eastmond. 2002. Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. Progress in Lipid Research. 41:156-181.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Adyuvante incompleto de Freund
BHI	Medio de infusión cerebro corazón (Brain heart infusion)
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine serum albumin)
°C	Grados centígrados
% C	Porcentaje de agente entrecruzador (bis-acrilamida)
cbp	Cuanto baste para
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleosidos difosfato
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
Fig.	Figura
g	Gramos
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
IgM	Inmunoglobulina M
kDa	kilodaltons
L	Litro (s)
M	Concentración molar
mg	Miligramo (s)
µg	Microgramo (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
µl	Microlitro (s)
mM	Concentración milimolar
µM	Concentración micromolar

ng	Nanogramo (s)
p	Página
PA	Producto amplificado
pb	Paraes de bases
PBS	Amortiguador de salina-fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	$-\log [H^+]$
PM	Peso molecular
%p/v	Porcentaje peso/volumen
%T	Porcentaje total de acrilamida-bisacrilamida en el gel
%C	Porcentaje total de bisacrilamida en el total de acrilamida
SDS	Lauril sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
TA	Temperatura ambiente
TBS	Solución Tris amortiguada con sodio
TEMED	N,N,N',N',tetrametiletilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TTBS	Solución Tris amortiguada con sodio más Tween
Tm	Temperatura de alineamiento
U	Unidades internacionales de enzima
UFC	Unidades formadoras de colonias
v	Voltios
X	Veces de concentración

## APÉNDICES

**APÉNDICE A****NOMENCLATURA PARA LOS aminoácidos**

<b>A</b>	<b>Alanina</b>
<b>R</b>	<b>Arginina</b>
<b>N</b>	<b>Asparagina</b>
<b>D</b>	<b>Acido aspártico</b>
<b>C</b>	<b>Cisteína</b>
<b>Q</b>	<b>Glutamina</b>
<b>E</b>	<b>Acido glutámico</b>
<b>G</b>	<b>Glicina</b>
<b>H</b>	<b>Histidina</b>
<b>I</b>	<b>Isoleucina</b>
<b>L</b>	<b>Leucina</b>
<b>K</b>	<b>Lisina</b>
<b>M</b>	<b>Metionina</b>
<b>F</b>	<b>Fenilalanina</b>
<b>P</b>	<b>Prolina</b>
<b>S</b>	<b>Serina</b>
<b>T</b>	<b>Treonina</b>
<b>W</b>	<b>Triptofano</b>
<b>Y</b>	<b>Tirosina</b>
<b>V</b>	<b>Valina</b>

**APÉNDICE B****EQUIPO**

1. Agitador magnético ( Corning ) RC-353.
2. Baño de agua ( American ) B6990.
3. Cámara de electroforesis ( BIO-RAD ) Model Mini Protean II.
4. Cámara de electroelución ( BIO-RAD ).
5. Cámara de transferencia ( BIO-RAD ) Mini Trans Blot Cell.
6. Campana para PCR
7. Centrífuga ( Beckman ) Allegra 64R.
8. Centrífuga ( Beckman ) TJ-6.
9. Espectrofotómetro (Beckman) DU 7500.
10. Fuente de poder ( BIO-RAD ) Model 3000/300.
11. Homogenizador ( Ever-bach ).
12. Incubadora ( Control Environment ) NARCO.
13. Incubadora con agitación ( GCA/Presicion Scientific ).
14. Liofilizadora ( VIRTIS ).
15. Microscopio ( Zeiss ).
16. Micro-Shaker II ( Dynatech ).
17. Potenciómetro ( Beckman ) 43 pH Meter.
18. Refrigerador ( American Sci. ) Ultra low.
19. Refrigerador ( Kelvinator ).
20. Termociclador (Perkin Elmer)
21. Termociclador (JM Research)
20. Thermix Stirrer ( Fisher ).



