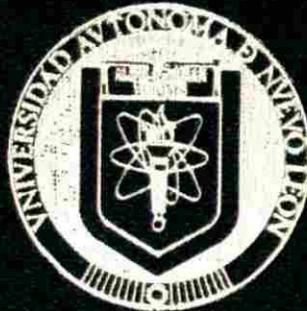


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**"LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEINAS
INTRACELULARES DE ACTINOMICETOS
PRODUCTORES DE MICETOMA EN ANIMALES
INFECTADOS O INMUNIZADOS"**

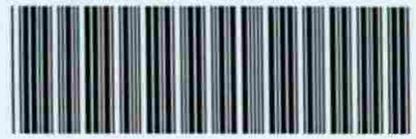
POR:

Q.F.B. IRMA LORENA MOLINA ESPARZA

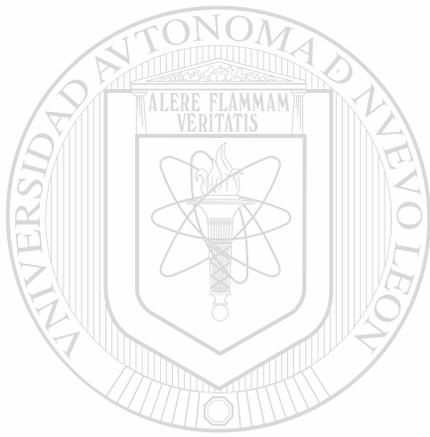
**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad
en Inmunología.**

MONTERREY, N. L., 2002

TM
OR82
A35
M6
2002
c.1



1080116484

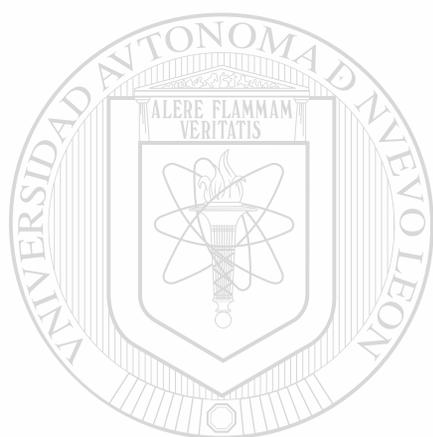


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**"LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS
INTRACELULARES DE ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE MICETOMA EN
ANIMALES INFECTADOS O INMUNIZADOS"**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

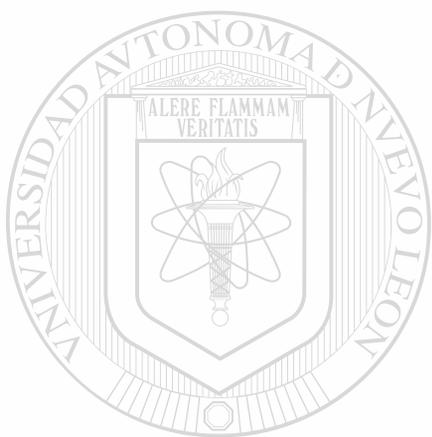
POR:

Q.F.B IRMA LORENA MOLINA ESPARZA

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

Octubre, 2002

TM
QR 82
· A35
M6
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

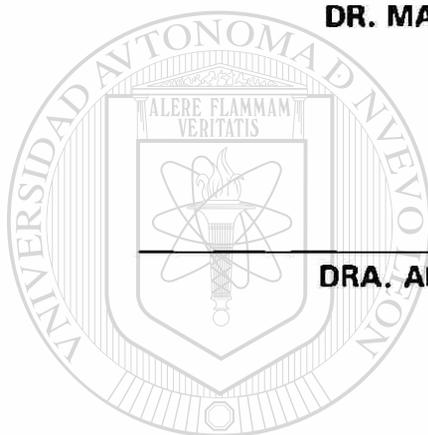


**LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS INTRACELULARES DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE MICETOMA EN ANIMALES
INMUNIZADOS O INFECTADOS**

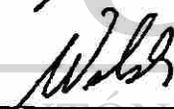
Aprobación de la Tesis:



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Director de Tesis



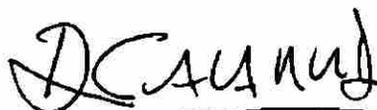
DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Comisión de Tesis



DR. OLIVERIO WELSH LOZANO
Comisión de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

DEDICATORIA



A toda mi familia por brindarme su apoyo y confiar siempre en mi, en especial a mis padres **Ma. Patrocinia Esparza Hernández y Adán Molina Ruíz** ya que sin ellos no sería quien soy.

A **Omar** por apoyarme en todo lo que hago y estar siempre a mi lado.

Y lo más importante a **Dios** gracias por dejarme llegar a alcanzar una meta más en mi vida acompañada de mis seres queridos.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Mario Cesar Salinas Carmona** por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en el departamento de Inmunología bajo su asesoría.

A la **Dr. Alma Yolanda Arce de Mendoza** y el **Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza** por sus sugerencias y haber sido mis maestros.

Al **Dr. Lucio Vera Cabrera** y **Wendí** del Departamento Interdisciplinario de Dermatología por gentilmente haberme ayudado al principio de este trabajo.

A la **M.C Isabel** y la **Q.F.B. Alejandra** por haberme enseñado y ayudado a realizar este trabajo, además de ser excelentes personas.

A todo el personal que trabaja en el departamento de Inmunología **Dr. Juan Manuel Solís, Dr. Angeles Castro, Dr. Ernesto Torres, Edith, Paty, Aracely, Lizzy, Brenda, Alejandro, Carlitos, Fransisco, Carmelita, Reynaldo y Santana.**

A mis compañeros de generación **Teresa, Ariana, Angélica, Luis Miguel, Blanca, Marcela** y en especial a **Graciela** y **Adrián** por brindarme su amistad incondicional.

A mis compañeros de laboratorio **Juan Manuel, Lupita, Lissette** y **Elizabeth** por su compañerismo y amistad.

A las secretarías de postgrado por su trato amable y servicialidad en todo momento en especial a **Norma** y **Paty**.

A **CONACYT** por el apoyo económico.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
V. MATERIAL Y MÉTODOS	20
1.-Material Biológico.	20
1.1 Animales de experimentación	20
1.2 Cepas bacterianas	20
2.-Obtención de la suspensión unicelular de las bacterias	21
2.1 Método de Vaciado en Placa	21
3.-Obtención de los extractos celulares de las cepas bacterianas	22
3.1 Determinación de proteínas por el procedimiento de Bradford.	22
4.Determinación del patrón de proteínas de los extractos celulares de <i>S. somaliensis</i> y <i>A. madurae</i> .	23
4.1 Tinción de Coomassie	23
4.2 Tinción argéntica.	24
5. Infección de los animales con <i>Streptomyces somaliensis</i> <i>Actinomadura madurae</i> y <i>Nocardia brasiliensis</i> .	24
5.1 Infección de ratones BALB/c	24
5.2 Infección de ratas Lewis	24
5.3 Infección de conejos Nueva Zelanda	25

6. Inmunización de los animales con <i>Streptomyces somaliensis</i>	25
<i>Actinomadura madurae</i> y <i>Nocardia brasiliensis</i> .	
6.1 Inmunización de Ratones BALB/c	25
6.2 Inmunización de Ratas Lewis	25
6.3 Inmunización de Conejos Nueva Zelanda	25
7. Identificación de la respuesta de anticuerpos contra	26
antígenos proteicos de <i>Streptomyces somaliensis</i> , <i>Nocardia</i>	
<i>brasiliensis</i> y <i>Actinomadura madurae</i> en las diferentes especies	
de animales infectados o inmunizados.	
7.1 Obtención de los sueros	26
7.2 Inmunolectrotransferencia	26
7.2.1. Electroforesis en gel SDS-PAGE en gradiente 8.75%-18% en	26
condiciones desnaturizantes.	
7.2.2. Transferencia de los extractos celulares bacterianos a papel	27
de nitrocelulosa	
7.2.3. Inmunolectrotransferencia revelada con sueros de	27
animales inmunizados o infectados con <i>A. madurae</i> ,	
<i>S. somaliensis</i> y <i>N. brasiliensis</i> .	
8. Identificación de reacciones cruzadas entre los sueros anti- <i>A.</i>	28
<i>madurae</i> , <i>S. somaliensis</i> y <i>N. brasiliensis</i> .	
VI. RESULTADOS	29
1. Obtención de la suspensión celular bacteriana.	29
2. Obtención de los Extractos Celulares Bacterianos.	29
3. Determinación del patrón de proteínas del extracto proteico de	30
<i>Streptomyces somaliensis</i> y <i>Actinomadura madurae</i> .	
4. Infección de animales con los extractos celulares bacterianos	31

5. Determinación de la respuesta inmune humoral de los inmunizados o infectados mediante inmunoelectrotransferencia.	32
6. Identificación de reacciones cruzadas entre los sueros anti- <i>A. madurae</i> , <i>S. somaliensis</i> y <i>N. brasiliensis</i> .	40
VII. DISCUSIONES	46
VIII. CONCLUSIONES	51
IX. REFERENCIAS	52
X. LISTA DE ABREVIATURAS	59
XI. APÉNDICE	60
XII. TABLAS	64
XIII. GRÁFICAS	70



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Los actinomicetos son bacterias saprofitas del suelo que participan en la descomposición de productos orgánicos de origen vegetal y animal, un número reducido de estos microbios producen enfermedad en el hombre, entre los que se encuentran *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura madurae* y *Nocardia brasiliensis*. Estas bacterias pertenecen al orden de los actinomycetales, y son los principales agentes productores de micetoma, el cual al ser producido por bacterias se denomina actinomicetoma y por hongos eumicetoma.

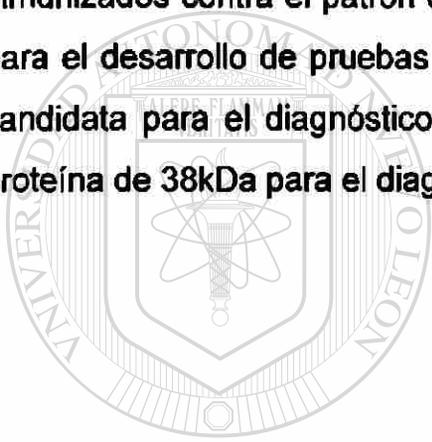
En México el 86% de los casos de actinomicetoma es producido por *Nocardia brasiliensis*, el 10% por *Actinomadura madurae* y el 2% por *Streptomyces somaliensis*.

Debido a que las bacterias antes mencionadas son las causantes de más del 98% de los casos de actinomicetoma a nivel mundial, a la necesidad de pruebas de diagnóstico rápidas y efectivas, además de los pocos estudios reportados sobre *S. somaliensis* y *A. madurae*, en este estudio se compara la respuesta de anticuerpos anti-proteínas intracelulares de *A. madurae*, *S. somaliensis* y *N. brasiliensis* en ratas Lewis, conejos Nueva Zelanda y ratones BALB/c, inmunizados contra infectados para la identificación de antígenos inmunodominantes.

Se infectaron los animales con suspensiones unicelulares de *S. somaliensis* (ATCC 19437), *A. madurae* (ATCC 19425) o *N. brasiliensis* (ATCC 700358) cultivadas por 7 días las dos primeras y por 3 días la última en caldo infusión cerebro corazón (BHI), así como también se inmunizaron animales con los extractos celulares de cada una de las bacterias, obtenidos a partir de la bacteria cultivada en BHI, la cual después de 15 días se lavó, deslipidizó, sonicó, dializó y por último se liofilizó. Una vez obtenidos los sueros de los animales, se determinó el patrón de proteínas reconocidas por los mismos por inmunoelectrotransferencia,

encontrando que los sueros de los animales inmunizados e infectados con *S. somaliensis* reconocen bandas de 28 y 32 kDa, sin embargo solo los ratones BALB/c y ratas Lewis infectados reconocen una banda de 53kDa. Por otra parte los sueros de los animales infectados e inmunizados con *A. madurae* reconocen ciertas bandas de 28 y 35kDa y los ratones BALB/c y las ratas Lewis infectados una banda de 38kDa y por último los animales inmunizados e infectados con *N. brasiliensis* reconocen bandas de 24 y 61kDa ya antes reportadas.

Con esto concluimos que sí existe diferencia en cuanto al patrón de proteínas reconocidas por los sueros de ratones BALB/c y ratas Lewis inmunizados contra el patrón de los infectados, lo cual puede ser de gran utilidad para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido. La proteína de 53kDa es candidata para el diagnóstico serológico de infecciones por *S. somaliensis* y la proteína de 38kDa para el diagnóstico serológico de infecciones por *A. madurae*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son bacterias saprofitas del suelo que participan en la descomposición de productos orgánicos de origen vegetal y animal, además de producir antibióticos y enzimas de valor industrial. Algunos son agentes de enfermedad en el hombre, los animales y las plantas. Aunque infrecuentemente reportados en la clínica en el pasado, actualmente se reconocen como causa de morbilidad y muerte, tanto en hospederos inmunocomprometidos como en inmunocompetentes(1-7,53).

Los actinomicetos patógenos para el hombre se clasifican en el orden Actinomycetales. Estos muestran algunas características semejantes a los hongos como: a) la ramificación en tejidos al causar micetoma, b) la formación de una extensa red filamentosa en cultivos y c) la producción de infecciones crónicas. No obstante, el análisis de la pared celular muestra la presencia de ácido murámico característico de las bacterias, que junto con la ausencia de núcleo unido a la membrana, la falta de mitocondria, el tamaño bacteriano típico y la sensibilidad a los antibióticos antibacterianos definen a estos microorganismos como bacterias y no como hongos(11).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Existen una amplia variedad de géneros dentro de los actinomicetos de interés médico tanto aerobios como anaerobios, y entre las formas aerobias se encuentran *Nocardia*, *Streptomyces* y *Actinomadura*, las cuales son agentes productores de micetoma.

El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica que consiste en lesiones inflamatorias deformantes, no dolorosas, localizadas y fístulas que afectan tejido cutáneo, subcutáneo, músculo y órganos adyacentes al sitio de la lesión(8).

La enfermedad es el resultado de la implantación traumática de microorganismos del suelo dentro de los tejidos. Las lesiones se componen de abscesos, granulomas y fístulas que drenan material purulento que contiene granos que son característicos del agente etiológico. La triada de tumefacción, fístulas y granos se utiliza para definir el término micetoma, este puede ser producido por bacterias y hongos del suelo (8).

Históricamente el micetoma fue descrito por primera vez como entidad médica por el Dr. John Gill en 1842, mientras el trabajaba en la provincia de Madura en la India, de ahí su designación a esta enfermedad como pie de Madura, aunque ya antes en la India se había observado este trastorno del pie, descrito en el Atharva-Veda con el nombre de Padavalmika o pie hormiguero.

En 1846, se confirmó la existencia de la enfermedad mediante otro informe de dispensario realizado por Coleebrok y posteriormente en 1860 Carter utiliza por primera vez el término micetoma para designar a todos los tumores producidos por hongos. No obstante en 1906 Brump propuso el término de Madurella para un hongo aislado de un gránulo negro en un paciente y no fue sino hasta 1913 cuando Pinoy describió casos de micetoma debidos a actinomicetos y clasificó al micetoma en eumicetoma cuando es producido por un hongo y actinomicetoma si el agente etiológico es una bacteria. Y esta clasificación fue definida de nuevo por Chalmer y Archibald en 1916 y por Lavalle en 1962(9).

En los humanos el micetoma se presenta en ambos sexos, pero es más común en hombres que en mujeres en una proporción 4:1, se han reportado además en niños y en adultos de 80 años de edad, aunque es más frecuente en individuos entre la segunda y cuarta década de la vida(9).

Es probable que estado nutricional, susceptibilidad a la infección, respuesta inmune y tratamiento inicial, determinen que se resuelva la infección o que se instale la entidad con el cuadro clínico característico(1).

La prevalencia de los agentes causales de esta entidad varia de país en país. La infección ya sea actinomicótica o eumicótica es más frecuente en países de climas templados, se ha reportado en América, Europa, África y Asia, los países mas afectados son India, Sudán, Senegal, Somalia, Venezuela y México(9, 43).

Entre las bacterias que producen micetoma se encuentran *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia asteroides* y *Nocardia caviae*.

El género *Nocardia* se encuentra muy relacionado a otros que poseen abundantes ácidos micólicos en su pared celular, entre los que se encuentran los géneros *Corynebacterium*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y *Actinomyces*(1,11).

Las Nocardias, son bacterias aérobias, gram positivas, no móviles, no esporuladas, de forma bacilar, filamentosas, parcialmente acidorresistentes, y poseen pared celular tipo IV la cual esta compuesta de un peptidoglicano con ácido meso-diaminopimélico, un polímero de arabinosa-galactosa, ácidos micólicos complejos con longitud de cadena de 44 a 64 átomos de carbono, ácidos grasos saturados e insaturados, ácido 10-metil esteárico (tuberculoesteárico), fosfolípidos que incluyen difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilinositolmanósidos y además, menaquinonas tetrahidrogenadas con 8 unidades isopreno o dihidrogenadas con 9 unidades isopreno. El porcentaje molar G +C del DNA está en el rango de 64 a 72(1,3,4,7).

Estos microorganismos desdoblan los azúcares por oxidación e hidrolizan a las proteínas, lo cual constituye la base para su diferenciación bioquímica; en agar Sabouraud crecen en un periodo de 4 a 5 días a una temperatura que oscila entre los 27 y 37° C. Las colonias presentan pliegues irregulares, están resaltadas

y pueden ser lisas o rugosas, de color blanco-amarillentas. Sin embargo, cuando crecen en medio líquido, como el medio de infusión cerebro corazón(BHI), se origina la formación de una película en la superficie de apariencia seca y cerosa. La presencia de elementos miceliares permite diferenciar a las Nocardias de las micobacterias atípicas y saprofitas(13).

Las especies patógenas más importantes para el hombre son *N. asteroides* y *N. brasiliensis*(1). Estos gérmenes son saprofitos del suelo, los cuales están ampliamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales de algunos países de Centroamérica, Venezuela, Colombia, Brasil, Estados Unidos de Norteamérica y México. En este último, el 98% de los micetomas es causado por actinomicetos, de los cuales el 86% es causado por *N. brasiliensis*(43).

La incidencia mundial más alta de micetoma esta comprendida alrededor del trópico de cáncer, entre las latitudes 15° S y 30° N. Las regiones endémicas de México y Sudán tiene una época lluviosa de julio a octubre y una seca de octubre a marzo, y una seca y caliente de marzo a junio. La cantidad de precipitación también coincide, variando de 50 a 500 mm. La frecuencia de la enfermedad es más alta en áreas rurales, donde la exposición al suelo, la ocupación, la salud, y el hábitat pueden ser factores contribuyentes. Los estados mas afectados de la República Mexicana son Morelos, Jalisco, Veracruz, San Luis Potosí, Querétaro, Puebla, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León. En el continente Africano se localizan en Sudán, Senegal y Somalia. La India es el país asiático que presenta el mayor número de casos(9).

Actualmente se conocen cinco formas básicas de la infección por Nocardias: Nocardiosis cutánea, subcutánea y linfocutánea (esporotricoides), sistémica y actinomicetoma(3).

La infección por Nocardia también ha sido reconocida en forma natural en los animales, siendo descrita en vacas, cabras, cerdos, ovejas, caballos, perros, gatos, primates, armadillos, venados, mamíferos marinos, aves y peces(3).

N. asteroides fue descubierta por el médico veterinario francés Nocard en 1888 a partir de una enfermedad que aun sigue afectando al ganado bovino, la mastitis. Esta bacteria produce la nocardiosis humana, la cual es una enfermedad caracterizada por la formación de múltiples abscesos en el pulmón o en el sistema nervioso central.

Por otro lado, *N. brasiliensis* es uno de los agentes responsables del micetoma, el cual se localiza frecuentemente en la piel y en el tejido subcutáneo(13).

Por lo general, la nocardiosis se presenta como una infección oportunista, preferentemente en aquellos individuos que se encuentran inmunocomprometidos, tal y como sucede con los pacientes afectados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, o bien, los que se encuentran bajo un tratamiento antitumoral o posttransplante, lo cual constituye uno de los factores predisponentes mas frecuentemente asociados a esta infección. Así mismo, también se ha encontrado en asociación en personas que padecen diabetes mellitus(15).

En contraste, el micetoma que se presenta en individuos inmunocompetentes, usualmente comienza en un sitio localizado, tal y como sucede después de la punción causada por una espina o una astilla. Por esto el micetoma se observa frecuentemente en los pies, piernas, brazos y manos. Sin embargo, pueden localizarse en cualquier sitio anatómico, como en la espalda y en los hombros(9,16).

El micetoma inicia como un nódulo indoloro que incrementa de tamaño y puede ser purulento. El pus es descargado a través de varias fistulas y va generalmente acompañado de los típicos "granos", que son característicos de la enfermedad. Estos "granos" representan a las microcolonias del agente infeccioso,

el cual se encuentra rodeado de células inflamatorias. También se pueden presentar alteraciones verrugosas de los bordes de la lesión que resultan en deformaciones de las extremidades inferiores(4,17).

El examen microscópico revela una gran reacción tisular consistente en un exudado rico en polimorfonucleares neutrófilos(PMN) con la subsiguiente formación de abscesos. En la periferia de los mismos se observa una reacción granulomatosa. Las microcolonias se encuentran rodeadas de un material eosinofílico y estas constituyen el centro de esta reacción inflamatoria.

A pesar de que los actinomicetos son abundantes en el medio y existe la posibilidad de adquirirlos, los casos de micetoma son pocos. Por lo tanto, se cree que existen múltiples factores que influyen en la presentación y desarrollo de la enfermedad. No se conocen todavía los mecanismos de patogenicidad de las *Nocardias* ni el papel que juega la respuesta inmune del hospedero durante la infección por estas bacterias.

La respuesta inmune contra *Nocardia* ha sido estudiada empleando animales como modelo experimental, ya que ofrecen la posibilidad de investigar varios aspectos de esta enfermedad(14, 18, 19, 20).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En 1952 González-Ochoa y col. fue el primero en desarrollar el micetoma experimental en ratón por *Nocardia brasiliensis*, por vía intraperitoneal(40), y diez años mas tarde logra inducir el micetoma en ratones los cuales desarrollaron una infección crónica con múltiples abscesos y fístulas que descargaban colonias del agente etiológico(21).

Más tarde, Macotella Ruíz y Mariat(1963) produjeron lesiones con granos al inocular ratones, hámsteres y cobayos con *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, pero la respuesta inmune que se produjo no fue estudiada(22).

Zlotink y Buckley añadieron adyuvante incompleto de Freud para potencial la producción de micetoma en ratones BALB/c y encontraron que los animales infectados tenían un micetoma crónico con producción de granos(14). Rodríguez y col. con el mismo modelo murino de micetoma demostraron la presencia de anticuerpos en el suero de los ratones infectados, y que los títulos de estos incrementaban conforme la infección progresaba(23).

Salinas Carmona y col., han publicado que la inducción de actinomicetoma por *N. brasiliensis* se puede llevar a cabo sin la utilización del adyuvante incompleto de Freud en ratones BALB/c, además de encontrar que los anticuerpos IgM anti-*Nocardia brasiliensis* están presentes a los 7 días después de la inyección bacteriana y se mantiene a la misma concentración a lo largo de la supervivencia del ratón con infección activa. Una fuerte respuesta de anticuerpos IgG anti-*Nocardia brasiliensis* se presenta y se mantiene alta durante la infección activa (32).

En ratones, la patogenia del micetoma por *N. brasiliensis* descrita por González-Ochoa en 1973, por Folb et al, en 1976 y por Ortiz-Ortiz y col, en 1982,(1,19,18) comprende una respuesta inflamatoria inicial constituida predominantemente por infiltrado de leucocitos PMN. Una semana más tarde el sitio de inoculación (comúnmente en el cojinete plantar) muestra una reacción inflamatoria granulomatosa. Después de los 14 días aparece el micetoma característico con granuloma, pequeños abscesos con gránulos actinomicóticos, rodeados de numerosos granulocitos y restos celulares que forman un microabsceso. Los cortes histológicos revelan un anillo de histiocitos y granulocitos que circunscriben el microabsceso y, en una tercera zona excéntrica un infiltrado inflamatorio que contiene macrófagos con abundante citoplasma granular, linfocitos y células epiteliales y plasmáticas.

Para la defensa del huésped contra la infección por *Nocardia* se han propuesto como esenciales tanto los efectos de resistencia innata como los de la inmunidad adquirida específica. En humanos y en animales se han demostrado anticuerpos anti-*Nocardia* y respuesta de hipersensibilidad tardía hacia antígenos de la bacteria, después de la infección con *Nocardia*, si bien su papel en la resistencia del huésped aun no es claro.

Por lo que respecta a la respuesta inmune humoral, se han identificado inmunoglobulinas de los isotipos M, G y A, tanto en la infección experimental en animales como en la infección progresiva en humanos(2, 3, 18, 28, 29, 30). Con estudios de inmunofluorescencia se han detectado anticuerpos en gránulos y células plasmáticas de las lesiones de ratones infectados con *N. brasiliensis* a las dos semanas y en los sueros a los 30-45 días post-infección (18, 29). Sin embargo, la inmunización pasiva por inyección de sueros hiperinmunes a ratones no inmunizados, no ha conferido protección significativa contra el reto con cepas virulentas de *N. brasiliensis*(28, 47), ni ha mostrado, in vitro, actividades opsonicas o microbicidas significativas en presencia de depósitos de C3 en el gránulo (3,4, 10, 20, 46,47); y no solo esto, sino que se ha generado controversia, así, diversos reportes indican que los anticuerpos pueden incrementar la enfermedad nocárdica progresiva.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En lesiones crónicas inducidas por *Nocardia* se han identificado cantidades elevadas de complejos antígeno-anticuerpo los cuales, se sugiere exacerban la severidad y cronicidad de las lesiones y juegan algún papel en el extenso daño tisular característico(2,10,28,41). Así mismo, la presencia de anticuerpos fijadores de complemento a títulos altos en pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* se ha asociado con lesiones tisulares extensas, mala condición general y cronicidad, mientras que los títulos bajos se han detectado en pacientes con infección benigna(3, 28, 41). En ratones CBN(genéticamente deficientes en células B) en los cuales no se han identificado anticuerpos después de inmunizaciones con

células virulentas de *N. asteroides*, se ha demostrado mayor resistencia a la infección por *Nocardia*, que en ratones con respuesta humoral normal(2).

En la preparación de un extracto de *N. brasiliensis* se descubrió la presencia de un efecto mitogénico y de activación policlonal para linfocitos B de ratón, al parecer independiente de linfocitos T(46, 48, 49), Beaman y McNeil (3, 4) hacen notar que no obstante los títulos altos de anticuerpos que se encuentran en la recuperación de una infección o después de inmunización estándar, los anticuerpos realmente son escasos para el efecto que se pretende demostrar, y/o pueden estar dirigidos contra antígenos no relevantes a la virulencia o a la patogenicidad de la cepa de *Nocardia* de interés(3, 4). Así, anticuerpos purificados para antígenos definidos de superficie celular, parecen ser protectores para el huésped: in vitro, IgG policlonal(de conejo) neutralizante de la actividad de SOD de *Nocardia*, incremento en los polimorfonucleares la muerte de células virulentas de *N. asteroides*, e IgM monoclonal de ratón neutralizante de la misma actividad, por transferencia pasiva aumento la capacidad de los ratones para retardar el crecimiento de la bacteria.

Otra bacteria de interés es *Actinomadura madurae*, la cual fue primero reconocida por Vincent en 1894 quien denominó al organismo *Streptothrix madurae* y lo describió como el agente etiológico del pie de madurae. Y en 1970 fue descrito por Lechevalier y Lechevalier(8).

Actinomadura madurae es una especie de actinomiceto aeróbico, grampositivo, no ácido resistente, que forma micelio ramificado debajo de la superficie y se esparce en filamentos aéreos abundantes. Los filamentos se fragmentan en forma de esporas dentro de una vaina y sobre las ramificaciones laterales, en número de 5 a 15. En algunas especies estas esporas tienen forma de gancho o espirales y están cubiertas por un material gelatinoso, que da el aspecto de speudoesporangio. La pared celular es de tipo III, la cual contiene ácido meso-diaminopimélico, como el principal ácido diamino de la pared de

peptidoglucano, también contiene cantidades predominantes de menaquinonas hexahidratadas con 9 unidades isopreno saturadas en los sitios II, III y VIII, difosfatidilglicerol y fosfatidilinositol como principales fosfolípidos y una compleja mezcla de ácidos grasos con ácidos hexadecanoicos, 14-metilpentadecanoicos y 10-metil-octadecanoicos predominantemente., además su porcentaje molar de G+C DNA esta en el rango de 64 a 72 (24).

Antes de los estudios taxonómicos de Trujillo y Goodfellow (25) en 1997, solo dos especies de actinomadura , *Actinomadura madurae* y *Actinomadura pelletieri*, eran clínicamente significativas, pero después de sus estudios se incluye una nueva especie denominada *Actinomadura latina* la cual ha sido aislada solo de micetoma.

Actinomadura madurae, la cual es agente productor de micetoma, es proteolítica y amiloidítica, digiere caseína, gelatina, tirosina, leche con BCP(púrpura de bromocresol) y almidón. Produce ácido a partir de arabinosa y xilosa. No digiere xantina, no utiliza parafina y los nitratos son reducidos a nitritos. La forma común de sus colonias es de color blanco sucio, vellosa o cerosa, rugosa y plegada, con periferia plana. La colonia es de crecimiento moderadamente rápido y crece en medio de BHI, Lownstein-Jensen, o 7H11 a una temperatura óptima de 37°C. En las infecciones producidas por este microorganismo, con frecuencia se observa un borde amplio, elevado, alrededor de los orificios de las fistulas debido a la infiltración y la hiperplasia de las células epidérmicas. Es muy notoria, la afección ósea. Se han observado cambios líticos y proliferativos, se pueden encontrar osteofitos o espículas óseas entre las cavidades ocupadas por grandes granos. In vivo, se elaboran enzimas proteolíticas que pueden afectar el tipo de enfermedad producida (25) y el músculo es fácilmente invadido por el microorganismo. Los "granos" producidos son los más grandes que se han observado en el micetoma, cuyo tamaño promedio es de 1 a 5 mm o hasta de 10 mm, son de color blanco o amarillento, lobados en forma irregular, ovales, serpiginosos o angulares con una cubierta de material eosinofílico homogéneo que

los rodea, pero no hay sustancia de cemento, y son de consistencia suave. *Actinomadura madurae* se encuentra en donde quiera que exista el micetoma. En la mayoría de las zonas templadas y tropicales le corresponde a esta bacteria mas o menos el 10% de los casos. En Túnez se le atribuye el 6% de los casos, en la India el 31% y en México el 10%.

La infección experimental en animales por *Actinomadura madurae* se ha realizado por Rippon y Peck (26) quienes fueron capaces de producir el micetoma en las extremidades posteriores de ratones, para mostrar que la enzima proteolítica, colagenasa, era necesaria para la patogenicidad de este microorganismo. Por otra parte, en 1981 Gumaa y Abu, han informado de actinomictoma experimental en cabras. Compararon *A. madura*, *A. pelletieri* y *N. brasiliensis*, encontrando que *A. pelletieri* fue la más virulenta(27).

Y más recientemente Palma y col. lograron la infección de ratones BALB/c aplicando *A. madurae* acompañado de adyuvante incompleto de Freud, encontrando a la bacteria en el tejido muscular del cojinete plantar (54).

Otro actinomiceto de importancia médica es *Streptomyces*, descrito por Wasklman y Henrich en 1943. Las bacterias del género *Streptomyces* son extensivamente ramificadas que forman filamentos aéreos que no fragmentan (hifa aérea) con cadenas cortas y largas de esporas no móviles, aerobias, gram positivas, catalasa positivas, no móviles, usualmente no ácido alcohol resistentes, más sin embargo algunas veces las esporas aéreas pueden convertirse con el tiempo en ácido alcohol resistentes positivas, causando confusión para diferenciarlas de las de *Nocardia* y *Rhodococcus*(33).

Los estreptomicetos son organismos del suelo que pueden causar micetoma en el hombre, muy difícil de diferenciar del de *Nocardia*(11), son más importantes como fuente de antibiótico que como patógenos ocasionales y entre las especies que son patógenas se encuentra *Streptomyces somaliensis*. *Streptomyces somaliensis* tiene una pared celular característica de tipo I

constituida de glucosamina, ácido murámico, ácido glutámico, alanina y cantidades mayores de ácido LL- diaminopimélico(DAP) y glicina pero no de azúcares característicos y no posee ácidos micólicos. La envoltura celular contiene ácidos grasos iso y anteiso saturados, pero no contiene ácido tuberculoestéarico. Es sensible a la lisosima. Las menaquinonas son hexa u octahidrogenadas con 9 unidades isopreno. El porcentaje molar de G + C de DNA esta en el rango de 69 a 78 (33). Las especies patógenas de *Streptomyces* tienen diversas prevalencias geográficas, ninguna es común en Estados Unidos de Norteamérica. *Streptomyces somaliensis* prefiere regiones áridas con suelo arenoso y es encontrado frecuentemente en África, Arabia, México y porciones de Sudamérica. Este ha también sido identificado como agente etiológico de actinomicetoma en muchos países, incluyendo India, Malasia, México, Nigeria, Arabia Saudita, Somalia, Sudafrica, Sudán, Venezuela y Argelia(31). A esta especie le corresponde el 7% de los casos en todo el mundo, aunque se presenta de forma variable en otros países africanos (Senegal 9%; Chad 14%); en India (6%) y en México (2%) (8). En estos países, esta especie ha sido asociada con micetomas que afectan cabeza y cuello.

En las infecciones causadas por *Streptomyces somaliensis*, los orificios de los trayectos fistulosos no están realizados, ni endurecidos como en las especies producidas por las especies de *Actinomadura* y *Nocardia*. No hay afección ósea extensa, pero el músculo puede estar invadido. Se ha informado de enfermedad craneana y de su presentación como fractura patológica. Los “granos” causados por este microorganismo son muy duros, grandes, de color amarillo a pardos hasta de 2 mm. Hay sustancia de cemento firme, que mantiene unido los filamentos. Cuando se trituran los granos se rompen en fragmentos angulares. La reacción de inflamación alrededor del grano puede ser de dos tipos, en uno hay tres zonas: una zona inmediatamente alrededor del grano de neutrófilos, una zona intermedia de macrófagos y una zona periférica que contiene linfocitos y células plasmáticas. En el tipo dos, no hay zona de neutrófilos y el grano solo esta rodeado por macrófagos y células gigantes(52).

En agar las bacterias del género *Streptomyces* se desarrollan de forma rápida, en cuatro a once días, y el crecimiento es cremoso, rugoso, escamoso. El desarrollo en Lowestein Jensein es mejor, y es común la formación de sectores en las colonias, que ofrece áreas de consistencia variable y de coloración moteada. Se pueden desarrollar áreas de color pardo a negro por debajo de la superficie a menudo es de color amarillo a ocre. Se ha informado de un pigmento pardo difusible. El microorganismo no es fragmentable y se pueden formar artroconidios en cadena. Las preparaciones teñidas muestran filamentos delicados en ramificación cuyo diámetro es de 0.5 a 1 micrómetro. El desarrollo óptimo es a 30° C.

La bacteria no produce proteólisis (gelatina), pero descompone la caseína y la tirosina. Las demás pruebas son negativas entre las que se encuentran la urea, hipoxantina, xantina, reducción de nitritos, y formación de ácido a partir de azúcar. Es sensible a la lisosima y alrededor del 4% son amiloidíticas.

La inducción de micetoma tanto por hongos como por bacterias se ha intentado con la obtención de diferentes resultados. Los mejores resultados se han logrado con actinomicetos. En 1978 Mahgoub infectó ratones inmunocompetentes e inmunodeficientes (New Zealand nu/nu) y solo las cepas atímicas nu/nu fueron infectadas con *Madurella mycetomatis*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura pelletieri* y *Nocardia brasiliensis*. Los ratones inmunocompetentes fueron resistentes a los hongos verdaderos y los actinomicetos (41). A parte de este estudio experimental en animales con *Streptomyces*, no se ha reportado otro.

La infección causada en general por todos los actinomicetos inicialmente provoca en el huésped una respuesta piógena inflamatoria aguda, seguida de reacción inflamatoria crónica y algunas veces diseminación generalizada. El grado y la gravedad de la enfermedad depende del estado físico del paciente y de la

virulencia del microorganismo, al parecer todas las razas humanas parecen ser susceptibles al micetoma(11).

Sin considerar el agente etiológico, la enfermedad clínica es la misma, y al parece tanto los eumicetomas y actinomictomas presentan cuadros clínicos e histológicos muy similares, solo con algunas diferencias(11).

Histológicamente las lesiones son muy similares en todos los agentes causales. Los gránulos se ven en el centro del absceso, frecuentemente recubiertos de una capa de material homogéneo. Este esta rodeado de un gran acumulo de neutrófilos en todos los estados de degeneración, inmediatamente alrededor del absceso hay un área de fibrosis densa y tejido granuloso que es rico en capilares, células epiteloides, macrófagos y células gigantes multinucleadas(33).

El cultivo del microorganismo de la lesión, para la identificación de los actinomictos se utiliza el análisis de la composición de la pared celular, la morfología de las colonias y de sus filamentos y las reacciones fisiológicas como son la utilización de azúcares, la producción de enzimas y su resistencia a sustancias químicas, a demás de utilizarse más recientemente los análisis moleculares(33).

Sin embargo no existe un método óptimo para el aislamiento de los actinomictos aerobios de los especimenes altamente contaminantes y el crecimiento de estas bacterias es lento, tardando de dos a tres semanas para ser identificadas en muestras biológicas. Por lo cual se requieren de nuevos métodos para la identificación de actinomictomas de importancia clínica.

Desde hace mucho tiempo se han realizado varios estudios para establecer una prueba serológica, entre ellos González Ochoa y Baranda en 1953(39), al estudiar el suero de pacientes con infección por *N. brasiliensis*

encontraron que alrededor del cincuenta por ciento tenían anticuerpos fijadores de complemento y ninguno anticuerpos precipitantes, no hubo relación entre el título y la duración, la gravedad o el grado de la enfermedad. Bojalil y Zamora en 1963(34) prepararon un polisacárido a partir de *N. brasiliensis* con el cual pudieron demostrar la presencia de precipitinas en el suero de pacientes y en una reacción a la prueba cutánea específica pero encuentran reacciones cruzadas.

Entre otros estudios realizados con el fin de encontrar antígenos inmunodominante esta el de Magaldi y Mackenzie quienes en 1990 realizaron un estudio comparativo entre los antígenos de diversos actinomicetos por inmunodifusión e inmunolectroforesis(35), encontrando reacción cruzada entre estos.

Sin embargo, en 1987 Angeles y Sugar estandarizaron un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos anti-*Nocardia asteroides* en el cual se encontraba la proteína de 55kDa previamente especificada para esta especie(42).

En 1992, Salinas Carmona y col. identificaron varios antígenos inmunodominantes mediante la técnica de electrotransferencia, identificando tres proteínas inmunodominantes denominadas P61, P26 y P24(5) del extracto crudo de *N. brasiliensis*. Después con el uso de técnicas simples, se logró el aislamiento y purificación de P61 y P24 y con el uso de estos antígenos purificados se desarrolló un método inmunoenzimático en fase sólida (30) que demostró su utilidad clínica.

Los antígenos inmunodominantes, son de gran valor clínico en el serodiagnóstico, por lo que en el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos) en tres diferentes especies de animales, comparando la respuesta de animales inmunizados versus infectados, con el fin de encontrar los antígenos inmunodominantes comunes.



HIPÓTESIS

LAS PROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LOS SUEROS DE ANIMALES INMUNIZADOS CON EXTRACTOS CELULARES DE *Nocardia brasiliensis*, *Streptomyces somaliensis* o *Actinomadura madurae* SON DIFERENTES DE LOS RECONOCIDOS POR LOS SUEROS DE ANIMALES INFECTADOS CON LOS MISMOS MICROORGANISMOS.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la respuesta de anticuerpos de ratones, ratas y conejos infectados y compararla con la respuesta de animales inmunizados con *Nocardia brasiliensis*, *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae*,

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el patrón de proteínas de los extractos celulares de *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae* en geles de poliacrilamida.
2. Estudiar la respuesta de anticuerpos contra antígenos proteicos de *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae* en las diferentes especies de animales infectados o inmunizados mediante inmunoelectrotransferencia.
3. Comparar el patrón de proteínas reconocido por los sueros de los animales infectados versus inmunizados.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Material Biológico:

1.1 Animales de experimentación:

Para este trabajo se utilizaron 6 grupos de 8 ratones BALB/c (hembras o machos de 10-14 semanas de edad), con un peso promedio de 25 g. Esta cepa fue gentilmente donada por el Dr. Hansen de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda, MD) en 1982 y ha sido mantenida en el bioterio del Departamento de Inmunología a una temperatura controlada. Se les proporcionó alimento comercial (Purina de México S.A de C.V) y agua estéril *ad libitum*.

Se utilizaron también 6 grupos de 6 ratas Lewis hembras o machos de 10 semanas de edad, derivadas de cepas originales, donadas gentilmente del Instituto Nacional de Salud (NIH, Bethesda, MD). Estos animales son mantenidos en las mismas condiciones que los ratones.

También se utilizaron 6 grupos de 2 conejos Nueva Zelanda de tres meses de edad.

1.2 Obtención de las cepas bacterianas.

La bacteria *Nocardia brasiliensis* que se utilizaron en este estudio se obtuvo de la lesión de un paciente al cual se le diagnosticó micetoma en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González (U.A.N.L). Este microorganismo fue identificado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por el Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y posteriormente se confirmó su identificación en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta,(GA), Estados Unidos de Norteamérica gracias a la colaboración de June Brown. Esta cepa se denomina HUJEG-1 y esta registrada en La Colección Americana de Células Tipo como ATCC # 700358.

La bacteria de *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae* fue gentilmente proporcionada por el Dr. Lucio Vera Cabrera del Departamento

Interdisciplinario de Dermatología, la cual esta registrada en La Colección Americana de Células Tipo con # 19437 y #19425 respectivamente. Estas bacterias posteriormente fueron cultivadas y mantenidas en agar sangre.

2. Obtención de la suspensión unicelular de las tres especies bacterianas:

Se tomaron algunas colonias del agar Sabouroud para *Nocardia brasiliensis* y en agar sangre para *Actinomadura madurae* y *Streptomyces somaliensis*, y se colocaron en matraces Erlenmeyer(Pyrex) de 125 ml con 30 ml de caldo de cultivo infusión cerebro corazón (BHI, Difco Co.). se incubaron en agitación constante a 37°C durante 48-72 h para *Nocardia brasiliensis* y de 7 a 15 días para *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae* (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific).

Las colonias obtenidas después de este tiempo se colocaron en tubos cónicos de 50 ml (Falcon) con tapones de rosca y se centrifugaron con solución salina fisiológica estéril (solución Salina Estéril 0.85%, Pisa) a 3,000 r.p.m durante 15 minutos en tres ocasiones(Beckman TJ-6). Luego, de decantar el sobrenadante, las colonias obtenidas se disgregaron en un homogenizador de vidrio(Potter- Ebelham Wheaton S.P). El producto obtenido es la suspensión unicelular, a la cual se le determinó cuenta viable por el método de vaciado en placa(36).

2.1 Método de Vaciado en Placa.

De una suspensión unicelular de *A. madurae* o *S. somaliensis* se prepararon diluciones seriadas 1:10, en s.s.e. En caja petri con agar sangre estéril, se vació 0.1mL de la dilución y se extendió con varilla de vidrio, se hizo lo mismo con las diluciones seriadas restantes. Estas placas se incubaron a 37°C por 3 días. El número de colonias en cada placa se contó con ayuda de un cuenta-colonias(Québec Darkfield Colony Counter, Reichert-Jung) y la cantidad de UFC/mL se determinó contando la caja petri que haya contenido entre 30 y 300 colonias, se multiplicó por 10 y por la dilución correspondiente.

3. Obtención del Extracto Celular Bacteriano.

Para obtener masa bacteriana, la suspensión unicelular bacteriana se inoculó en matraces Erlenmeyer de 1 Litro con 160 ml de BHI, se mantuvo a 37° C por 7 días para *Nocardia brasiliensis* en reposo y de 2 a 3 semanas para *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae* en agitación constante. Al final del cultivo el contenido de los matraces se centrifugó a 7000rpm por 15 min(Beckman TJ-6) en tubos cónicos de 50ml con tapón de rosca, una vez separada la masa bacteriana se deslipidizó exhaustivamente con una mezcla de etanol-éter etílico (Baker) en los siguientes volúmenes, 1:1, 1:2, 1:3.

La masa bacteriana se dejó secar, y una vez seca se reconstituyó en tris 0.01 M pH 7.4 con acetato de magnesio 0.01 M (Sigma), que posteriormente se sonicó tres veces por ciclos de dos minutos a 60% de duración del pulso por segundo en un aparato Sonifier (Modelo 450/250 Sonifier, Branson Ultrasonic Corporation). La suspensión se dejó en agitación por 12h a 4°C. Se eliminaron las células intactas por centrifugación a 7000 g por 15 minutos y luego los detritus celulares y la pared celular por centrifugación a 144,000 g por 30 minutos(Ultracentrifuga Beckman Allegra 64R). El sobrenadante recuperado se dializó (membrana Sigma 250-7U) por 24 horas contra agua destilada a 4°C. El dializado se colocó en viales de vidrio en alícuotas de 15mL para posteriormente liofilizarse (liofilizadora LABCONO) y almacenarse a -20 °C hasta que se utilizó; aparte, se separó una pequeña muestra del extracto(1mL) para determinar proteínas por el método de Bradford(37).

3.1 Determinación de proteínas por el procedimiento de Bradford.

Un estándar de albúmina sérica de bovino(Sigma) de concentración 1mg/mL en agua, fue diluido 1:50. Se construyó una curva de calibración con concentraciones del estándar de proteínas de 2 a 18 µg/mL, que se llevaron a un volumen final de 500 µl con agua y que se hicieron reaccionar con 500µl del reactivo de Bradford. Transcurridos 30 minutos a temperatura ambiente se registro la absorbancia a 595nm.

4.Determinación del patrón de proteínas de los extractos celulares de *S. somaliensis* y *A. madurae*.

Una vez obtenidos los extractos proteicos de *S. somaliensis* y *A. madurae* como se mencionó previamente, se determinaron los patrones de proteínas de *S. somaliensis* y *A. madurae* por electroforesis en geles de poliacrilamida de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli(12) con las siguientes modificaciones: Se utilizó un gel concentrador al 5%, 2.7%C y gel de separación en gradiente 8.75-18%, 2.7%C(ver apéndice); los geles fueron construidos en los moldes del equipo de electroforesis Mini-Protean II(BIO RAD) con ayuda del formador de gradiente BIO RAD modelo 385. Como amortiguador de corrimiento se utilizó Glicina 192mM, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3(Reactivos Sigma). Las muestras (volúmenes no mayores de 40 μ l) se mezclaron en proporción 3:1v/v, con amortiguador de muestra 4x que contenía SDS y 2-mercaptoetanol(ver apéndice) y se sometieron a calentamiento en agua a ebullición por 2 minutos, los marcadores de peso molecular (7H, Sigma) sólo por un minuto; enseguida fueron aplicadas en el gel, se agregó amortiguador de corrimiento(ver apéndice) y la electroforesis se efectuó a 80 volts durante una hora y luego a 100 volts por 3.5 horas. Una vez retirado el jul del molde fue teñido con azul de Cómase y con tinción argéntica.

Las bandas correspondientes a los extractos de *S. somaliensis* y *A. madurae* fueron identificadas con referencia a los marcadores de peso molecular: Albúmina sérica bovina 66kDa, Ovalbúmina 45kDa, Gliceraldehido-3P deshidrogenasa 36kDa, Anhidrasa carbónica 29kDa, Tripsinógeno 24kDa, alfa-Lactoalbúmina 14kDa(reactivos de Sigma) y analizadas por densitometría.

4.1 Tinción de Coomassie(50).

Se sumergió el gel en azul de Coomassie R(azul de Coomassie R 250, Sigma, al 0.1% p/v en metanol, Baker, 40% v/v, ácido acético, Baker, 10% v/v), durante 30 minutos en movimiento suave. Se retiró el colorante y se agregó solución para desteñir(metanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v) en cantidad suficiente para

eliminar el exceso de colorante. Finalmente el gel fue transferido a un recipiente con agua destilada.

4.2 Tinción argéntica(51).

Se sumergió el gel en solución fijadora(metanol 50% v/v, ácido acético glacial 12% v/v) durante 20 minutos. Se retiró la solución fijadora y se efectuaron tres lavados de 10 minutos cada uno, con etanol 10%v/v, ácido acético glacial 5% v/v. Se colocó en solución oxidante (dicromato de potasio 3.4mM, ácido nítrico 3.22mM) durante 5 minutos y se lavó 3 veces, 10 min cada vez, con agua. Se sumergió en solución de nitrato de plata (AgNO_3 12mM en agua) inicialmente durante 5 min. en presencia de luz intensa y posteriormente 25 min. en presencia de luz normal. Se retiró la solución de plata y se agregó solución reveladora (carbonato de sodio 0.28M, formol 0.125ml, disueltos y aforados a 250mL de agua) hasta la aparición de bandas, rápidamente se retiró la solución reveladora y se añadió ácido acético 1% v/v para detener la reacción.

Los geles se conservaron en glicerol (Sigma) 10% v/v o bien, fueron deshidratados (secador de geles Ephortec).

5. Infección de los animales con *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura madurae* y *Nocardia brasiliensis*.

5.1 Infección de Ratones BALB/c.

A los ratones del grupo experimental se les administraron volúmenes de 0.1 ml del inóculo de bacterias por vía subcutánea en el cojinete plantar de la pata derecha y en el dorso del animal aplicando $1-5 \times 10^{6-7}$ UFC de *S. somaliensis*, $1-5 \times 10^{7-9}$ UFC de *A. madurae* y 1×10^6 UFC de *N. brasiliensis*

5.2 Infección de Ratas Lewis.

Se les administraron volúmenes de 0.3 ml del inóculo de bacterias por vía subcutánea en el cojinete plantar de la pata derecha y en el dorso del animal aplicando $1-5 \times 10^7$ UFC de *S. somaliensis*, $1-5 \times 10^{8-9}$ UFC de *A. madurae* y 1×10^9 UFC de *N. brasiliensis*.

5.3 Infección de Conejos Nueva Zelanda.

Se les administraron volúmenes de 1.5 ml del inóculo de bacterias por vía subcutánea en el dorso del animal aplicando $1-5 \times 10^{6-8}$ UFC de *S. somaliensis*, $1-7 \times 10^{7-8}$ UFC de *A. madurae* y $1-3 \times 10^{9-11}$ UFC de *N. brasiliensis*.

6. Inmunización de los animales con *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura madurae* y *Nocardia brasiliensis*.

6.1 Inmunización de Ratones BALB/c

Se les administró subcutáneamente 100µg del extracto celular de cada una de las bacterias en estudio disueltas en 0.1ml de solución inyectable estéril(Pisa) emulsificada en 0.1ml de adyuvante incompleto de Freud(Sigma), a los días 0, 15 y 28.

6.2 Inmunización de Ratas Lewis.

Se les administró subcutáneamente 250µg del extracto celular de cada una de las bacterias en estudio disueltos en 0.25ml de solución inyectable estéril(Pisa) emulsificada en 0.25ml de adyuvante incompleto de Freud, al día 0, después de 15 días se les aplicó 100µg del EC disuelto en 0.1ml de solución inyectable estéril más 0.1 ml de AIF, y 50µg del EC disuelto en 0.05ml de solución inyectable estéril más 0.05 ml de AIF al día 28.

6.3 Inmunización de Conejos Nueva Zelanda.

Se les administró subcutáneamente 2.5mg del extracto celular de cada una de las bacterias en estudio disueltos en 1ml de solución inyectable estéril(Pisa) emulsificada en 1ml de adyuvante incompleto de Freud, al día 0, a los días 15 y 28 se les aplicó 1mg del EC disuelto en 1ml de solución inyectable estéril más 1 ml de AIF; y 300µg de EC disuelto en 300µl de agua inyectable estéril a día 35.

Los animales tanto infectados como inmunizados fueron sangrados en los días 0, 30 y 60 días postinfección o postinmunización.

7. Identificación de la respuesta de anticuerpos contra antígenos proteicos de *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae* en las diferentes especies de animales infectados o inmunizados.

Después de infectar o inmunizar ratones, ratas o conejos se llevaron a cabo inmunolectrotransferencias para determinar cuales bandas proteicas son reconocidas por los sueros de los animales tanto inmunizados con el extracto proteico como por los infectados con los actinomicetos.

7.1 Obtención de sueros.

Se obtuvo sangre de los ratones infectados o inmunizados mediante punción en el plexo retroorbital, a los días 0, 30 y 60 días después de ser inmunizados o infectados. El suero se obtuvo por centrifugación a 1500 x g por 5min(centrífuga Beckman TJ-6) y se conservó a -20°C hasta su análisis.

Las ratas fueron sangradas de la misma forma antes descrita y los conejos se sangraron de la vena marginal de la oreja.

7.2. Inmunolectrotransferencia.

7.2.1. Electroforesis en gel SDS-PAGE en gradiente 8.75%-18% en condiciones desnaturalizantes.

Se llevaron a cabo electroforesis en geles PAGE de los extractos celulares bacterianos de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli(12) en gradiente de concentración 8.75-18% en condiciones desnaturalizantes (ver apéndice); Se utilizaron las siguientes cantidades de extracto celular bacteriano utilizando la cámara miniprotean BIORAD con peine de 13cm: 525µg para *S. somaliensis* y *A. madurae* y 1mg para *N. brasiliensis*. Las muestras (volúmenes de 105µl del extracto celular de *S. somaliensis* y *A. madurae* de 5µg/µl de concentración y 12.5µl de extracto celular de *N. brasiliensis* de concentración 83.25µg/µl) se mezclaron en proporción 3:1v/v, con amortiguador de muestra 4x que contenía SDS y 2-mercaptoetanol al 0.05%(ver apéndice) y se sometieron a calentamiento en agua a ebullición por 2 minutos, enseguida fueron aplicadas en el gel, se agregó amortiguador de corrimiento(ver apéndice) y la electroforesis se efectuó a 80 volts durante una hora y luego a 100 volts por 3.5 horas, corrimiento de la

muestra en el gel concentrador y en el gel de separación respectivamente. Una vez que corrió la muestra hasta el borde de la cámara miniprotean esta es desmontada de la misma.

7.2.2. Transferencia de los extractos celulares bacterianos a papel de nitrocelulosa

El gel es colocado en buffer Tri-HCl 25mM, glicina 192mM, metanol 20% v/v(ver apéndice), por 15 minutos, de acuerdo a la medidas del gel se cortan papeles filtro y el papel de nitrocelulosa a transferir los cuales se sumergen en el buffer de transferencia también.

Para la transferencia de las proteínas del gel al papel de nitrocelulosa se uso la técnica de Towbin(49), colocando tres papeles filtro, el papel de nitrocelulosa 0.45 μ de porosidad (BIO-RAD lab), el gel y tres papeles filtro en la cámara de transferencia-Semi-dry (Sigma-Aldrich Semi-dry blotters), conectando el cátodo en la placa superior y el ánodo en la placa inferior, y de acuerdo al área del gel (área del gel x 1.6= mAmp) es la corriente utilizada para llevar a cabo la transferencia al papel de nitrocelulosa por dos horas.

Al terminó de la transferencia, el gel se tiñó con azul de Coomassie para determinar la eficiencia de la transferencia.

El papel de nitrocelulosa, el cual contenía las proteínas del extracto celular respectivo, fue bloqueado con leche descremada Svelty al 3% en PBS(ver apéndice) e incubado a 37°C por 1 hora. Posteriormente se hicieron tres lavados cada uno de 10min con PBS-Tween20 1:1000(ver apéndice). Después el papel se cortó en tiras de 0.5cm de ancho y se guarda a -20°C hasta que sea utilizado.

7.2.3. Inmunoelectrotransferencia revelada con sueros de animales inmunizados o infectados con *A. madurae*, *S. somaliensis* y *N. brasiliensis*.

Las tiras de papel de nitrocelulosa, con las proteínas del extracto celular bacteriano, se colocaron en un portatirillas (BIO-RAD lab.) y se les agregó el suero del animal infectado o inmunizado diluido 1:50 en solución diluyente PBS-tween20 1:1000 con leche descremada al 1% p/v, dejándolo en agitación a temperatura ambiente por 2horas.

Se hicieron tres lavados de 10 min. con PBS-tween20 1:1000.

Luego se agregó el anticuerpo conjugado con peroxidasa(Ig anti-IgG de ratón A9044, anti-IgG de rata A5795 y anti-IgG de conejo A0545 ver apéndice) diluido en PBS-Tween20 1:1000 con leche descremada Svelty al 1% , y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 1 hora.

Después se hicieron tres lavados de 10 min. con PBS-Tween20 1:1000.

La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con tetraclorhidrato de 3,3 diaminobencidina(Sigma) en PBS 0.1M pH 7.5, a la cual se le agregó H₂O₂ (ver apéndice) . Después de unos minutos la reacción se detuvo con HCL 5N.

Las tirillas se lavaron con agua bidestilada y fueron secados entre dos hojas de papel filtro Whatman para su posterior análisis.

A las bandas resultantes se les determina el Rf y el PM con un densitómetro GS 670 Bio-Rad.

8. Identificación de reacciones cruzadas entre los sueros anti- *A. madurae*, *S. somaliensis* y *N. brasiliensis*.

El papel de nitrocelulosa con las proteínas de los extractos celulares de *A. madurae* fueron revelados con sueros de animales infectados o inmunizados con *S.somaliensis* o con *N. brasiliensis* para identificar la presencia de reacción cruzada de anticuerpos anti-proteínas intracelulares de *A. maduare*.

El papel de nitrocelulosa con las proteínas de los extractos celulares de *S. somaliensis* fueron revelados con sueros de animales infectados o inmunizado con *A madurae* o con *N. brasiliensis* para comprobar si desarrollan anticuerpos anti-proteínas intracelulares de *S. somaliensis*. Además el papel de nitrocelulosa con las proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* fueron revelados con sueros de animales infectados o inmunizado con *A madurae* o con *S. somaliensis* para comprobar si desarrollan anticuerpos anti-proteínas intracelulares de *N. brasiliensis*.

Resultados

1. Obtención de la suspensión celular bacteriana.

Se obtuvo la suspensión celular bacteriana de *N. brasiliensis* a las 72 horas de ser sembrada en BHI, se leyó la densidad óptica de la suspensión en un espectrofotómetro a 325nm para ajustar las UFC de acuerdo a la curva de DO y concentración bacteriana desarrollada en el laboratorio, y se ajustó a 1×10^6 UFC para la infección de ratones en el cojinete plantar, 1×10^9 UFC para la infección de ratas en el cojinete plantar y 1×10^9 UFC para la infección de conejos de forma subcutánea en el dorso. Para la infección con *S. somaliensis* y *A. madurae* después de incubarlas por 7 días a 37°C se obtuvo la suspensión celular de las mismas y se contaron las UFC por el método de vaciado en placa.

2. Obtención de los Extractos Celulares Bacterianos.

Se sembraron las bacterias en 15 matraces de 1L con 160 ml de BHI, los cuales a los 7 días para *N. brasiliensis* y 15 días para *S. somaliensis* y *A. madurae* se obtuvieron la masa bacteriana por centrifugación, se proceso para obtener el extracto celular y se obtuvieron las siguientes concentraciones de proteínas de los extractos celulares determinadas por la técnica de Bradford:

Determinación de Proteínas por la Técnica de Bradford de los Extractos Celulares Bacterianos.		
Cepas Bacteriana	Concentración de proteínas en $\mu\text{g/ml}$	Concentración Total mg
<i>Streptomyces somaliensis</i>	1069	34.1
<i>Actinomadura madurae</i>	1640	75.2
<i>Nocardia brasiliensis</i>	83.25	15

3. Determinación del patrón de proteínas del extracto celular de *Streptomyces somaliensis* y *Actinomadura madurae*.

Se determinó el patrón de proteínas por electroforesis en geles SDS-PAGE 8.75-18% de los extractos celulares de *S. somaliensis* y *A. madurae* los cuales fueron teñidos con azul de Coomassie y nitrato de plata encontrando bandas entre los 66 y 14 kDa de peso molecular, cuyos pesos moleculares se determinaron por densitometría. El extracto celular de *A. madurae* presentó 21 bandas con peso molecular en un rango de 86-9 kDa, mientras en el extracto celular de *S. somaliensis* se encontraron 16 bandas con pesos moleculares entre 55-9 kDa como se muestra en la Fig. 1-2.

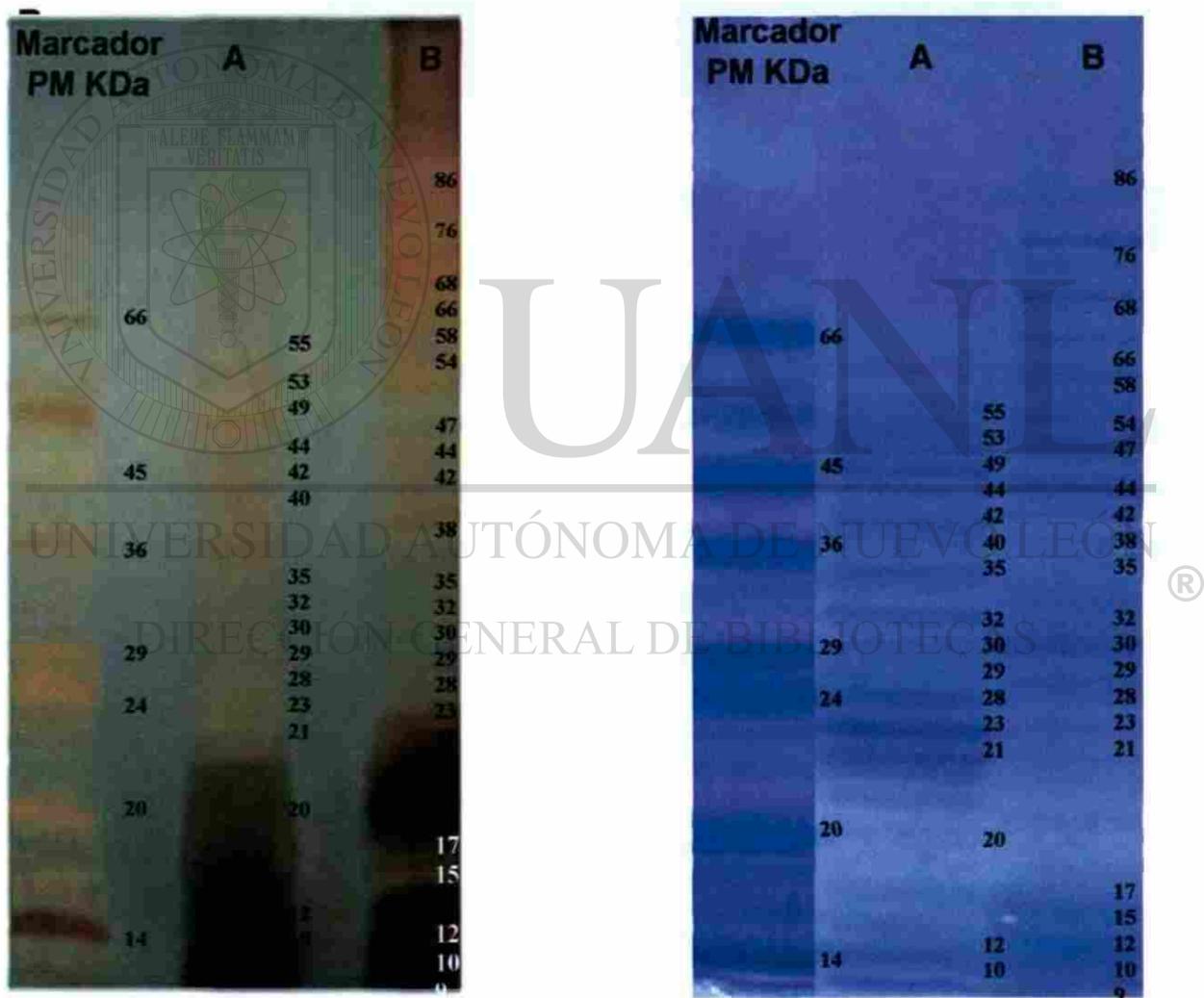


Fig1. Patrón electroforético de los extractos celulares de (A) *S. somaliensis* y (B) *A. madurae* (Electroforesis SDS-PAGE 8-18% teñido con Nitrato de Plata y Azul de Coomassie).

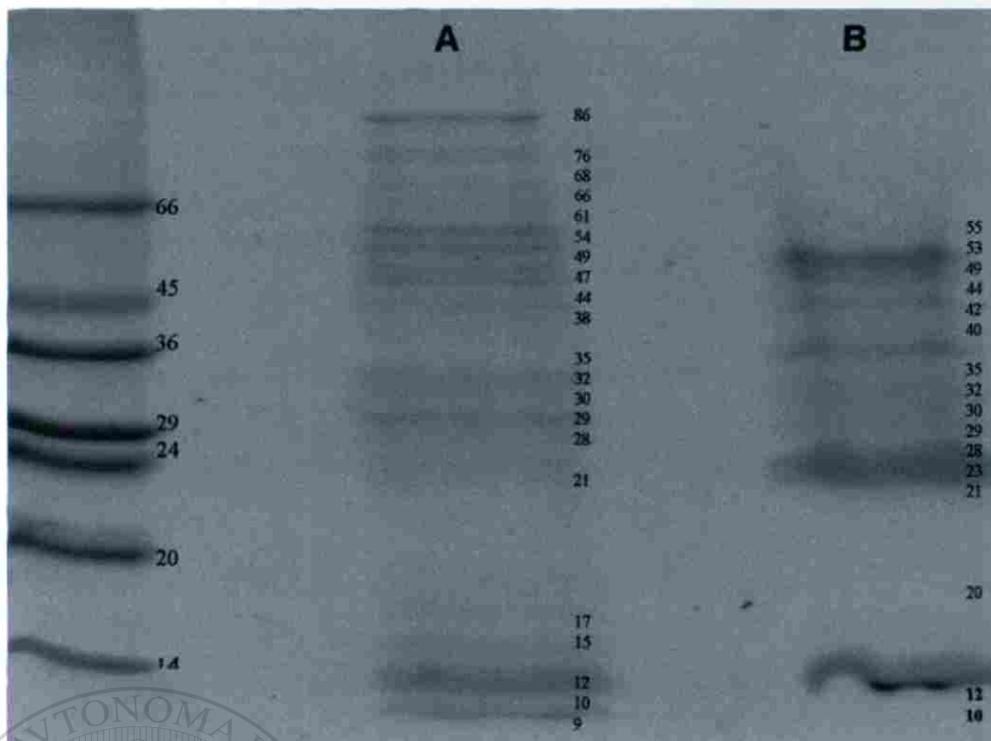


Fig2. Patrón electroforético de los extractos celulares de (A) *A. madurae* y (B) *S. somaliensis* (Electroforesis SDS-PAGE 8-18% Teñido con Azul de Coomassie) analizado por densitometría.

4. Infección de animales con los extractos celulares bacterianos

Los ratones infectados con *S. somaliensis* o *A. madurae*, solo mostraron una infección pasajera la cual desapareció a los 15 días, por lo que los animales se re infectaron cada 15 días para mantener la infección activa, infectando a los animales con las siguientes cantidades de UFC:

Infección de Ratones BALB/c		
Cepa bacteriana	Día 0	Día 15
<i>S.somaliensis</i>	5.4×10^8 UFC	1×10^7 UFC
<i>A. madurae</i>	4×10^9 UFC	2.5×10^7 UFC

Aplicando 0.1 ml de la suspensión bacteriana en el cojinete plantar derecho del ratón.

En ratas y conejos la infección con estas bacterias tuvo la misma duración y se infectaron tres veces con las siguientes UFC:

Infección de Ratas Lewis			
Cepa bacteriana	Día 0	Día 15	Día 30
<i>S.somaliensis</i>	1.37×10^7	2.7×10^7	2.8×10^7
<i>A. madurae</i>	4.60×10^8	5×10^8	1.55×10^9

Aplicando 0.3 ml de la suspensión bacteriana en el cojinete plantar derecho y en el dorso de la rata.

Infección de Conejos Nueva Zelanda			
Cepa bacteriana	Día 0	Día 15	Día 30
<i>S. somaliensis</i>	1×10^7	1.14×10^8	3.1×10^8
<i>A. madurae</i>	7×10^8	4.4×10^7	3.3×10^8
<i>N. brasiliensis</i>	1×10^9	1×10^9	3.3×10^{11}

Aplicando 1.5mL de la suspensión bacteriana en el dorso del conejo.

Además se infectaron ratones con la suspensión celular bacteriana de *S. somaliensis* y *A. madurae* más AIF en el cojinete plantar pero la infección también fue pasajera durando 20 días.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5. Determinación de la respuesta inmune humoral de los animales inmunizados o infectados mediante inmunoelectrotransferencia.

Los animales se sangraron al día 0 y se realizaron los Western blot correspondientes en los cuales no se observó reacción contra las bandas de los extractos celulares bacterianos en los animales vírgenes, tomando estos sueros como controles negativos (Fig.3).

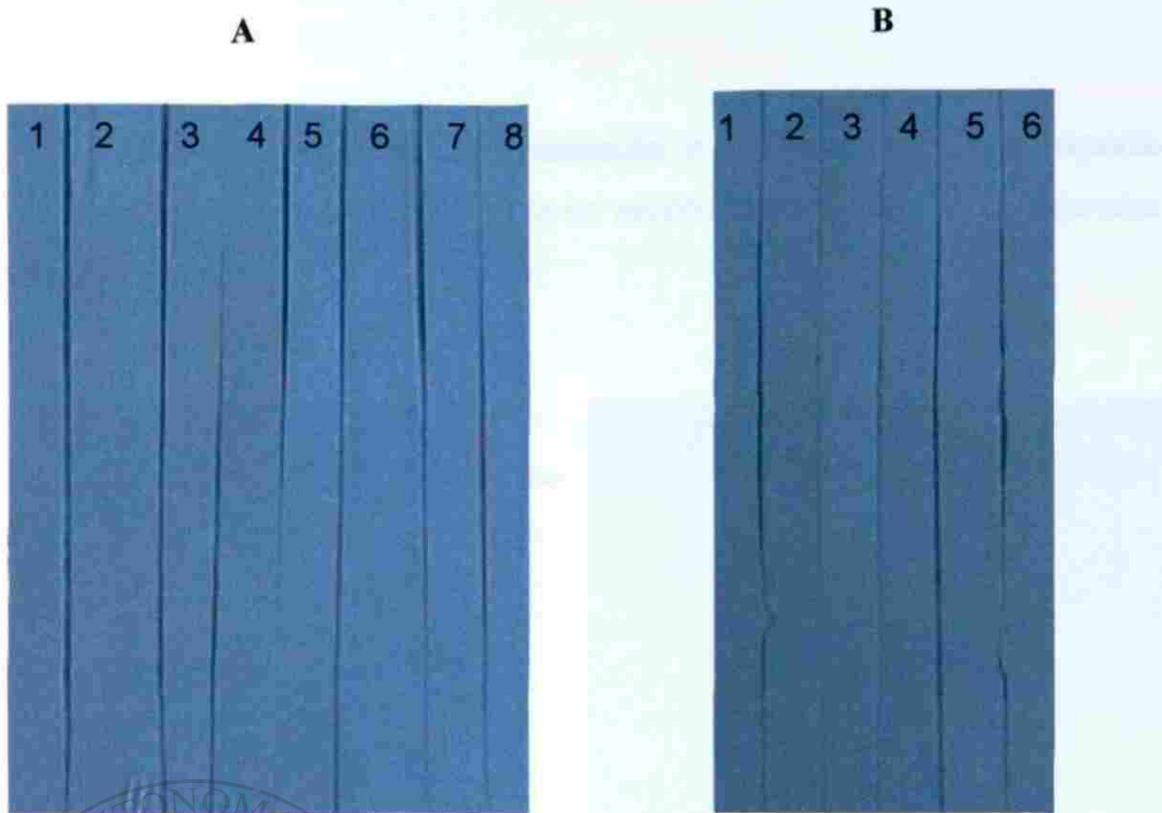


Fig3. Control negativo de ratones al día cero de la infección o la inmunización(A) y control negativo de ratas Lewis al día cero de la infección o de la inmunización (B).

Los animales también se sangraron en el día 30 postinfección o postinmunización tiempo al cual la reacción fue muy débil y en algunos casos inapreciables en los Western-blot como en el caso de ratas infectadas o inmunizadas con las diferentes cepas bacterianas.

Al día 60 postinfección o postinmunización se determinó la presencia de anticuerpos específicos hacia los extractos celulares bacterianos respectivos mediante inmunoelectrotransferencia, encontrando que tanto los ratones BALB/c infectados como los inmunizados con *S. somaliensis* reconocen bandas de 21, 23, 28, 32, 40 y 42kDa, mientras solo los inmunizados reconocen bandas de 10, 12 y 29 kDa de peso molecular, y los infectados una banda de 53kDa (ver Fig. 4).

Los sueros de ratas Lewis inmunizadas o infectadas con *S. somaliensis* reconocen las mismas bandas de peso molecular que los ratones BALB/c y presentan las mismas diferencias entre animales infectados o inmunizados (ver Fig.5), mientras que en los conejos no se observa diferencia entre el patrón de proteínas reconocidos por los sueros de los animales infectados contra el de los inmunizados(ver Fig.6) ya que ambos reconocen bandas de 10, 12, 21, 23, 30,

32, 40, 42, 44, 49 y 53 kDa de peso molecular y exclusivamente esta especie animal reconoce bandas de 20 y 30kDa no reconocidas por las otras especies animales.

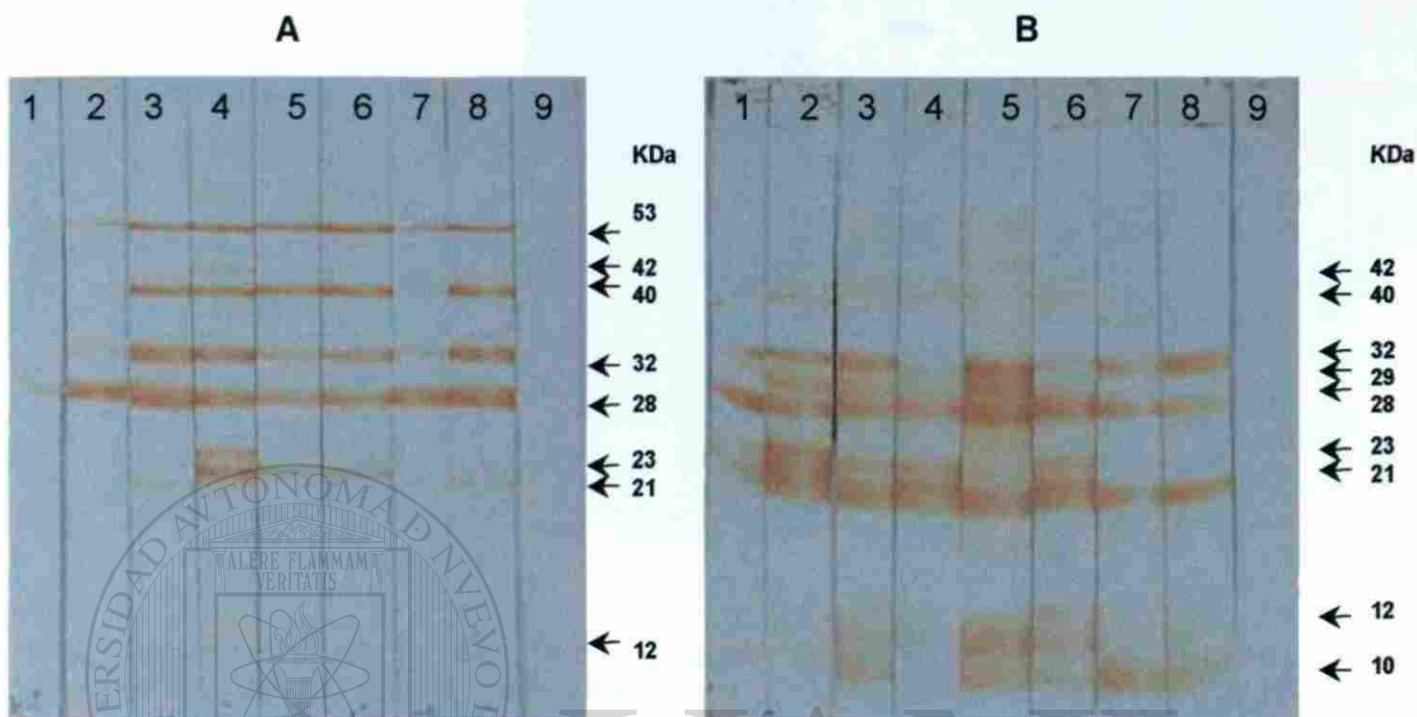


Fig4. Western-blot de *S. somaliensis* revelado con sueros de ratones BALB/c infectados al día 60(A, 1-8; 9 control negativo); y sueros de los animales inmunizados al día 60(B, 1-8; 9 control negativo) con el mismo microorganismo.

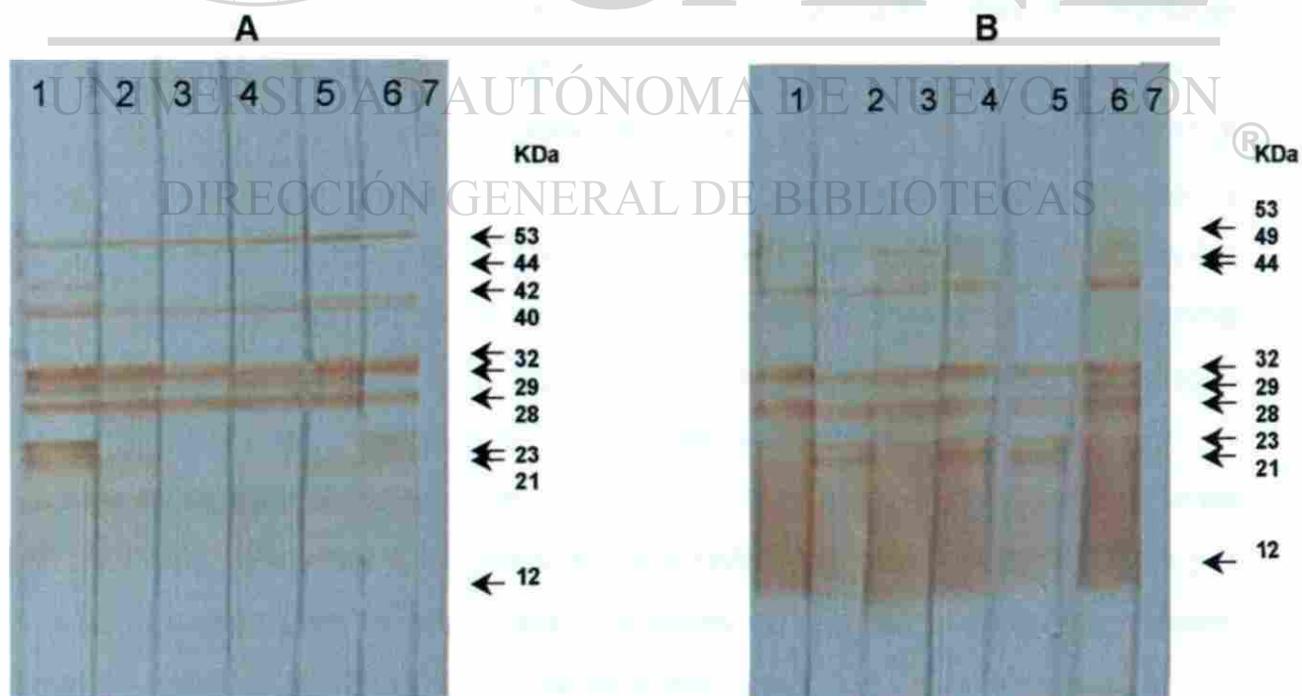


Fig5. Western-blot de *S. somaliensis* revelado con sueros de ratas Lewis infectadas al día 60(A, 1-6; 7 control negativo); y sueros de los animales inmunizados al día 60(B, 1-6; 7 control negativo) con el mismo microorganismo.

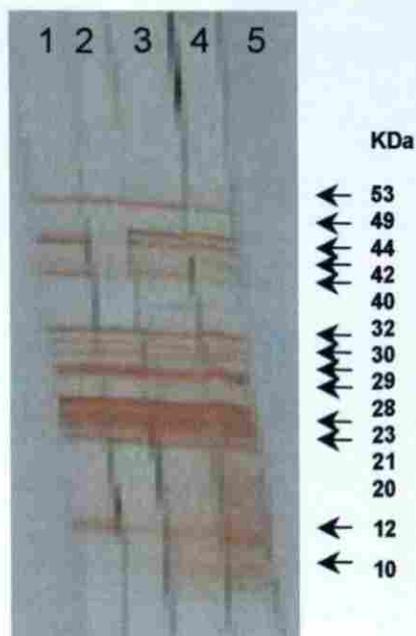


Fig6. Western-blot de *S. somaliensis* revelado con sueros de conejos Nueva Zelanda infectados(1 y 2) o inmunizados con *S. somaliensis* al día 60(3 y 4; 5 control negativo).

Los sueros de ratones BALB/c infectados o inmunizados con *A. madurae* reconocen bandas de 10, 12, 28, 35, 38, 40, 44 y 76 kDa de peso molecular(ver Fig. 7), solo los ratones inmunizados reconocen además las bandas de 47 y 54kDa, y los infectados una banda de 38 kDa. Los sueros de las ratas Lewis infectadas o inmunizadas con *A. madurae* reconocen las mismas bandas que los ratones excepto las bandas de 32, 47 y 54kDa, y se observa la misma diferencia entre animales infectados o inmunizados, ya que las ratas infectadas reconocen una banda de 38kDa no reconocida por los inmunizados(ver Fig.8).

Los conejos reconocen bandas de 10, 12, 15, 17, 21, 28, 32, 35, 38 y 44kDa de peso molecular, y no hay diferencias entre el patrón de proteínas reconocido por los animales infectados o inmunizados, además de reconocer solo esta especie animal las bandas de 15, 17 y 21 kDa(ver Fig.9).

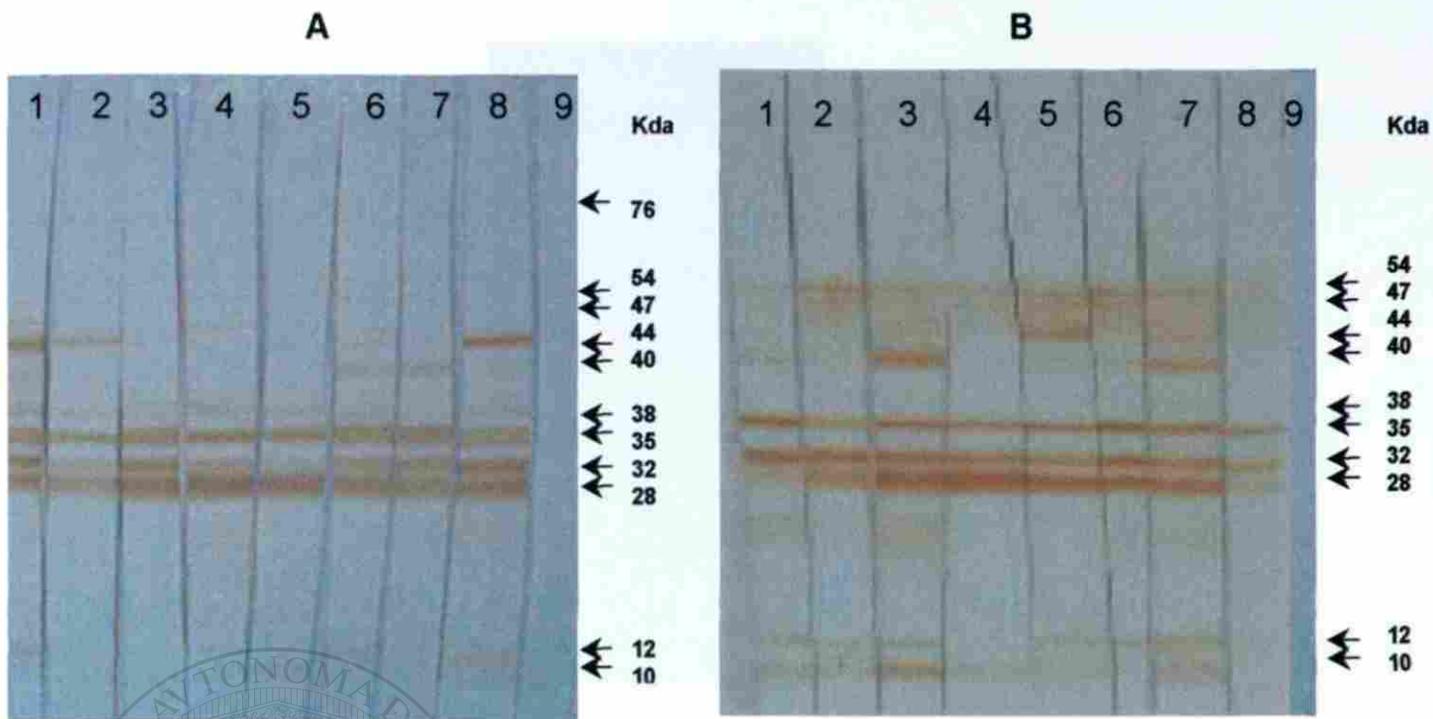


Fig7. Western-blot de *A. madurae* revelado con sueros de ratones BALB/c infectados con *A. madurae* al día 60(A, 1-8; 9 control negativo); y sueros de animales inmunizados con *A. madurae* al día 60(B, 1-8; 9 control negativo).

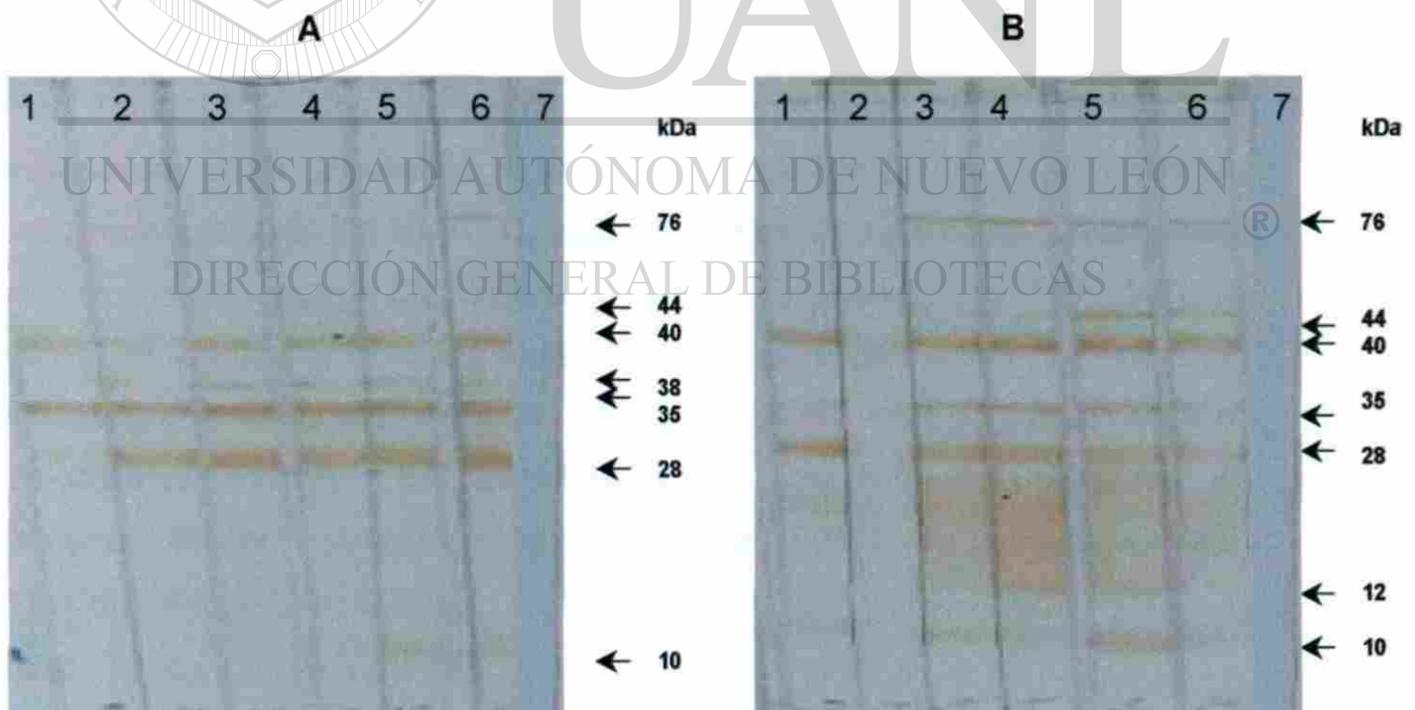


Fig8. Western-blot de *A. madurae* revelado con sueros de ratas Lewis infectadas con *A. madurae* al día 60(A, 1-6; 7 control negativo); y sueros de animales inmunizados con *A. madurae* al día 60(B, 1-6; 7 control negativo).

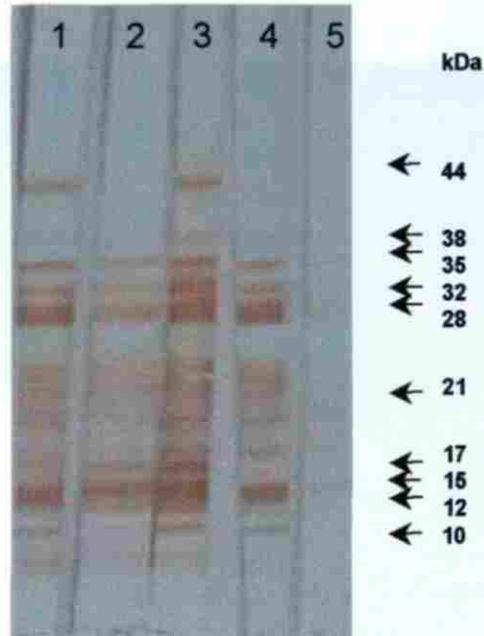


Fig9. Western-blot de *A. madurae* revelado con sueros de conejos Nueva Zelanda infectados con *A. madurae* al día 60(1-2); y sueros de animales inmunizados con *A. madurae* al día 60(3-4; 5 control negativo).

Por último los sueros de los ratones BALB/c y ratas Lewis infectados o inmunizados con *N. brasiliensis* reconocieron bandas de 21, 24, 35, y 61 kDa de peso molecular (ver Fig.10 y 11), solo los sueros de los ratones inmunizados reconocen una banda de 53kDa de peso molecular y solo las ratas infectadas una banda de 45kDa de peso molecular. Por otra parte los sueros de conejos reaccionaron con bandas de 15, 21, 24, 28, 35, 38, 41, 45, 53 y 61kDa de peso molecular(ver Fig.12) y los sueros de conejos infectados o inmunizados no muestran diferencia ya que ambos reconocen al 100% todas las bandas antes mencionadas(ver Gráfica 3).

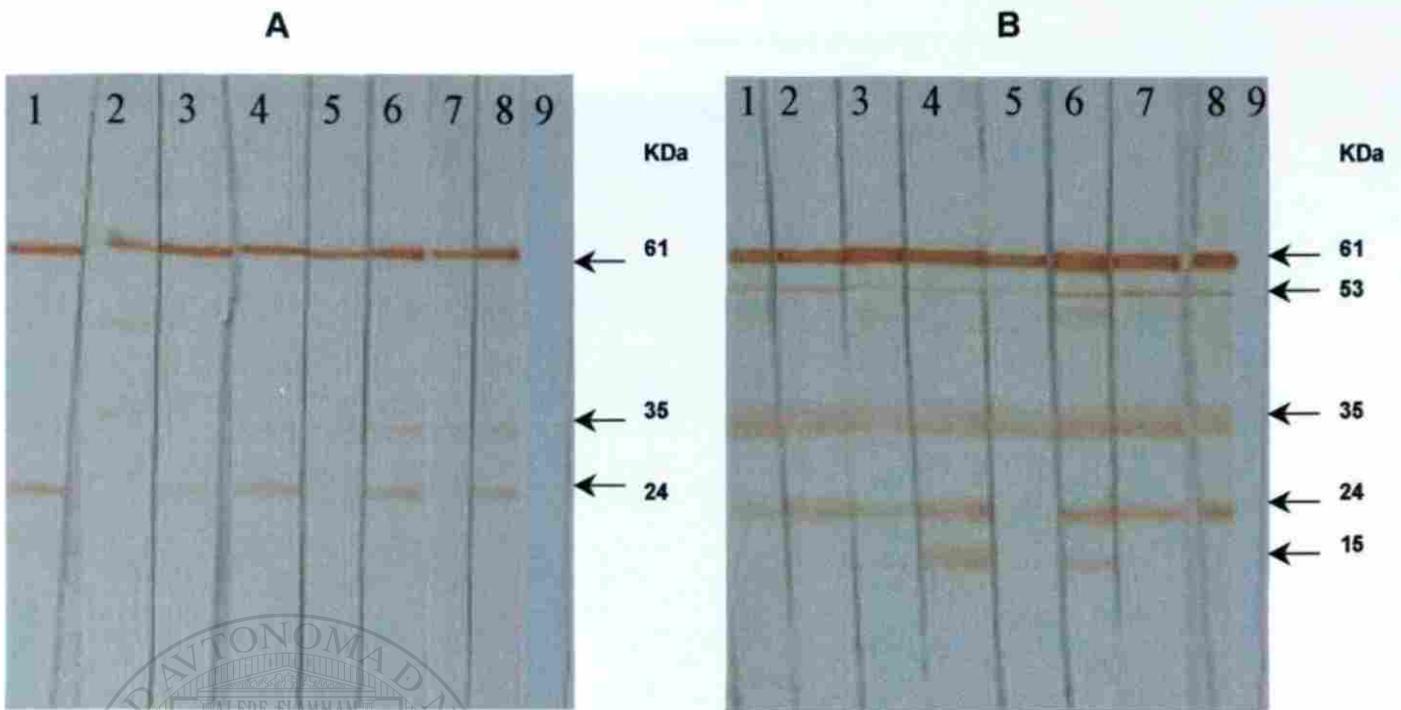


Fig.10 Western-blot de *N. brasiliensis* revelado con sueros de ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis* al día 60(A, 1-8; 9 control negativo); y con sueros de animales inmunizados con *N. brasiliensis* al día 60(B, 1-8; 9 control negativo).

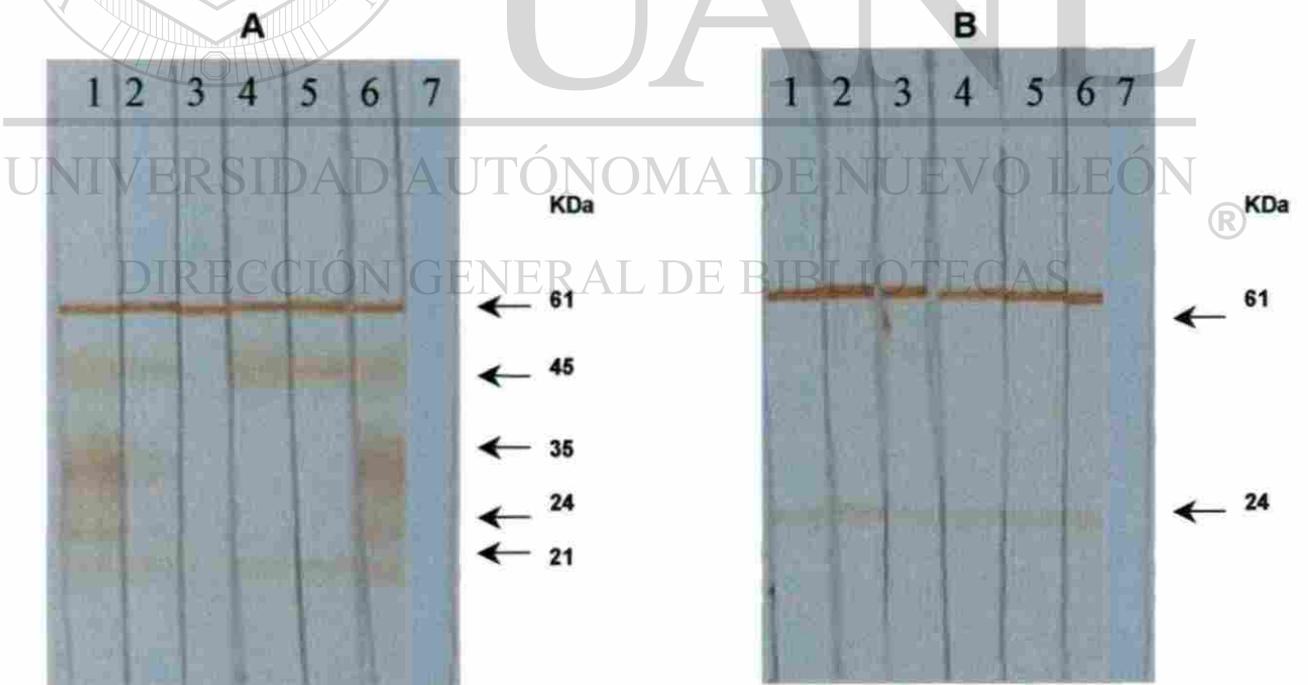


Fig.11 Western-blot de *N. brasiliensis* revelado con sueros de ratas Lewis infectados con *N. brasiliensis* al día 60(A, 1-6; 7 control negativo); y con sueros de animales inmunizados con *N. brasiliensis* al día 60(B, 1-6; 7 control negativo).

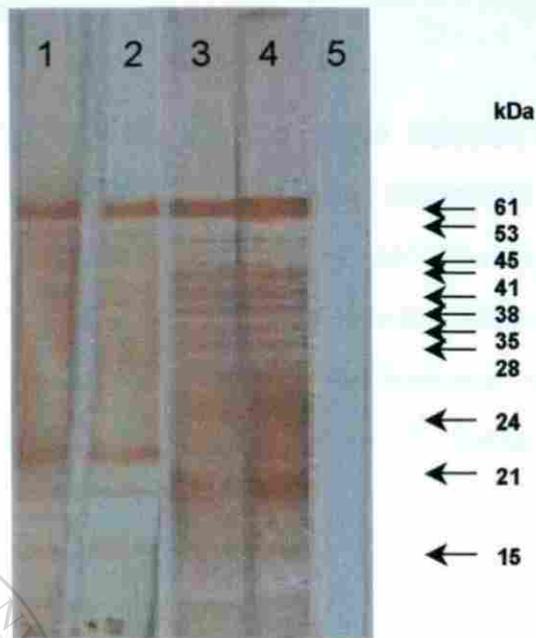


Fig.12 Western-blot de *N. brasiliensis* revelado con sueros de conejos Nueva Zelanda infectados con *N. brasiliensis* al día 60(1-2); y con sueros de animales inmunizados con *N. brasiliensis* al día 60(3-4; 5 control negativo).

6. Identificación de reacciones cruzadas entre los sueros anti- *A. madurae*, *S. somaliensis* y *N. brasiliensis*.

Se encontró que el 37.5% (tabla 5) de los sueros de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* reconocen una banda de 21kDa de peso molecular del extracto celular de *A. madurae*, mientras los ratones infectados no reconocen ningún antígeno de este extracto, ni las ratas y conejos infectados o inmunizados con *N. brasiliensis*. Los animales inmunizados o infectados con *S. somaliensis* no muestran ninguna reacción contra los antígenos del extracto celular de *A. madurae*(ver Fig. 13, 14 y 15).

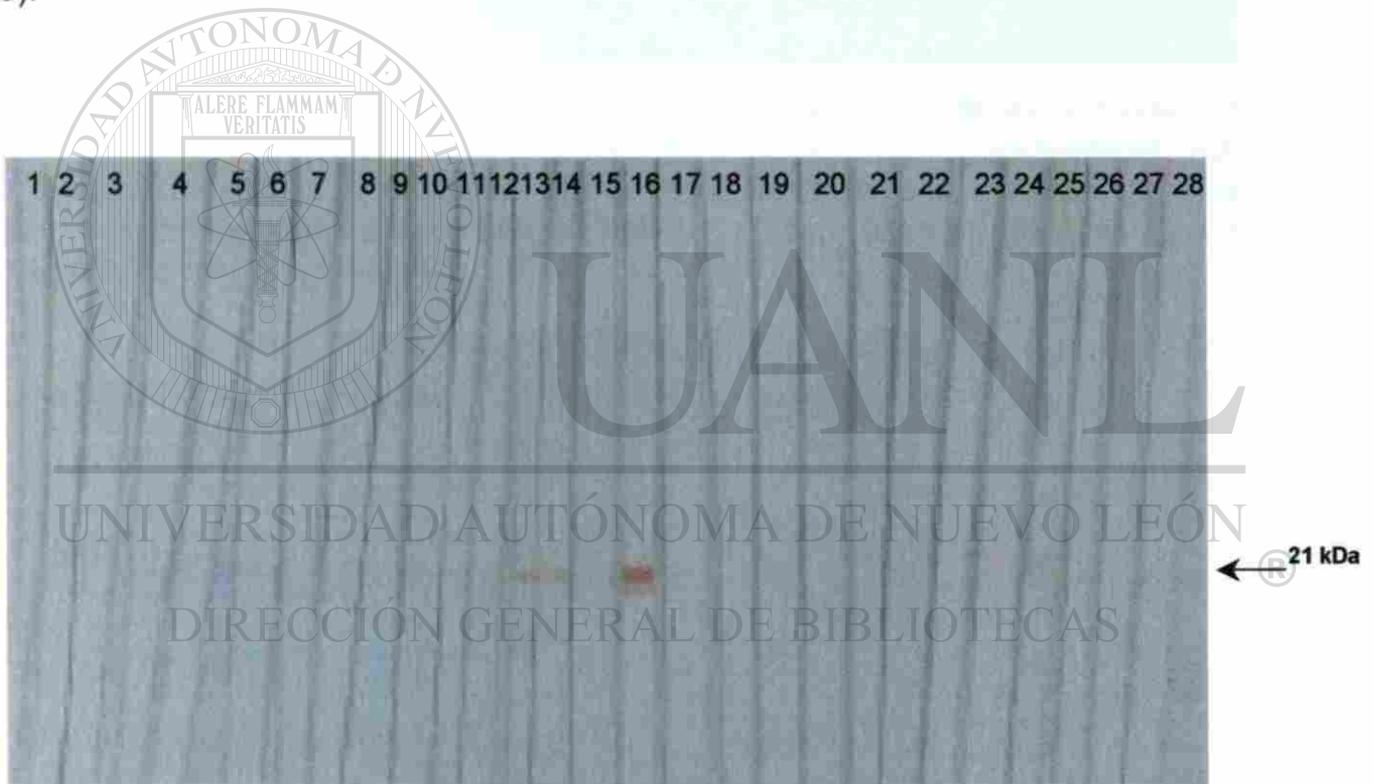


Fig13. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *A. madurae* revelado con sueros de ratones infectados con *N. brasiliensis* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *N. brasiliensis* 17-22, y con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *N. brasiliensis* 23-28.



Fig14. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *A. madurae* revelado con sueros de ratones infectados con *S. somaliensis* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *S. somaliensis* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *S. somaliensis* 17-22, y con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *S. somaliensis* 23-28.

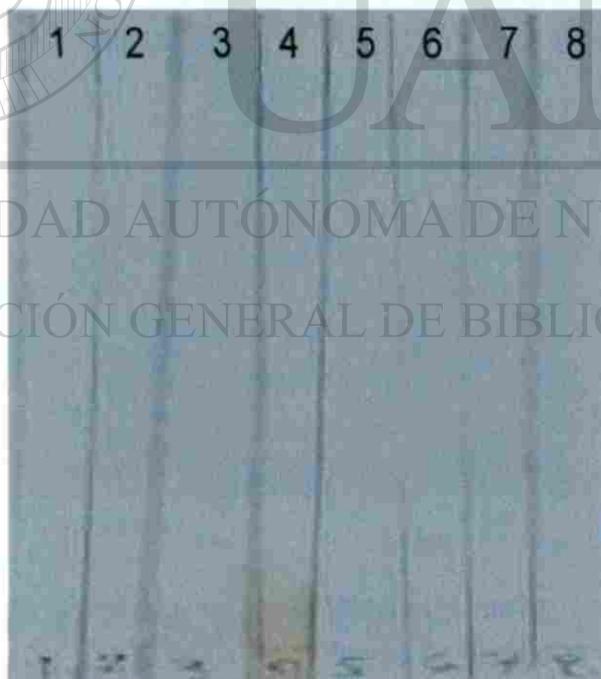


Fig15. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *A. madurae* revelado con sueros de conejos infectados con *N. brasiliensis* 1-2, con sueros de conejos inmunizados con *N. brasiliensis* 3-4, con sueros de conejos infectados con *S. somaliensis* 5-6, con sueros de conejos inmunizados con *S. somaliensis* 7-8.

Los sueros de los ratones BALB/c infectados(2/8) y de los inmunizados (6/8) con *A. madurae* reconocen una banda de 24kDa del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* al igual que los conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma, no así las ratas infectadas o inmunizadas con *A. madurae*(ver Fig.16, tabla6). Mientras los ratones BALB/c y las ratas Lewis infectadas o inmunizadas con *S. somaliensis* no muestran reacción contra el extracto celular de *N. brasiliensis* (ver Fig.17), sin embargo los conejos inmunizados o infectados con *S. somaliensis* si reconocen la banda de 24kDa de peso molecular(ver Fig. 18)de este mismo extracto.

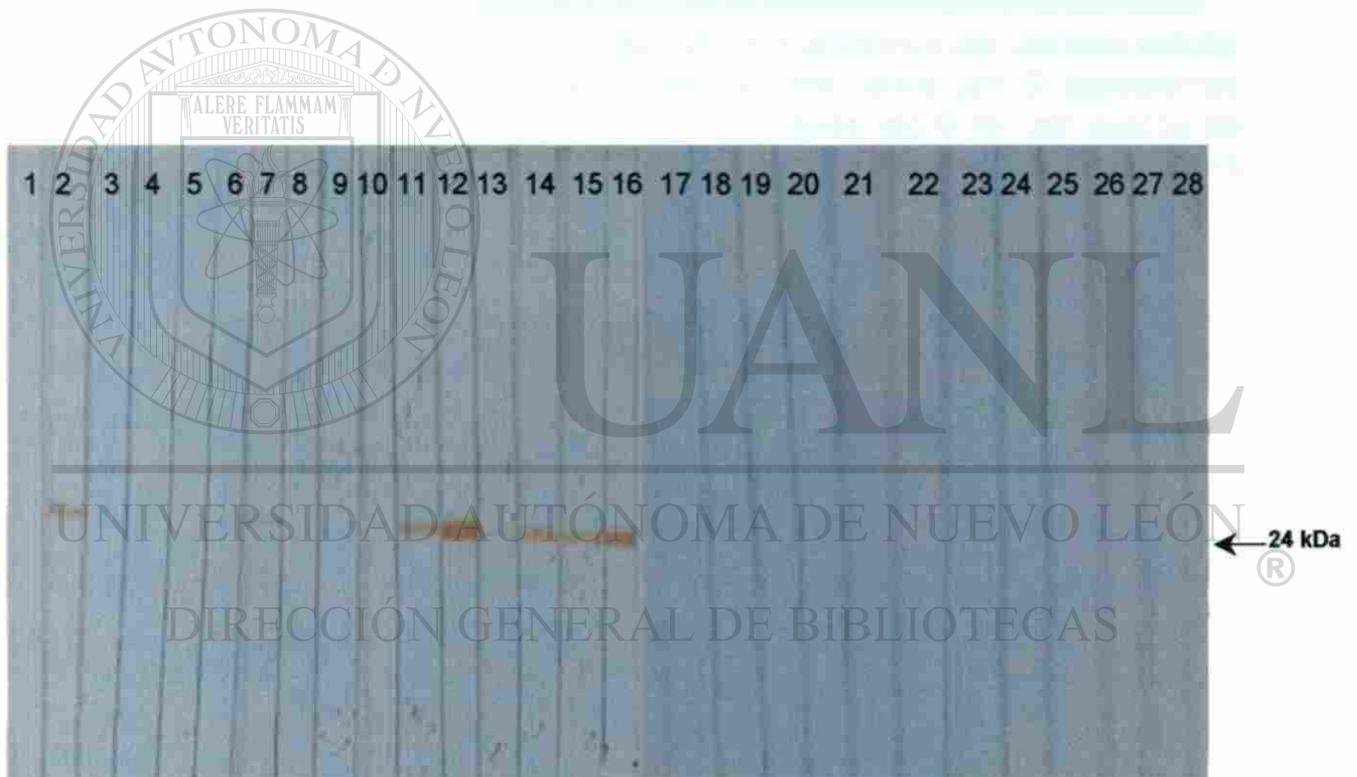


Fig16. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* revelado con sueros de ratones infectados con *A. madurae* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *A. madurae* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *A. madurae* 17-22, con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *A. madurae* 23-28.



Fig17. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* revelado con sueros de ratones infectados con *S. somaliensis* 1-8, con sueros de ratones inmunizados con *S. somaliensis* 9-16, con sueros de ratas Lewis infectadas con *S. somaliensis* 17-22, con sueros de ratas Lewis inmunizadas con *S. somaliensis* 23-28.

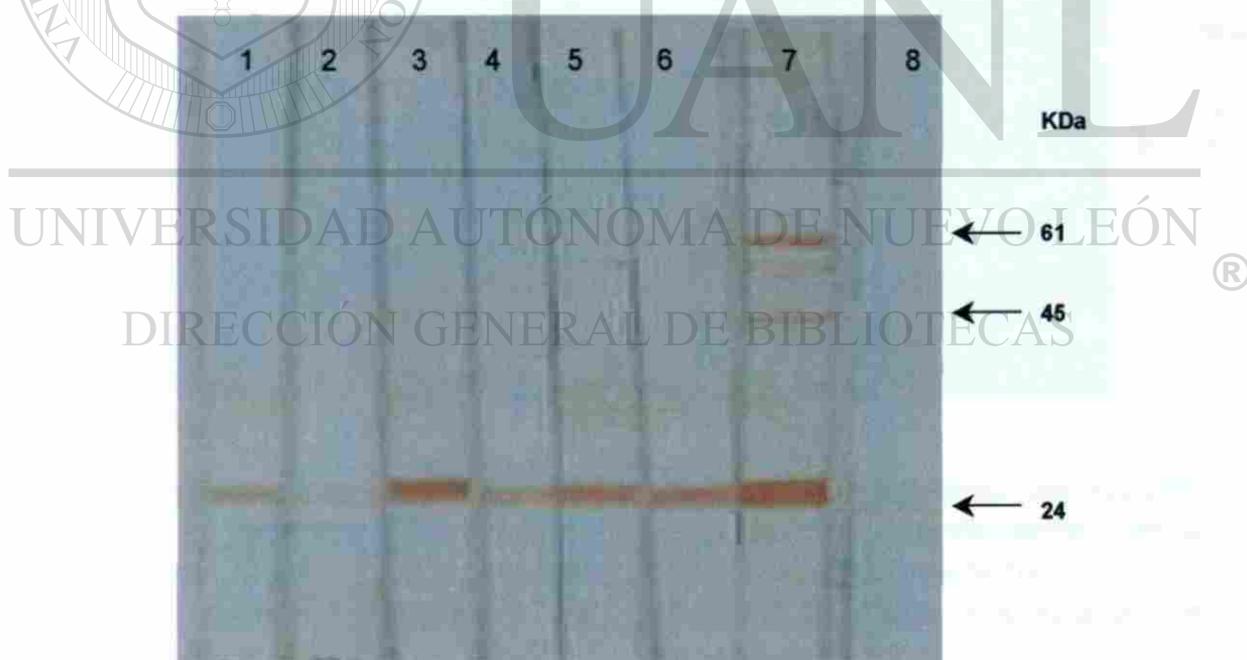


Fig18. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* revelado con sueros de conejos infectados con *S. somaliensis* 1-2, con sueros de conejos inmunizados con *S. somaliensis* 3-4, con sueros de conejos infectados con *A. madurae* 5-6, con sueros de conejos inmunizados con *A. madurae* 7-8.

Los sueros de ratones BALB/c infectados o inmunizados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*, así como las ratas Lewis infectadas con *N. brasiliensis*, reconocen bandas de 20, 21 y 23kDa(ver Fig.19 y 20), mientras los conejos inmunizado o infectados con *A. madurae* o *N. brasiliensis* reconocen más bandas del extracto celular de *S. somaliensis* además de la de 20 y 21kDa, entre las que se encuentran la de 9, 10 y 12 kDa en diferente proporción entre inmunizados o infectados(ver Fig.21, Tabla 4)

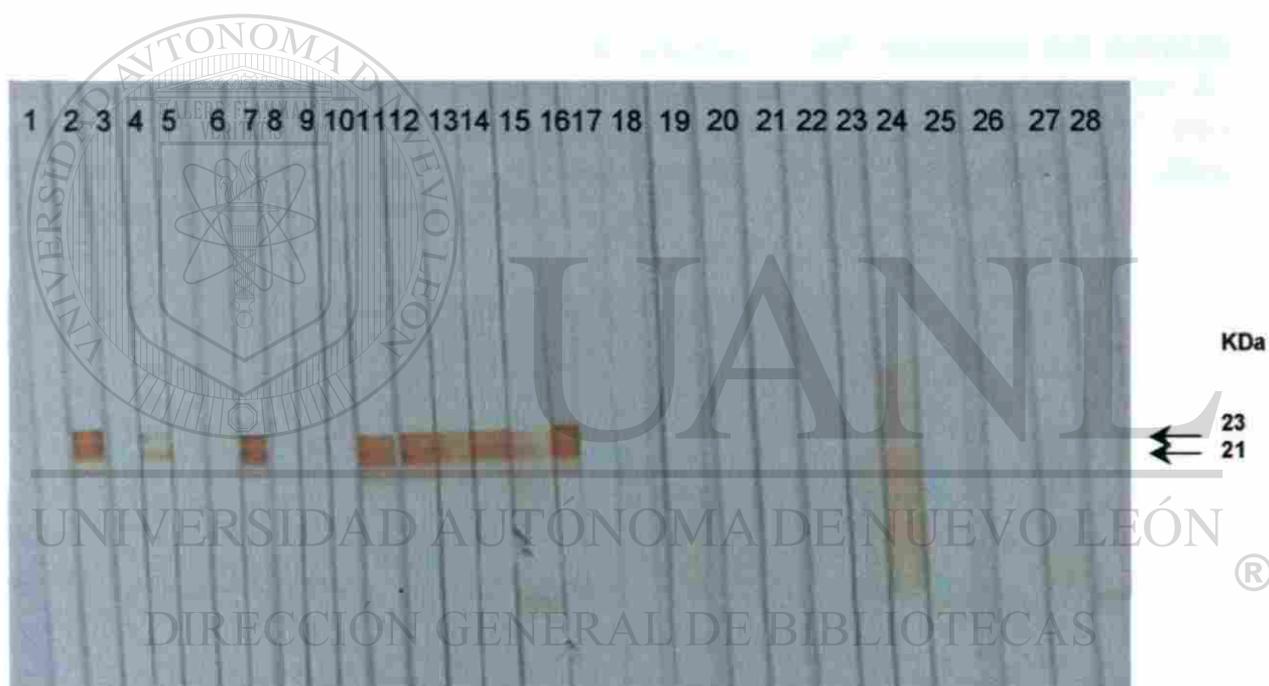


Fig19. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *S. somaliensis* revelado con suero de ratones infectados con *A. madurae* 1-8, con suero de ratones inmunizados con *A. madurae* 9-16, con suero de ratas infectadas con *A. madurae* 17-22, con suero de ratas inmunizadas con *A. madurae* 23-28.



Fig20. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *S. somaliensis* revelado con suero de ratones infectados con *N. brasiliensis* 1-8, con suero de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* 9-16, con suero de ratas infectadas con *N. brasiliensis* 17-22, con suero de ratas inmunizadas con *N. brasiliensis* 23-28.

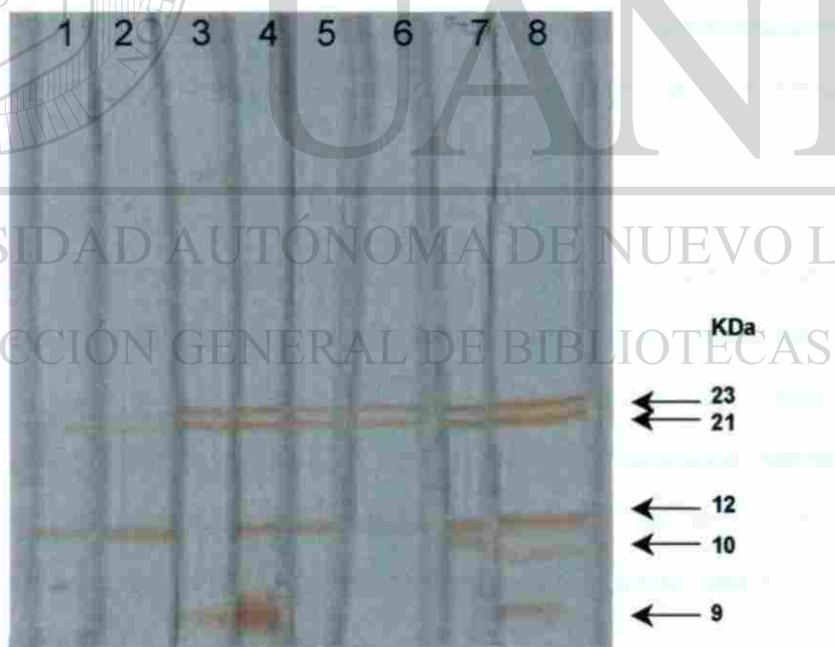


Fig21. Reacción cruzada, papel de nitrocelulosa con proteínas del extracto celular de *S. somaliensis* revelado con suero de conejos infectados con *N. brasiliensis* 1-2, con suero de conejos inmunizados con *N. brasiliensis* 3-4, con suero de conejos infectados con *A. madurae* 5-6, con suero de conejos inmunizados con *A. madurae* 7-8.

DISCUSIÓN.

Debido a que no existe un método óptimo para el aislamiento de los actinomicetos aerobios de los especímenes altamente contaminantes y el crecimiento de estas bacterias es lento, tardando de dos a tres semanas para ser identificadas en muestras biológicas, se requieren de nuevos métodos para la identificación de actinomicetomas de importancia clínica.

Por lo que desde hace mucho años varios autores han intentado el diagnóstico inmunológico sin buenos resultados en parte por las técnicas que utilizaron eran de baja sensibilidad y en parte porque sus preparaciones antigénicas eran mezclas complejas de antígenos proteicos, polisacáridos no definidos ni caracterizados con los cuales las reacciones cruzadas fueron un problema común. Entre los estudios realizados con el fin de encontrar antígenos inmunodominante esta el de Magaldi y Mackenzie quienes en 1990 realizaron un estudio comparativo entre los antígenos de diversos actinomicetos por inmunodifusión e inmunolectroforesis(35), encontrando reacción cruzada entre estos.

En 1992, Salinas Carmona y colaboradores identificaron varios antígenos inmunodominantes mediante la técnica de electrotransferencia, identificando tres proteínas inmunodominantes de un extracto celular de *N. brasiliensis* denominadas P61, P26 y P24(5). Después con el uso de técnicas simples, se logró el aislamiento y purificación de P61 y P24 y con el uso de estos antígenos purificados se desarrolló un método inmunoenzimático en fase sólida (30) que ha demostrado su utilidad clínica.

Basándonos en las investigaciones antes realizadas sobre *N. brasiliensis*, y el desarrollo del micetoma en el ratón BALB/c, en este trabajo se identificaron los antígenos inmunodominantes específicos de *S. somaliensis* y *A. madurae* para el posterior desarrollo de una prueba serológica, y se comparó la respuesta inmune

humoral en ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda inmunizados o infectados con *S. somaliensis* y *A. madurae*.

Aunque Palma y col. han reportado el desarrollo del modelo experimental en ratones BALB/c de la infección por *A. madurae* con la utilización de adyuvante incompleto de Freud(54), al aplicar *A. madurae* más adyuvante incompleto de Freud solo se observó una infección pasajera, pero no el desarrollo del actinomicetoma típico presentado en ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis*, quizás debido a la falta de virulencia de la bacteria, lo cual también se observó en los animales infectados con *S. somaliensis* o probablemente la infección se mantuvo activa sin desarrollar el micetoma, concordando con lo reportado por Palma y col, en cuyo experimento se encontró la presencia de la bacteria en el tejido muscular del cojinete plantar, sin embargo, no se presentó respuesta inflamatoria lo que sugiere la posibilidad de que esta bacteria induzca temporalmente algún mecanismo de tipo anérgico en el huésped infectado.

Por otra parte la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos contra antígenos de *S. somaliensis* en el suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados reconocieron más de 14 antígenos presentes en el extracto celular crudo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Encontramos diferencias entre los animales infectados e inmunizados ya que los ratones y ratas infectados con *S. somaliensis* reconocen una banda de 53kDa no encontrada en los inmunizados. Mientras que entre los conejos inmunizados o infectados no se observó ninguna diferencia en cuanto al patrón reconocidos por los sueros de los animales, aunque no se puede aseverar nada debido al número reducido de animales utilizados, y los antígenos que reconocieron fueron más de los que reconocieron las otras dos especies animales. Sin embargo, varios de los antígenos reconocidos por los animales infectados o inmunizados con *S. somaliensis* también reaccionaron con los sueros de animales infectados o inmunizados con *A. madurae* y *N. brasiliensis*, como las

proteínas de 9, 10, 12, 21 y 23kDa de peso molecular lo cual explica las reacciones cruzadas ya antes reportadas entre estas especies bacterianas.

Los antígenos inmunodominantes de *S. somaliensis* reconocidos 100% por todos los animales tanto infectados como inmunizados además de no dar reacción cruzada con los animales infectados o inmunizados con *N. brasiliensis* y *A. madurae* son los de 28, 32 y 53kDa de peso molecular.

Por otra parte los ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectadas o inmunizadas con *A. madurae* reconocieron más de 10 antígenos del extracto celular crudo.

Los sueros hiperinmunes de ratones y ratas infectadas con *A. madurae* reconocieron una banda de 38kDa, esta banda no es reconocida por los animales inmunizados, constituyendo esto una diferencia entre animales infectados contra inmunizados. En cambio los conejos tanto inmunizados como infectados reconocen esta misma banda no encontrando diferencia entre el patrón de proteínas reconocido por animales infectados contra inmunizados.

Los antígenos inmunodominantes de *A. madurae* para las tres especies animales son los de 28 y 35kDa de peso molecular, los cuales no dan reacción cruzada con los sueros de animales infectados o inmunizados con *N. brasiliensis* o *S. somaliensis* y el antígeno de 38kDa reconocido solo por animales infectados y el cual tampoco da reacción cruzada constituye el antígeno con potencial para el serodiagnóstico.

Sin embargo 3 de 8 de los animales inmunizados con *N. brasiliensis* reconocen una banda de 21kDa del extracto celular de *A. madurae*, reacción cruzada insignificante comparada con la reacción cruzada presentada entre el extracto de *S. somaliensis* y los sueros hiperinmunes anti-*A. madurae* y anti-*N. brasiliensis*.

En este trabajo se estudió también la respuesta inmune humoral desarrollada en animales infectados o inmunizados con *N. brasiliensis*, encontrando que los ratones inmunizados o infectados al igual que las ratas infectadas o inmunizadas reconocen 6 antígenos del extracto celular crudo de 21, 24, 35, 45, 53 y 61 kDa de peso molecular, mientras que los conejos reconocen muchos más antígenos debido al repertorio de anticuerpos presentes en el animal y principalmente al fondo genético, y no existe diferencia entre los inmunizados e infectados.

Los antígenos inmunodominantes para las tres especies animales fueron los antígenos de 24 y 61kDa, ya antes reportados.

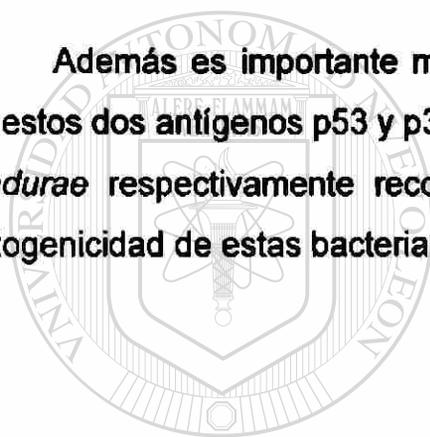
Encontramos reacción cruzada entre el extracto celular de *N. brasiliensis* y los sueros de los animales infectados o inmunizados con *A. madurae*, ya que el 25% de los ratones infectados, el 75 % de los ratones inmunizados con *A. madurae*, y el 100% de los conejos tanto infectados como inmunizados por *A. madurae* y *S. somaliensis* reconocen el antígeno de 24kDa de peso molecular del extracto celular, mismo que se utiliza para el diagnóstico serológico por ELISA de pacientes con micetoma, prueba que como ya se sabe no es 100% específica.®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como se describió antes sí se presentan diferencias entre el patrón antigénico reconocido por los ratones y ratas infectados contra el de los inmunizados por las diferentes especies bacterianas, pero al estudiar la respuesta desarrollada en conejos se ve que ocurre todo lo contrario que en las especies de roedores estudiadas no observando diferencias aunque como ya se menciona anteriormente no puede ser determinante debido al reducido número de conejos utilizados y además de que los conejos reconoce un mayor número de antígenos, por lo que la respuesta montada en estos animales es más amplia.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la comparación de patrones de proteínas reconocidas entre ratones infectados versus inmunizados y en ratas infectadas versus inmunizadas, el antígeno inmunodominante candidatos para el desarrollo de una prueba serológica para *A. madurae* es la proteína de 38kDa de peso molecular y para *S. somaliensis* la de 53kDa de peso molecular las cuales además no dan reacción cruzada y son solo reconocidos por los animales infectados, más sin embargo no se pueden descartar los demás antígenos determinados como inmunodominantes en las tres especies animales hasta evaluar la respuesta de anticuerpos de humanos infectados con estas bacterias frente a las proteínas propuestas como inmunodominantes en este trabajo.

Además es importante mencionar la importancia de la posible implicación de estos dos antígenos p53 y p38 de los extractos celulares de *S. somaliensis* y *A. madurae* respectivamente reconocidos solo por animales infectados, en la patogenicidad de estas bacterias para lo cual es necesario realizar más estudios.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES.

Los antígenos inmunodominantes de *S. somaliensis* en ratones BALB/c son los de 28, 32,40 y 53 kDa de peso molecular y en ratas son los de 28, 32 y 53 kDa de peso molecular. En cambio en el conejo fueron los de 12, 20, 21, 23, 28, 29, 30, 32, 35, 40 y 53 kDa de peso molecular.

Los antígenos inmunodominantes de *A. madurae* en ratones BALB/c son los de 28, 32, 35 y 38kDa de peso molecular, en ratas son los de 28, 35, 38 y 40kDa de peso molecular y en conejos los de 10, 12, 15, 17, 21, 28, 32, 35 y 38kDa de peso molecular.

Existe diferencia entre el patrón de proteínas reconocido por los sueros de ratones BALB/c, y ratas Lewis infectadas contra el de los inmunizados con *S. somaliensis* o *A. madurae*.

El antígeno inmunodominante candidato para el desarrollo de una prueba diagnóstica serológica para *S. somaliensis* es la proteína de 53kDa de peso molecular, reconocido solo por los ratones BALB/c y ratas Lewis infectadas.

El antígeno inmunodominante candidato para el desarrollo de una prueba diagnóstica serológica para *A. madurae* es la proteína de 38kDa de peso molecular, reconocido solo por los ratones BALB/c y ratas Lewis infectadas.

REFERENCIAS.

1. Sandoval-Trujillo H. 1993. Actinomicetos, Microorganismos de la luz. UNAM, Xochimilco, México
2. Beaman BL. 1993 Nocardial Infections, in fungal Infections and Immune Responses, editado por Murphy J.W., Friedman H., Bendimelli M. Plenum Publishing Corporation, NY.
3. Beaman B.L., Beaman L. 1994. Nocardia Species: Host-Parasite Relationships. *Clinical Microbiology Reviews* 7(2):213-264.
4. McNeil M.M., Brown J.M. 1994. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 7(3): 357-417.
5. Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M.C., Welsh O., Rodríguez M.A. 1992. Isolation and Purification of two Immunodominant Antigens from *N. brasiliensis*. *J. Clin Microbiol* 30(5):1183-1188.
6. Pier A.C, Thurston J.R, Larsen A.B. 1968. A Diagnostic Antigen for Nocardiosis: Comparative Test in Cattle with Nocardiosis and Mycobacteriosis. *Am J Vet res* 29(2):397-403.
7. Beaman B.L., Saubolle M.A., Wallace R.J. 1995. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia* and Other Aerobic Actinomycetes of Medical Importance, en *Manual of Clinical Microbiology*, editado por P.R Murray, ACM Press.

8. Elmer W., Stephen D., William M. 1997. Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition., Editor Lippincott Williams and Wilkins., Lippincott-Raven Publishers. Washington.
9. Welsh, O. 1991. Mycetoma. Current concepts in treatment. International Journal of Dermatology. 30(6): 387-398.
10. González-Ochoa, A., H. Shibayama, D. Felix, and M. Anaya. 1962. Immunological aspects of Actinomycotic Mycetoma and Nocardiosis. Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 55:542-551
11. Serrano, J.A y Sandoval T.H. 1992. Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetos Patógenos. Universidad de los Andes. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico. Consejo de Publicaciones. Mérida, Venezuela.
12. Laemmli V.K. 1970. Cleavage of structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227:680-685
13. Carter, G.R. 1985. Bacteriología y micología Veterinarias. Aspectos Especiales. 1ª Edición Editorial El Manual Moderno. México, D.F.
14. Zlotnik, H., and Buckley, H.R. 1980. Experimental Production of Actinomycetoma in BALB/c Mice. Infect. Immun. 29(3): 1141-1145.
15. Krick, J.A and Remington, J.S. 1975. Resistance to Infection with *Nocardia asteroides*. J. Infect. Dis. 132(6): 665-672.
16. Kobayashi, C. S. 1987. Bacterias Parecidas a Hongos. Actinomicetos. Tomado de :Tratado de Microbiología de Davis. 2da. Edición. Salvat. Barcelona, España.

17. Kaufman, S.H.E. 1993. Immunity to Intracellular Bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 129-163.
18. Conde, C., I. Melendro, E., Fresan, m., and Ortiz. L. 1982. *Nocardia brasiliensis* : Mycetoma Induction and Grow Cycle. *Infect. Immun.* 38(3): 1291/11295.
19. Folb, P., Jaffe, R. And Altman, G. 1977. *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* Infection on Mice. *Infect. Immun.* 13: 1490/1496.
20. Torres, I.E. 1994. Estudio de la respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución del micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*. U.A.N.L. Facultad de Medicina. Tesis de Maestría.
21. González Ochoa A., Mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* with a note on the isolation of the causative organism from the soil, *Lab. Invest.* 11(1962) 118-123.
22. Macotela-Ruíz E., Mariat T.F., Sur la production de mycetomes experinentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*, *Bull. So. Pathol. Exot.* 56(1963)46-54.
23. Rodríguez M.C., Torres . J.A., Zlotnik H. Investigation of the temporal humoral immune response in a murine model of actinomycetoma, *PRHSJ* 14(1996) 91-95.
24. Boiron P., Locci R., Goodfellow M. 1998. *Nocardia*, Nocardiosis and Mycetoma. *Medical Mycology.* 36(1):26-37.

25. Trujillo M.E., Goodfellow M. 1997. Poliphasic Taxonomic Study of Clinically Significant Actinomadura Including the Description of *Actinomadura*. Hyg. Alot.1 Orig. 285:212-233.
26. Rippon. J.W., and Peek. G.L., 1967. Experimental Infection with *Streptomyces madurae* as a Function of Collagenase. J. Invest. Dermatol., 49:371-378.
27. Gumaa, S.A., Abu Samra M.T. 1981. Experimental Mycetoma Infection in the Goat. J. Comp. Pathol. 91:341-346.
28. Conde C., Mancilla R., Fresan M., Ortiz-Ortiz L. 1983. Immunoglobulin and Complement in Tissues of Mice Infected with *Nocardia brasiliensis*. Infect Immunity. 40(3):1218-1222.
29. Salinas-Carmona M.C., Vera L., Welsh O., Rodriguez M. 1992. Antibody Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in Man. Zbl Bakt 276:390-397
30. Salinas-Carmona M.C., Welsh O., Casillas S.M. 1993. Enzyme linked Immunoabsorbent Assay for Serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation with Mycetoma Infections. J Clin Microbiol. 31(11):2901-2906
31. Hay, R.J; Mahgoub E.S., Leon, G. Al-Sogair S., y Welsh O. 1992. Mycetoma. J. Med. Vet. Mycol. 30:41-49.
32. Salinas-Carmona M.C., Torres-Lopez E., Ramos A.I., Lincon Trujillo González Spencer D., Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice, Infect. Immun. 67(1999) 2428-2432.

42. Angeles, A.M, and Sugar. A.M. 1987. Rapid diagnosis of Nocardiosis with an enzyme immunoassay. *J. Infect. Dis.* Vol. 155(2): 292-296
43. González-Ochoa A. 1975. Geografía de las micosis profundas. *Res. Inv. Salud. Pública.* 35: 85-96
44. Bout G, Lavallo P, Mariat F, Sùchel P. 1987. Epidemiologic study of mycetomas in Mexico. Apropos of 502 cases. *Bull Soc Pathol Exort Filiales.* 80(3):329-339
45. Ortiz-Ortiz L, Parks D.E, López J.S, Weigle W.O. 1979. B-Lymphocytes Activation with an extract of *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immunity.* 25(2):627-634.
46. Gordon M.A, Mahgoub E.S. 1980. Immune Response to Aerobic Pathogenic Actinomycetaceae, en *Manual of Clinical Immunology*, editado por Rose N.R. friedman H. American Society for Microbiology.
47. Bona C., Chedid L., Demais C. Et al. 1975. Blast transformation of Rabbit B-Derived Lymphocytes by a Mitogen Extracted from *Nocardia*. *J. Immunol.* 114(1):348-353
48. Bona C., Broder S., Bimitriu A., Waldmann Th. A. 1979. Policlonal Activation of human B Lymphocytes by *Nocardia* Water Soluble Mitogen (NWSM) *Immunological Rev.* 45:69-92.
49. Towbin, H., T. Staebelin; J. Gordon; 1979. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9): 4350-4354

50. Diezel, W., Kopperschlager, G., and Hofmann, F. 1972. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal. Biochem.* 48, 617-620.
51. Sammons, D. W., Adams, L. D., and Nishizawa, E.E. 1981. Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2, 135-140.
52. Hassan AM, Fahal AH, Ahmed AO, et al., 2001. The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95(1):89-92
53. McNeil MM, Brown JM, Scalise G and Piersimoni C. 1992. Nonmycetomic *Actinomadura madurae* infection in a patient with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30(4):1008-1010.
54. Palma RA, Castrillón RLE, Elija SJJ, Padilla DC, Heuze IJY. 2000. Infección experimental por *Actinomadura madurae* en ratón. *Rev Cent Dermatol Pascua*; 9(2): 96-101.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS

BHI	Infusión cerebro corazón
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Grados centígrados
%C	Por ciento de agente entrecruzante (Bis-acrilamida)
cm	Centímetro
g	Gramo
h	Hora
IET	Inmunolectrotransferencia
kDa	Kilodaltons
l	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normal
nm	Nanómetro
PBS	Solución salina-fosfato
R _f	Factor de retardamiento(Movilidad Relativa)
SDS	Lauril sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
s.s.e	Solución salina estéril
seg	segundo
%T	Por ciento de acrilamida total
TEMED	N, N, N', N', tetrametiletildiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	voltios
VP	vaciado en placa

APÉNDICE

1. **Reactivo de Bradford.** 6.0mg de azul de Coomassie G-250 (LKB/Bromma) se disolvieron en 100ml de ácido perclórico(Merck) al 3% v/v, en agua. Se filtró y se guardó en frasco ámbar.

2. **PBS 0.10M, pH7.2-7.4.** NaCl 8g, Na₂HPO₄ 1.22g, KH₂PO₄ 0.2g, KCl 0.2g(reactivos Merck), se disolvieron, se ajustó el pH y se aforó a un litro de agua.

3. Reactivos para electroforesis.

3.1. Amortiguador para Preparar Gel de Empaquetamiento o Concentrador.
Tris-HCl 1.2M, pH 6.8

3.2. Amortiguador para Preparar Gel de Corrimiento o Separación.
Trs-HCl 3.02M, pH 8.8

3.3. Amortiguador de Corrimiento, con SDS

Glicina 192mM, Trizma base 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3

3.4. Amortiguador de Muestra 4x, con SDS

En 17.5ml de Tris-OH 49mM, pH 6.75-6.80 se disolvieron 1g de SDS y 5mg de azul de bromo-fenol, el producto se mezcló con 5ml de glicerol y se aforó a 50ml con agua. Al momento de usarse se agregó 5% v/v de 2-mercaptoetanol.

3.5. Acrilamida/bisacrilamida 30%(acrilamida 30%T, 2.7%C)

29.2g de acrilamida y 0.8g de metilén-bis-acrilamida fueron mezclados con 70ml de agua en matraz Erlenmeyer (cubierto con papel aluminio) y sometidos a agitación suave por 12 horas a 4°C. Una vez a temperatura

ambiente se aforó a 100ml con agua, se filtró con papel Whatman y se mezcló con Amberlita XAD7(mesh 20-60) en proporción 4:1 v/v dejándose en agitación suave durante 1hora a 4°C. Se filtró, recuperándose en frasco cubierto con papel aluminio, y se almacenó a 4°C.

Miniprotean:

3.6. Gel de Empaquetamiento o Concentrador (5%T, 2.7%C), con SDS.

Acrilamida bis-acrilamida 30%	
(30%T, 2.7%C).....	499µl
Amortiguador Tris-HCl.....	375
ph 6.8	
Agua bidestilada.....	1980
SDS 10% p/v.....	30
Persulfato de Amonio 10% p/v.....	10.5
TEMED.....	3

3.7. Gel de Corrimiento o Separación, en Gradiente 8.75 –18%, 2.7%C

Acrilamida bis-acrilamida 30%	8%	18%
(30%T, 2.7%C).....	0.832ml	1.461

Amortiguador Tris-HCl.....	0.457	0.458
6.8		

Agua bidestilada.....	1.100	0.224
------------------------------	--------------	--------------

Glicerol 50% v/v.....	0.166	0.257
------------------------------	--------------	--------------

SDS 10% p/v.....	30µl	30µl
-------------------------	-------------	-------------

Persulfato de Amonio 10% p/v.....	8	8
--	----------	----------

TEMED.....	1.25	1.25
-------------------	-------------	-------------

Protean:

3.6. Gel de Empaquetamiento o Concentrador (5%T, 2.7%C), con SDS.

Acrilamida bis-acrilamida 30%	
(30%T, 2.7%C).....	1.99ml
Amortiguador Tris-HCl.....	1.5

ph 6.8

Agua bidestilada.....	7.92
SDS 10% p/v.....	0.12
Persulfato de Amonio 10% p/v.....	0.042
TEMED.....	0.012

3.7. Gel de Corrimiento o Separación, en Gradiente 8.75 –18%, 2.7%C

Acrilamida bis-acrilamida 30%	8%	18%
(30%T, 2.7%C).....	2.04ml	4.197
Amortiguador Tris-HCl.....	1.32	1.32

6.8

Agua bidestilada.....	3.060	0.645
Glicerol 50% v/v.....	0.480	0.740
SDS 10% p/v.....	69µl	69µl
Persulfato de Amonio 10% p/v.....	25	25
TEMED.....	3	3

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.Reactivos para la determinación de Anticuerpos anti-proteínas intracelulares de *S. somaliensis*, *A. madurae* y *N. brasiliensis* mediante inmunoelectrotransferencia.

4.1 Buffer de Transferencia Tris-HCl 195mM, Glicina 192mM

se disolvieron 14.41 g de Glicina y 4. g de Trizma-HCl en 400ml de agua más 400ml de metanol, y se aforó a 1L.

4.2 PBS-Tween. PBS 0.1M pH 7.4 se mezcló en proporción 1, 000 :1 v/v con Tween 20 (BIO RAD).

4.3. Solución bloqueadora al 3% p/v. Se disolvieron 3g de lecho descremada(Svelty, Nestlé) en PBS-Tween y se aforaron a 100ml con el mismo PBS-Tween.

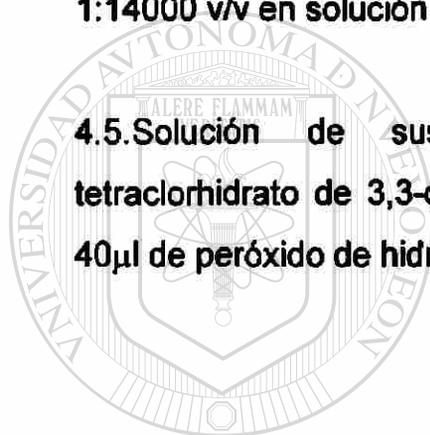
4.4. Antisueros conjugados a Peroxidasa.

Ig anti-inmunoglobulinaG de ratón, conjugado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:6000 v/v en solución bloqueadora al 1%.

Ig anti-inmunoglobulinaG de rata, conjugado a peroxidasa (Sigma), diluido 1:12000 v/v en solución bloqueadora al 1%.

Ig anti-inmunoglobulinaG de conejo, conjugado a peroxidasa(sigma), diluido 1:14000 v/v en solución bloqueadora al 1%.

4.5. Solución de sustrato/cromógeno. Se disolvieron 10mg de tetraclorhidrato de 3,3-diaminobencidina en 20ml de PBS y se añadieron 40µl de peróxido de hidrógeno.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLAS

Tabla. 1 Antígenos de *S. somaliensis* identificados por suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma.

Antígenos proteicos de <i>S. somaliensis</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados	Ratones BALB/c Inmunizados	Ratas Lewis Infectadas	Ratas Lewis Inmunizadas	Conejos Nueva Zelanda Infectados	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados
10	0/8	5/8	0/6	0/6	0/2	2/2
12	0/8	6/8	0/6	6/6	2/2	2/2
20	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
21	3/8	8/8	2/6	6/6	2/2	2/2
23	1/8	6/8	2/6	6/6	2/2	2/2
28	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
29	0/8	3/8	4/6	1/6	2/2	2/2
30	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
32	7/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
40	5/8	5/8	6/6	0/6	2/2	2/2
42	1/8	1/8	3/6	0/6	1/2	1/2
44	0/8	0/8	1/6	5/6	1/2	2/2
49	0/8	0/8	0/6	3/6	0/2	2/2
53	8/8	0/8	6/6	0/6	2/2	2/2

Ratones n=8; ratas n=6 y conejos n=2

Tabla. 2 Antígenos de *A. madurae* identificados por suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma.

Antígenos proteicos de <i>A. madurae</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados	Ratones BALB/c Inmunizados	Ratas Lewis Infectadas	Ratas Lewis Inmunizadas	Conejos Nueva Zelanda Infectados	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados
10	2/8	8/8	2/6	4/6	2/2	2/2
12	3/8	6/8	0/6	3/6	2/2	2/2
15	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	1/2
17	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
21	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
28	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
32	8/8	8/8	0/6	0/6	2/2	2/2
35	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2
38	8/8	0/8	6/6	0/6	1/2	2/2
40	2/8	3/8	6/6	5/6	0/2	0/2
44	3/8	2/8	1/6	4/6	1/2	1/2
47	0/8	6/8	0/6	0/6	0/2	0/2
54	0/8	6/8	0/6	0/6	0/2	0/2
76	1/8	0/8	1/6	4/6	0/2	0/2

Ratones n=8; ratas n=6 y conejos n=2

Tabla. 3 Antígenos de *N. brasiliensis* identificados por suero de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con la misma.

Antígenos proteicos de <i>N. brasiliensis</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados	Ratones BALB/c Inmunizados	Ratas Lewis Infectadas	Ratas Lewis Inmunizadas	Conejos Nueva Zelanda Infectados	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados
15	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
21	0/8	2/8	6/6	0/6	2/2	2/2
24	5/8	7/8	3/6	6/6	2/2	2/2
28	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
35	5/8	8/8	3/6	0/6	2/2	2/2
38	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
41	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2
45	0/8	0/8	5/6	0/6	2/2	2/2
53	0/8	8/8	0/6	0/6	2/2	2/2
61	8/8	8/8	6/6	6/6	2/2	2/2

Ratones n=8; ratas n=6 y conejos n=2

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla. 4 Antígenos de *S. somaliensis* identificados por sueros de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con *A. madurae* o con *N. brasiliensis*.

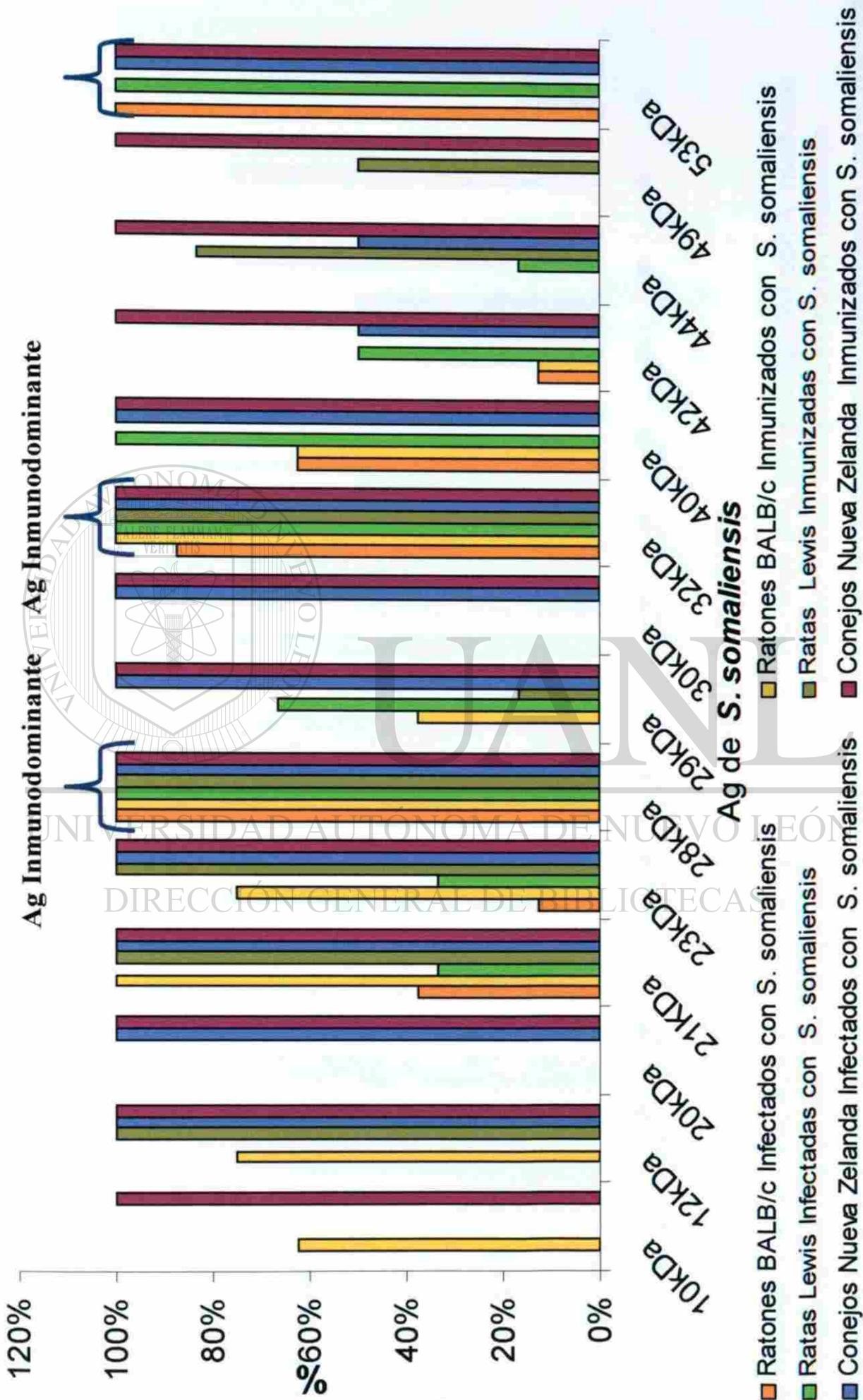
Antígenos proteicos de <i>S. somaliensis</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con <i>A. madurae</i> .	Ratones BALB/c Inmunizados con <i>A. madurae</i>	Ratas Lewis Infectadas con <i>A. madurae</i>	Ratas Lewis Inmunizadas con <i>A. madurae</i>	Conejos Nueva Zelanda Infectados con <i>A. madurae</i>	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con <i>A. madurae</i>
10	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	2/2
12	0/8	1/8	0/6	0/6	1/2	2/2
20	3/8	6/8	0/6	0/6	0/2	½
21	3/8	6/8	0/6	0/6	2/2	2/2
23	3/8	6/8	0/6	0/6	2/2	2/2
Antígenos proteicos de <i>S. somaliensis</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con <i>N. brasiliensis</i>	Ratones BALB/c Inmunizados con <i>N. brasiliensis</i>	Ratas Lewis Infectadas con <i>N. brasiliensis</i>	Ratas Lewis Inmunizadas con <i>N. brasiliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Infectados con <i>N. brasiliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con <i>N. brasiliensis</i>
10	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	2/2
12	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	½
20	4/8	7/8	0/6	2/6	0/2	0/2
21	4/8	7/8	0/6	5/6	2/2	2/2
23	3/8	1/8	0/6	1/6	2/2	2/2

Tabla. 5 Antígenos de *A. madurae* identificados por sueros de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con *N. brasiliensis* o con *S. somaliensis*.

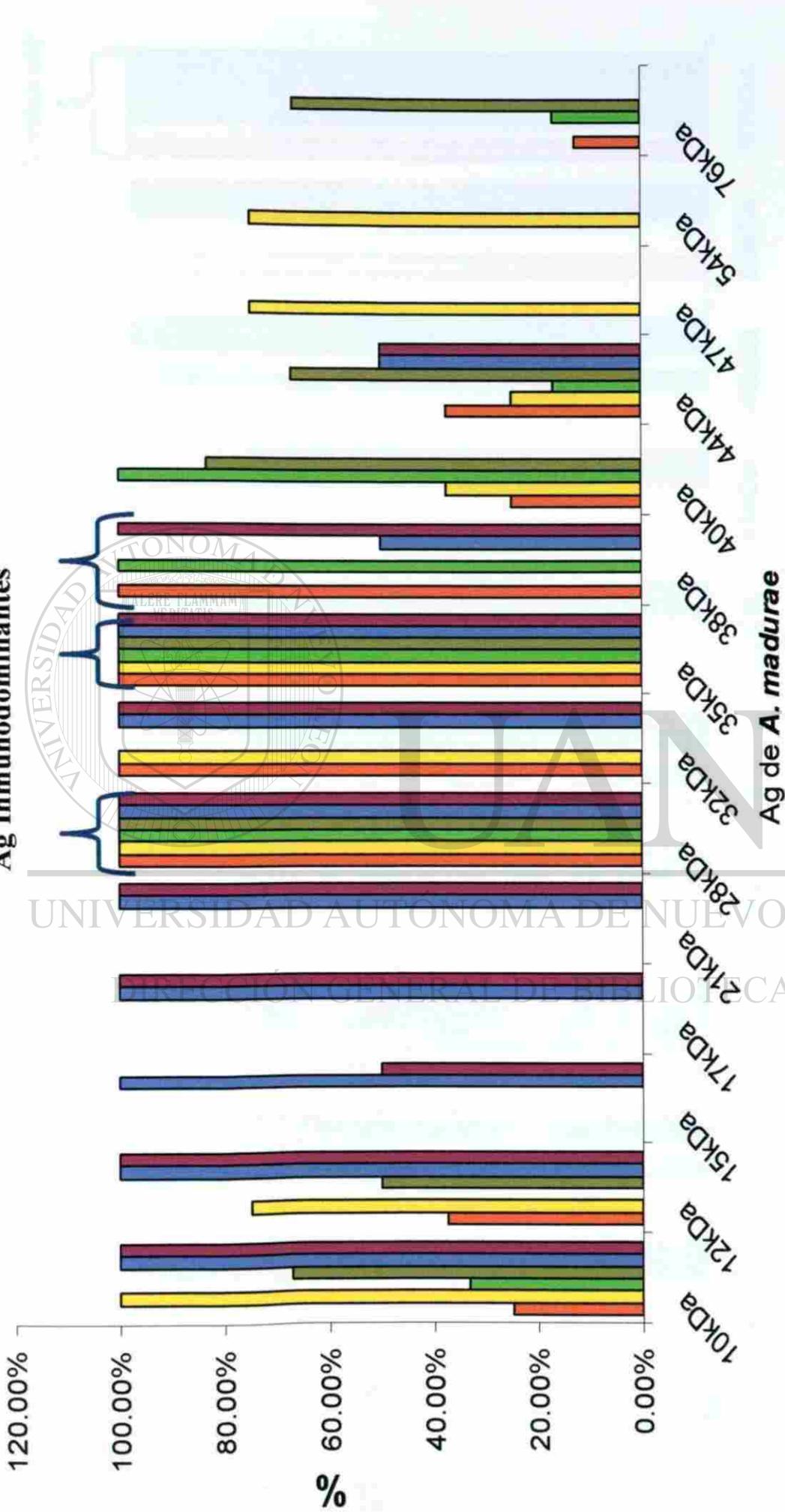
Antígenos proteicos de <i>A. madurae</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con <i>N. brasiliensis</i>	Ratones BALB/c Inmunizados con <i>N. brasiliensis</i>	Ratas Lewis Infectadas con <i>N. brasiliensis</i>	Ratas Lewis Inmunizadas con <i>N. brasiliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Infectados con <i>N. brasiliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con <i>N. brasiliensis</i>
21	0/8	3/8	0/6	0/6	0/2	0/2
Antígenos proteicos de <i>A. madurae</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con <i>S. somaliensis</i>	Ratones BALB/c Inmunizados con <i>S. somaliensis</i>	Ratas Lewis Infectadas con <i>S. somaliensis</i>	Ratas Lewis Inmunizadas con <i>S. somaliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Infectados con <i>S. somaliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con <i>S. somaliensis</i>
21	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	0/2

Tabla. 6 Antígenos de *N. brasiliensis* identificados por sueros de ratones BALB/c, ratas Lewis y conejos Nueva Zelanda infectados o inmunizados con *A. madurae* o con *S. somaliensis*.

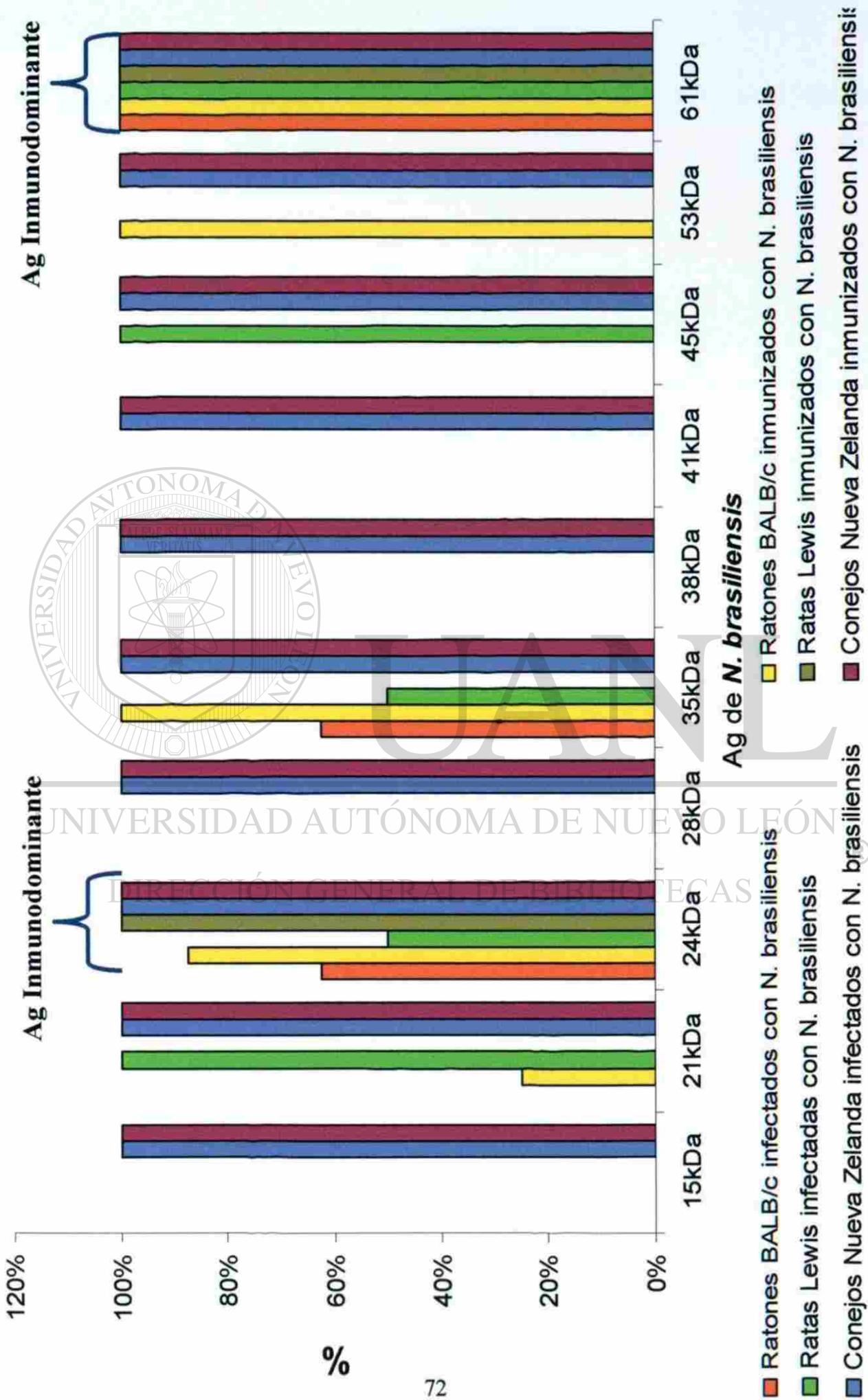
Antígenos proteicos de <i>N. brasiliensis</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con <i>A. madurae</i> .	Ratones BALB/c Inmunizados con <i>A. madurae</i>	Ratas Lewis Infectadas con <i>A. madurae</i>	Ratas Lewis Inmunizadas con <i>A. madurae</i>	Conejos Nueva Zelanda Infectados con <i>A. madurae</i>	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con <i>A. madurae</i>
24	2/8	6/8	0/6	0/6	2/2	2/2
61	0/8	0/8	0/6	0/6	0/2	1/2
Antígenos proteicos de <i>N. brasiliensis</i> (PM kDa)	Ratones BALB/c Infectados con <i>S. somaliensis</i>	Ratones BALB/c Inmunizados con <i>S. somaliensis</i>	Ratas Lewis Infectadas con <i>S. somaliensis</i>	Ratas Lewis Inmunizadas con <i>S. somaliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Infectados con <i>S. somaliensis</i>	Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con <i>S. somaliensis</i>
24	0/8	0/8	0/6	0/6	2/2	2/2

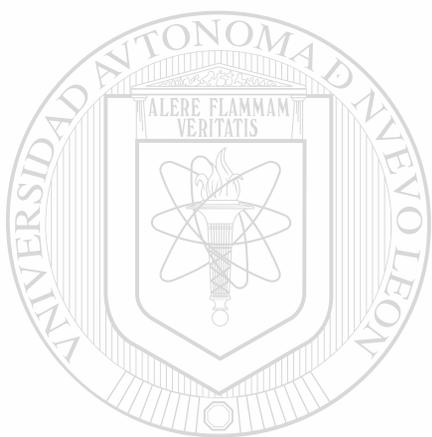


Ag Inmunodominantes



- Ratones BALB/c Inmunizados con *A. madurae*
- Ratas Lewis Inmunizadas con *A. madurae*
- Conejos Nueva Zelanda Inmunizados con *A. madurae*





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



