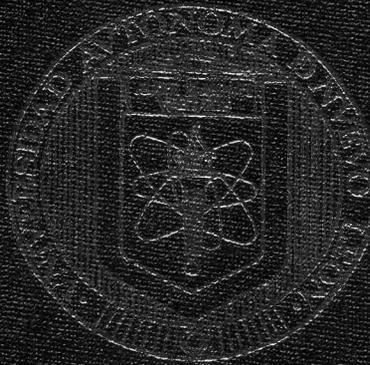


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



INMUNIDAD PASIVA CON ANTICUERPOS
MONOCLONALES IgM E IgG ANTI-P61 EN LA
INFECCION EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis*

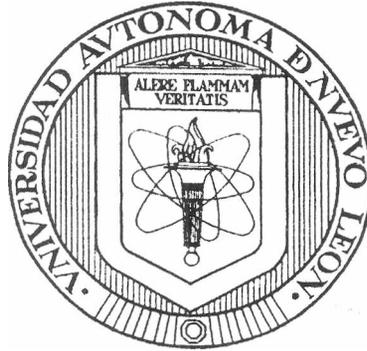
POR
MARIA LOURDES GONZALEZ SUAREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en inmunología

Enero, 2009

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**INMUNIDAD PASIVA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES IgM
E IgG ANTI-P61 EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR
*Nocardia brasiliensis***

Por

MARÍA LOURDES GONZÁLEZ SUÁREZ

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

Enero, 2009

**INMUNIDAD PASIVA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES IgM
E IgG ANTI-P61 EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL
POR *Nocardia brasiliensis***

Aprobación de la Tesis:



DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Director de Tesis



DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Comisión Tesis

d .

DRA. MARÍA DE LO&ANGELES CASTRO CORONA
Comisión de Tesis

DR. ADRIAN CPOVANNI ROSAS TARACO
Comisión de Tesis

DR. OLIVERIO WELSH LOZANO
Comisión de Tesis

DR. JONATHAN ATGARRAZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

**INMUNIDAD PASIVA CON ANTICUERPOS
MONOCLONALES IgM E IgG ANTI-P61
EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL
POR *Nocardia brasiliensis*.**

Presentado por: M.C.P. María Lourdes González Suárez

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona, con el apoyo de CONACYT (Proyectos No. 40236-M y No. 47542), PAICYT SA1185-05 y PAICYT SA 1628-07.



Dr. Mario César Salinas Carmona
Asesor Doctoral

DEDICATORIA

A mi familia, presente y futura,
por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que contribuyeron a la realización
de este Proyecto Doctoral.

En especial a mi familia,

a mi asesor, el Dr. Mario C. Salinas Carmona,

a los miembros de mi Comisión de tesis,

a mis profesores de posgrado y a todo el

Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina

de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CONTENIDO GENERAL

	Página
Portada.....	i
Aprobación de tesis.....	ii
Lugar de trabajo.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Contenido general.....	vi
Lista de figuras.....	xiv
Lista de tablas.....	xvi
Abreviaturas.....	xvii
Resumen.....	xxi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Actinomicetos.....	7
2.1.1 Taxonomía.....	8
2.1.2 Género <i>Nocardia</i>	9
2.1.2.1 Morfología.....	10
2.1.2.2 Pruebas bioquímicas.....	10
2.1.2.3 Aspectos clínicos.....	11

2.1.2.3.1 Micetoma	13
2.1.2.3.1.1 Localización geográfica e incidencia del micetoma.....	15
2.1.2.4 Lesión brasiliensis.....	16
2.1.2.5 Factores de virulencia de <i>Nocardia</i>	16
2.1.2.6 Respuesta inmune contra <i>Nocardia</i>	20
2.1.2.6.1 Inmunidad innata.....	20
2.1.2.6.2 Inmunidad adquirida.....	22
2.1.2.6.2.1 Inmunidad celular.....	22
2.1.2.6.2.2 Inmunidad humoral.....	23
2.1.2.6.2.2.1 Producción de anticuerpos monoclonales <i>anW-Nocardia</i>	26
2.2 Efecto protector de la inmunización pasiva contra otros microorganismos intracelulares.....	28
2.2.1 Ensayos bactericidas con anticuerpos monoclonales.....	30
2.2.2 Transferencia pasiva de células B.....	32
2.2.3 Transferencia pasiva de anticuerpos policlonales.....	33
2.2.4 Transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales.....	35
2.2.4.1 Transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales tipo IgG.....	35
2.2.4.2 Transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales tipo IgM.....	39
3. JUSTIFICACION.....	41

4. HIPOTESIS.....	42
5. OBJETIVOS.....	43
5.1 Objetivo general.....	43
5.2 Objetivos específicos.....	43
6. MATERIALES Y METODOS.....	44
6.1 Materiales.....	44
6.1.1 Lugar de trabajo.....	44
6.1.2 Material biológico.....	44
6.1.2.1 Células para generación de hibridomas.....	44
6.1.2.2 Bacterias.....	44
6.1.2.3 Animales de experimentación.....	45
6.1.3 Reactivos.....	45
6.1.3.1 Reactivos para los cultivos celulares.....	45
6.1.3.2 Reactivos para el cultivo bacteriano.....	46
6.1.3.3 Reactivos para pruebas inmunológicas.....	46
6.1.4 Equipo.....	47
6.1.5 Software.....	49
6.2 Métodos.....	49
6.2.1 Cultivo celular.....	49
6.2.1.1 Células de ratón.....	49
6.2.1.2 Bacterias.....	50
6.2.2 Almacenamiento celular.....	50
6.2.2.1 Almacenamiento de células.....	50

6.2.2.2 Almacenamiento de <i>Nocardia brasiliensis</i>	51
6.2.3 Obtención de proteínas.....	51
6.2.3.1 Obtención de extracto celular crudo.....	51
6.2.3.2 Purificación de P61.....	52
6.2.4 Determinación de la concentración proteica.....	53
6.2.5 Electroforesis.....	54
6.2.6 Ensayos inmunológicos.....	55
6.2.6.1 ELISA <i>anti-Nocardia</i> (ECO y P61).....	55
6.2.6.2 Western blot <i>anti-Nocardia</i> (ECO y P61).....	56
6.2.7 Inmunizaciones.....	57
6.2.7.1 Esquemas de inmunización activa.....	57
6.2.7.2 Re-inmunizaciones.....	58
6.2.8 Obtención de células de bazo de ratón inmunizado.....	58
6.2.8.1 Obtención de esplenocitos totales.....	58
6.2.8.2 Separación de células mononucleares mediante gradiente de Ficoll.....	59
6.2.8.3 Lisis de eritrocitos a partir de esplenocitos totales.....	59
6.2.9 Conteo de células en cámara de Neubauer.....	60
6.2.10 Generación de hibridomas.....	61
6.2.10.1 Fusión.....	61
6.2.10.2 Selección con hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT)...	62
6.2.10.3 Selección de pozos productores de anticuerpos.....	62
6.2.10.4 Selección de clonas mediante dilución limitante	63

6.2.10.5 Expansión clonal.....	64
6.2.10.5.1 Expansión clonal in vitro.....	64
6.2.10.5.2 Expansión clonal in vivo.....	65
6.2.11 Purificación de anticuerpos monoclonales.....	66
6.2.11.1 Purificación de IgM monoclonal anti-P61.....	66
6.2.11.1.1. Concentración de sobrenadante de hibridomas productores de IgM.....	66
6.2.11.1.2 Precipitación de euglobulinas.....	66
6.2.11.2 Purificación de IgG monoclonal anti-P61.....	67
6.2.11.2.1 Precipitación con sulfato de amonio.....	67
6.2.11.2.2 Purificación de IgG mediante cromatografía de afinidad.....	68
6.2.12 Determinación de la concentración de anticuerpos monoclonales.....	69
6.2.12.1 Determinación mediante absorbancia a 280 nm.....	69
6.2.12.2 Determinación mediante nefelometría láser.....	69
6.2.13 Inhibición de actividad de catalasa.....	70
6.2.14 Obtención de sueros como fuente de complemento para ensayos in vivo e in vitro.....	72
6.2.14.1 Obtención de suero de cobayo como fuente de complemento.....	72
6.2.14.2 Adsorción de suero de cobayo.....	72

6.2.14.3 Recolección de suero hiperinmune <i>anti-Nocardia</i>	
muerta por calor.....	73
6.2.15 Cuantificación de unidades formadoras de colonias.....	73
6.2.16 Ensayos bactericidas.....	74
6.2.16.1 Estandarización en nefelómetro de McFarland de la	
suspensión bacteriana de <i>N. brasiliensis</i>	74
6.2.16.2 Procedimiento de ensayos bactericidas.....	74
6.2.17 Ensayos de inmunización pasiva con anticuerpos	
monoclonales.....	76
6.2.17.1 Ensayo 1.....	76
6.2.17.2 Ensayo 2.....	76
7. RESULTADOS.....	78
7.1 Obtención del extracto celular crudo de <i>N. brasiliensis</i>	78
7.2 Obtención de P61 de <i>N. brasiliensis</i>	78
7.3 Esquema de inmunización.....	79
7.4 Obtención de células de bazo de ratón inmunizado.....	79
7.5 Generación de hibridomas.....	80
7.6 Determinación de isotipo y subisotipo de anticuerpos	
monoclonales anti-P61.....	81
7.7 Expansión clonal de hibridomas anti-P61.....	86
7.7.1 Expansión clonal in vitro.....	86
7.7.2 Expansión clonal in vivo.....	87

7.8 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-P61	
de cultivo in vitro.....	87
7.9 Determinación de la concentración de anticuerpos	
monoclonales anti-P61.....	88
7.9.1 Curvas de calibración.....	88
7.9.2 Concentración de anticuerpos monoclonales IgM	
anti-P61 de cultivo in vitro.....	90
7.9.3 Concentración de anticuerpos monoclonales IgG	
anti-P61 de cultivo in vitro.....	91
7.10 Determinación de la inhibición de la actividad de P61.....	92
7.11 Ensayos bactericidas in vitro.....	93
7.11.1 Ensayos bactericidas in vitro de los grupos controles	
positivos.....	93
7.11.2 Ensayos bactericidas in vitro de los anticuerpos	
monoclonales anti-P61.....	94
7.12 Efecto protector de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG	
en la infección experimental por <i>N. brasiliensis</i>	97
7.12.1 Ensayo 1.....	97
7.12.2 Ensayo 2.....	100
8. DISCUSION.....	104

9. CONCLUSIONES	117
10. PERSPECTIVAS.....	119
REFERENCIAS.....	120

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Electroforesis de proteínas de <i>N. brasiliensis</i> en un gel de poliacrilamida con gradiente 8-18%.....	79
FIGURA 2. Fotografía digital de hibridomas.....	81
FIGURA 3. Identificación mediante Western blot de anticuerpos monoclonales IgM a IgG contra proteínas del extracto celular crudo de <i>N. brasiliensis</i> a partir de los sobrenadantes de hibridomas productores.....	83
FIGURA 4. Identificación mediante Western blot de anticuerpos monoclonales IgM a IgG anti-P61 de <i>N. brasiliensis</i> a partir de los sobrenadantes de hibridomas productores.....	85
FIGURA 5. Identificación mediante Western blot de anticuerpos monoclonales IgG anti-P61 de <i>N. brasiliensis</i> posterior a la purificación por columna de afinidad.....	88
FIGURA 6. Curva de Calibración de los estándares de IgM de ratón.....	89
FIGURA 7. Curva de Calibración de los estándares de IgG de ratón.....	89
FIGURA 8. Identificación mediante Western blot de anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 de <i>N. brasiliensis</i> purificados por precipitación de eugobulinas.....	91
FIGURA 9. Efecto bactericida in vitro de los grupos controles.....	94
FIGURA 10. Efecto bactericida in vitro de los anticuerpos monoclonales IgM anti-P61.....	96
FIGURA 11. Efecto bactericida in vitro de los anticuerpos monoclonales IgG anti-P61.....	97
FIGURA 12. Efecto de la administración de IgM monoclonal anti-P61 por vías intraperitoneal y subcutánea en el establecimiento del micetoma. Ensayo 1.....	99

FIGURA 13. Fotografías digitales representativas de los grupos de estudio del Ensayo 1, a diferentes días posteriores a la infección experimental con <i>N. brasiliensis</i>	100
FIGURA 14. Efecto de la administración intraperitoneal de IgM e IgG Monoclonales anti-P61 en el establecimiento del micetoma. Ensayo 2.....	102
FIGURA 15. Fotografías digitales representativas de los grupos de estudio del Ensayo 2, a diferentes días posteriores a la infección experimental con <i>N. brasiliensis</i>	103

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Grupos de estudio de ensayos bactericidas in vitro.....	75
TABLA 2. Determinación del isotipo IgM e IgG anti- extracto celular crudo mediante la técnica de ELISA.....	82
TABLA 3. Clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-P61.....	84
TABLA 4. Determinación del subisotipo de IgG monoclonal anti-P61 mediante la técnica de ELISA.....	85
TABLA 5. Confluencia máxima según la dimensión de las placas y frascos de cultivo celular.....	86
TABLA 6. Concentración in vitro de IgM monoclonal anti-P61.....	90
TABLA 7. Concentración in vitro de IgG monoclonal anti-P61.....	92
TABLA 8. Determinación de la actividad enzimática de P61.....	92
TABLA 9. Efecto bactericida in vitro de IgM monoclonal anti-P61 de <i>N. brasiliensis</i>	95
TABLA 10. Efecto bactericida in vitro de IgG monoclonal anti-P61 de <i>N. brasiliensis</i>	95

ABREVIATURAS

#	número
%	por ciento
Mi	micro litro
pm	micrómetro
2ME	2-mercaptoetanol
Ac	anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
AMI	Inmunidad mediada por anticuerpos
ASB	albúmina sérica bovina
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
BHI	infusión cerebro corazón
BMC	bacterias muertas por calor
C	citocina
C'	complemento
CD	Cluster of differentiation
cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
CO ₂	dióxido de carbono

Da	dalton
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
DMSO	dimetil sulfoxido
ECC	extracto celular crudo
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
Fe ⁺²	iones hierro
G	diámetro de la aguja
<i>g</i>	fuerza centrífuga relativa
g	gramo
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	ácido sulfhídrico
HAT	Flipoxantina-aminopterina-timidina
HCl	ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1 -piperacil-(1)] etanosulfónico
HGPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa
hr	hora
HT	Hipoxantina-timidina
HUJEG	Hospital Universitario José Eleuterio González
IFN	Interferón
igG	Inmunoglobulina G
igM	Inmunoglobulina M
¡NOS	Oxido nítrico sintetasa inducible

IP	intraperitoneal
katG	Gen de catalasa
kDa	Kilodaltones
KMnO ₄	permanganato de potasio
L	litro
LAM	Upoarablnomanana
LLO	Listeriolisina 0
<i>M</i>	mol
mg	miligramo
min	minuto
mi	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
N	normal
NaCl	cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
nm	nanómetro
NTU	unidades nefelométricas de turbidez
Nu	nude
°C	grados Celsius
OMP	Proteína de la membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	O-fenilendiamina dihidrocloruro

OPS	Polisacárido 0
<i>p</i>	significancia
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PH	$-\log[H^+]$
RH ₂	Radical hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
SC	subcutánea
SDS	dodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
spp	especie
Tris	hidroximetil amino metano
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	Ultra violeta
v/v	volumen a volumen
P	cadena pesada de la IgM
µg	microgramo

RESUMEN

María Lourdes González Suárez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Obtención del Grado: Enero, 2009

Título del Estudio:

INMUNIDAD PASIVA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES IgM E IgG ANTI-P61 EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis*

Número de páginas: 134 Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias
con Orientación Terminal en Inmunología

Área de estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: En la actualidad se conoce que la inmunidad mediada por anticuerpos juega un papel importante en la protección contra varios patógenos intracelulares. El uso de anticuerpos monoclonales representa una herramienta muy útil para investigar la inmunidad humoral, pues consta de una preparación homogénea de anticuerpos con una misma especificidad e isotipo. En este proyecto se estudió el efecto protector de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 en la infección experimental por *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358). Se llevó a cabo la producción, purificación y caracterización de anticuerpos monoclonales IgM e IgG dirigidos contra el antígeno inmunodominante P61 de *N. brasiliensis*. Se estudió el efecto bactericida in vitro de ambos anticuerpos, así como su efecto protector in vivo contra el establecimiento del actinomicetoma en ratones BALB/c.

Contribuciones y conclusiones: Los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 mostraron efecto bactericida in vitro contra *N. brasiliensis*. Contrario a lo esperado, el efecto bactericida in vitro fue mayor para los anticuerpos monoclonales IgG anti-P61, que el observado para los anticuerpos monoclonales IgM. Sin embargo, el efecto in vivo observado tras la administración intraperitoneal de IgG monoclonal anti-P61 no fue protector ya que los ratones desarrollaron micetoma, mientras que aquellos que recibieron una sola dosis de anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 por vía intraperitoneal mostraron una leve inflamación del cojinete plantar sin llegar a establecerse el micetoma. El efecto protector fue más evidente al aplicar 3 dosis consecutivas por vía intraperitoneal de IgM monoclonal anti-P61, ya que estos ratones no presentaron inflamación ni micetoma, confirmándose que estos anticuerpos monoclonales fueron capaces de conferir protección total contra el establecimiento del micetoma en la infección experimental. Estos hallazgos sugieren el importante papel de la IgM en la protección contra la infección por *N. brasiliensis*.

Firma del Asesor:



Dr. Mario César Saínas Carmona

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

Desde tiempos lejanos, el hombre se ha preocupado por encontrar la cura a las enfermedades que aquejan a la humanidad. Gracias a las investigaciones médicas, ha sido posible dilucidar como se producen y conocer sus causas, esta información ha contribuido a prevenir y tratar varias de ellas.

El empleo de herramientas inmunológicas ha permitido que muchas de las enfermedades sean controladas y, en algunos casos, incluso erradicadas del planeta. Este es el caso de la vacunación, cuyo objetivo central es estimular una respuesta inmune protectora. Una vacuna definida como "ideal", sería aquella que brindara el mismo grado de inmunidad que la infección natural, que sea de bajo costo y no produzca efectos adversos. Debido a que la mayoría de las vacunas no alcanzan este ideal, frecuentemente es necesario realizar re-inmunizaciones llevando al organismo hacia una memoria inmunológica: es decir, la capacidad de responder con mayor fuerza ante un antígeno con exposiciones repetidas.

Los esquemas de re-inmunización han dado muy buenos resultados en la protección contra enfermedades bacterianas y virales, sin embargo, en los casos de bacterias intracelulares no han tenido el éxito esperado. Por ejemplo, la única vacuna actualmente disponible para tratar de prevenir la tuberculosis, Bacilo Calmette-Guérin (BCG), no ha sido efectiva en controlar la epidemia de tuberculosis mundial a pesar de la amplia distribución a través de programas de inmunización encabezados por la Organización de las Naciones Unidas. Es por esto que existe una urgente necesidad de desarrollar vacunas efectivas contra bacterias intracelulares (Kaufmann, 2001).

Existen pasos críticos en el diseño de una vacuna aceptable. En primer lugar, es importante definir los componentes necesarios para brindar protección. Bajo este precepto, una infección natural debe inducir una respuesta inmune a los mismos componentes de la vacuna. También resulta de gran importancia conocer el mecanismo de acción de cada uno de estos componentes, tanto *in vitro* como *in vivo*, y reconocer los mecanismos de inmunidad involucrados. Múltiples efectores inmunes pueden ir dirigidos contra más de un antígeno (Klein, 2000). Es por esto que resulta de gran importancia conocer al microorganismo, su estructura, sus componentes y su relación con el hospedero, así como la respuesta inmune que éste monta para protegerse.

Las primeras interacciones entre el hospedero y el microorganismo determinan uno de tres posibles desenlaces: primero, puede ser que un fagocito funcione como efector y de muerte a los organismos ingeridos. Segundo, la bacteria podría inducir la muerte celular del fagocito. Finalmente, los microorganismos podrían adaptarse al ambiente hostil y conviertan al fagocito en su célula hospedera para establecer la infección (Kaufmann, 2001).

Las bacterias pueden ser removidas por mecanismos de defensa inespecíficos como los movimientos mucociliares o la peristalsis, o pueden ser destruidos por fagocitos sin requerir de una respuesta específica del sistema inmune. Los gérmenes que sobreviven estas reacciones de defensa inespecífica colonizan tejidos más profundos y establecen una infección en un nicho adecuado. En esta etapa, el hospedero generalmente desarrolla una respuesta inmune adquirida específica contra el agente infeccioso.

La infección es erradicada cuando el sistema inmune tiene éxito en la eliminación del patógeno antes de que se desarrolle una enfermedad clínicamente evidente. El tejido dañado puede aumentar significativamente antes de que el sistema inmune pueda controlar al patógeno efectivamente y se desarrolle la enfermedad. Este es el caso de muchas bacterias extracelulares que causan enfermedades agudas, pero es menos común en el caso de bacterias intracelulares. Es posible que el sistema inmune logre restringir al agente infeccioso pero falla por completo para erradicarlo. Bajo estas

circunstancias, se desarrolla un equilibrio a largo plazo entre la persistencia microbiana y la respuesta inmune. Sin embargo, este balance permanece lábil y puede ser favorecido hacia el patógeno convirtiendo la infección aguda en una enfermedad de crónica.

El lapso de tiempo entre la entrada al hospedero y la expresión de enfermedad está determinado por el tiempo de incubación, en la caso de infecciones causadas por bacterias intracelulares los tiempos de incubación son de larga duración (Kaufmann, 2001).

Las células T son los mediadores centrales de la protección contra infecciones por bacterias intracelulares. Estas células T no interactúan directamente con los microbios, sino que lo hacen con la célula infectada. Las reacciones principales contra bacterias intracelulares son granulomatosas. La ruptura de un granuloma promueve la diseminación bacteriana y la formación de lesiones adicionales (Abbas, 2003).

El papel de los anticuerpos en las infecciones contra bacterias intracelulares ha sido debatido durante muchos años. El concepto de una dualidad inmunológica, en que la inmunidad contra patógenos intracelulares es mediada principalmente por mecanismos celulares y, la inmunidad contra patógenos extracelulares es por anticuerpos, fue el paradigma reinante durante mucho tiempo. Sin embargo, esto no es universalmente aplicable a todos los

patógenos ya que se ha comprobado que la inducción de inmunidad mediada por anticuerpos puede ser suficiente para prevenir la infección causada por algunos patógenos intracelulares (Casadevall, 2004).

Una herramienta, que significó uno de los avances más importantes para aclarar la controversia, si la protección contra intracelulares era debida a la inmunidad celular o a la inmunidad humoral, fue la aplicación de la tecnología de hibridomas. Dicha tecnología ha sido empleada para investigar el potencial de la inmunidad mediada por anticuerpos contra ciertos patógenos para los cuales el suero hiperinmune no mostró eficiencia. En contraste al suero hiperinmune, el cual varía en la composición, isotipo y especificidad de los anticuerpos; los anticuerpos monoclonales brindan una preparación homogénea de reactivos definidos con los cuales es posible investigar variables que contribuyen a la protección mediada por anticuerpos. Varios estudios realizados con anticuerpos monoclonales han demostrado protección pasiva contra microorganismos intracelulares, mientras los experimentos con sueros hiperinmunes brindaban resultados negativos o inconsistentes. Para estos patógenos, la identificación de anticuerpos monoclonales protectores estableció un precedente: los anticuerpos son efectivos contra microorganismos intracelulares (Casadevall, 2004).

En base a estos nuevos descubrimientos, nos planteamos estudiar el papel de los anticuerpos monoclonales contra *Nocardia brasiliensis*, patógeno intracelular, tratando de establecer su efecto en la protección contra el

establecimiento del micetoma experimental. De esta manera, apoyar el concepto de que la inmunidad humoral juega un papel importante contra los patógenos intracelulares.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Actinomicetos

Los actinomicetos aeróbicos son microorganismos gram positivos, filamentosos, parcialmente acidorresistentes, ramificados, que comparten características en común con miembros del género *Mycobacterium* y *Corynebacterium*. Estos causan infecciones importantes tanto en humanos como en animales. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la enfermedad son determinadas por factores como la ruta de infección y la presencia o ausencia de un sistema inmune que funciona adecuadamente. El signo patológico típico de la enfermedad es una reacción inflamatoria granulomatosa. El diagnóstico de estas infecciones ha sido difícil en parte debido a la presentación clínica no específica, requiriendo de procedimientos diagnósticos invasivos; su aislamiento es difícil y su clasificación imperfecta (McNeil, 1994).

2.1.1 Taxonomía

La identificación y taxonomía definitiva de los actinomicetos es compleja y continúa evolucionando (Salinas-Carmona, 2000). Anteriormente se consideraba que los actinomicetos aeróbicos eran hongos, debido a que poseen hifas aéreas, considerada como una característica propia de los hongos filamentosos. Sin embargo, gracias a la identificación de los componentes de su pared celular, en particular la composición lipídica y de peptidoglicanos, así como la ausencia de quitina contribuyó a que se les definiera como bacterias (McNeil 1994).

Los actinomicetos pertenecen a la Clase de *Actinobacteria*. Esta clase incluye muchos organismos que muestran crecimiento micelial, o tendencia a formar micelios. La secuenciación del ARN ribosomal 16S ha permitido el reconocimiento de 39 familias y 130 géneros dentro de esta clase. Dentro del Orden de los *Actinomycetales* se encuentran las familias *Micromonosporaceae*, *Frankiaceae*, *Acidothermaceae*, *Sporichthyaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Microsphaeraceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Streptomycetaceae*, *Nocardiaceae*, *Gordoniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Tsukamurellaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Dermabacteraceae*, *Jonesiaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Dermatophilaceae*, *Micrococcaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Actinomucetaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Nocardiodaceae*, *Streptosporangiaceae*, *Thermonosporaceae*, *Nocardiopsaceae*, *Glycomucetaceae* (Ventura, 2007).

2.1.2 Género *Nocardia*

En 1888, en la Isla de Guadalupe, Edmond Nocard aisló un microorganismo aeróbico filamentosos de una lesión de ganado. Un año después, Trevisan introdujo el género *Nocardia* para clasificar el microorganismo aislado por Nocard y lo nombró *Nocardia farcinica*. En 1890, Eppinger aisló un microorganismo similar de un absceso cerebral humano, el cual posteriormente fue llamado *Nocardia asteroides* (Beaman, 1994).

El género *Nocardia* es un grupo de bacterias perteneciente a la Familia *Nocardiaceae* que a su vez forma parte del Orden de los Actinomycetales. El género *Nocardia* se encuentra relacionado filogenéticamente con otros actinomicetos que contienen ácidos micólicos, tales como: *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Gordona*, *Tsukamureiia*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* (Beaman, 1994). Comprende varias especies que se sabe son la causa de un amplio espectro de enfermedades clínicas tanto en humanos como en animales. Mientras que la mayoría de las infecciones causadas por *Nocardia* se han atribuido a *Nocardia asteroides*, otras especies patógenas de *Nocardia* que se han descrito incluyen *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia otitidiscaviarum* y *Nocardia transvalensis* (Beaman, 1994) (McNeil, 1994) (Serrano, 2007).

La *Nocardia* tiene un crecimiento lento que puede llevar a un retraso en la identificación de la colonia posterior a su aislamiento, además tiene una morfología variada dependiendo del medio de cultivo y de las diferentes muestras obtenidas (Beaman, 1994) (Serrano, 2007).

2.1.2.1 Morfología

Una característica morfológica constante de *Nocardia spp.* es la tendencia de que tanto sus hifas aéreas como las hifas en el sustrato se fragmentan en elementos bacilares y cocoides (Beaman 1994) (McNeil 1994).

La mayoría de *Nocardia spp.* producen pigmentos tipo caroteinoide que resultan en colonias con colores variados como: amarillo, naranja, rosado o rojo. Las colonias en agar nutritivo son de color anaranjado sucio, granulares, acumuladas con hifa aérea escasa y blanca en los bordes (Serrano, 2007). Algunas cepas producen un pigmento tipo melanina, soluble en agua que da una coloración café al medio (Beaman, 1994).

2.1.2.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas de importancia que diferencian las tres principales especies patógenas: *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia otitidiscaviarum*, incluyen la descomposición de caseína, xantina, tirosina e hipoxantina. (Beaman 1994) (McNeil, 1994)

Las *Nocardias* son quimo-organotrofos catalasa-positivas con un metabolismo de tipo oxidativo. La composición química de la pared celular contiene ácido meso-diaminopilémico, arabinosa, galactosa (pared celular tipo IV) y ácido N-glicolilmurámico. Se encuentran ácidos micólicos unidos al peptidoglicano mediante un polímero de arabinogalactano. Estos ácidos tienen una cadena de carbonos que varía en longitud de 44 a 64 carbonos, con dobles

enlaces. Contiene ácidos tubérculo-esteáricos y fracciones de menaquinona (Beaman, 1994) (McNeil, 1994).

Un criterio para diferenciar a *Nocardia* de otros actinomicetos, es su crecimiento en un medio nutritivo suplementado con lisozima, ya que la mayoría de *Rhodococcus*, *Actinomadura* y *Streptomyces spp*, no crecen en presencia de lisozima (Beaman, 1994).

No existe un solo estudio para una identificación precisa de los microorganismos aislados. Se requiere una combinación de métodos, como lo son la quimio-taxonomía, análisis de antibiograma, taxonomía numérica, estudios de homología de ADN y estudios serológicos (Beaman, 1994).

Los actinomicetos aeróbicos han sido aislados del suelo y materia orgánica. Las especies de *Nocardia* y bacterias relacionadas son consideradas microorganismos saprofitos de suelo, principalmente responsables de la descomposición de materia orgánica de plantas (McNeil, 1994).

2.1.2.3 Aspectos Clínicos

La morbilidad y mortalidad asociada a nocardiosis ha sido poco reconocida, ya que por lo general esta enfermedad no es reportada a los sistemas de salud. Durante las últimas décadas, se ha incrementado notablemente el número de pacientes severamente inmuno-comprometidos, muchos de los cuales son extremadamente susceptibles a desarrollar nocardiosis. Las especies de *Nocardia* pueden causar enfermedad en ausencia de factores predisponentes, incluso pueden ser oportunistas (McNeil, 1994).

Debido a que la *Nocardia spp.* es ubicua en la naturaleza, el aislamiento de este microorganismo de un cultivo de un individuo no siempre indica enfermedad invasiva, puede ser sólo contaminación de la muestra en el laboratorio o colonización del hospedero. Las principales manifestaciones clínicas en humanos incluyen: faringitis, bronquitis y otitis media. Se puede asociar también a enfermedades pulmonares como tuberculosis, fibrosis quística, asma, bronquitis, aspergilosis alérgica, entre otras; las cuales predisponen a los pacientes a colonización del tracto respiratorio con *Nocardia spp* (McNeil, 1994).

En humanos, existen al menos 7 formas de enfermedad reconocida debido a una infección por *Nocardia*: nocardiosis pulmonar, nocardiosis sistémica, nocardiosis del sistema nervioso central, nocardiosis extrapulmonar, nocardiosis cutánea, subcutánea y linfocutánea y, actinomicetoma (Beaman 1994).

En contraste a la enfermedad pulmonar invasiva y la nocardiosis diseminada, que afecta predominantemente a pacientes inmuno-comprometidos, la nocardiosis cutánea afecta principalmente a pacientes aparentemente inmuno-competentes. *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia otitidiscaviarum*, son los principales agentes etiológicos de infección; sin embargo, *Nocardia brasiliensis* predomina como agente de la infección cutánea. La nocardiosis cutánea se puede subdividir en cuatro tipos clínicos: micetoma, infección linfocutánea, infección cutánea superficial (absceso o celulitis) e infección cutánea secundaria a enfermedad diseminada. Los actinomicetos

cutáneos y subcutáneos primarios son el resultado de una inoculación traumática con estos microorganismos (McNeil, 1994).

Las infecciones causadas por *N. brasiliensis* ocurren por inoculación del microorganismo en la piel y el tejido subcutáneo de manera accidental a través de espinas, principalmente en extremidades, también puede presentarse en la cara, y parte posterior del tórax (Beaman, 1994).

2.1.2.3.1 Micetoma

El micetoma fue descrito por primera vez en Madura, India en 1842; de ahí se le conoció como “Pie de Madura”. En 1846, Godfrey publicó 4 casos de una nueva entidad clínica llamada “morbus tuberculosis pedis”, posteriormente, Cárter llamó a esta condición “Micetoma” describiendo su etiología fúngica (Hay, 1992).

Los micetomas son pseudotumores granulomatosos, polifistulados, causados por la proliferación del agente infeccioso en los tejidos. Estos agentes pueden ser hongos o bacterias. Cuando son causados por bacterias, se les denomina actinomicetomas y, los causados por hongos, se les conoce como eumicetomas. Los eumicetomas y actinomicetomas son clínica y patológicamente similares, ya que se caracterizan por producir una infección crónica de tipo purulento-granulomatosa, que compromete músculos y hueso (Beaman, 1994) (McNeil, 1994) (Serrano, 2007).

Los micetomas presentan un desarrollo crónico y un carácter inflamatorio, no son contagiosos y su evolución es lenta. Se desarrolla días a meses después

de la lesión, frecuentemente indolora. Esta patología se caracteriza por la formación de abscesos que se abren a la piel formando fístulas, cuyo material contiene gránulos, característicos de la enfermedad. Los granos pueden medir de 0.5 a 5 mm, fácilmente visibles a simple vista. Estos granos están compuestos por microcolonias de los agentes causales, así como por células y restos celulares del hospedero. El color de estos granos nos puede sugerir el agente causal, ya que en su mayoría, los granos negros son causados por hongos, los granos rojos por actinomicetos, mientras los granos amarillos y blancos pueden ser causados por ambos. El estudio de su morfología, textura, color y forma pueden indicar con buen grado de certeza la identidad del organismo causal (Beaman, 1994) (McNeil, 1994) (Serrano, 2007).

Sin embargo, no es posible predecir el agente etiológico según el aspecto de la lesión, localización o imagen radiográfica. Clínicamente, los micetomas se caracterizan por edema subcutáneo, el cual es progresivo, siendo más rápida su aparición en el actinomicetoma que en el eumicetoma (Serrano 2007). Los pacientes con estas enfermedades crónicas tienen como antecedente una herida traumática localizada. El pie es el sitio más comúnmente afectado (Welsh, 2007), sin embargo, la mano, cara, y cuello también pueden afectarse. El caminar descalzo puede ser la principal forma de adquirir la infección, ya que esto potencia la exposición de los pies a heridas punzantes contaminadas con el suelo (Beaman, 1994) (McNeil, 1994).

2.1.2.3.1.1 Localización geográfica e Incidencia del micetoma.

Entre los microorganismos que causan actinomicetomas se incluyen: *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y, en menor frecuencia, *Nocardia asteroides* y *Nocardia otitidiscaviarum*. En Norteamérica, Sudamérica y Australia predomina *Nocardia brasiliensis* como agente causal de micetoma. En África predomina *Streptomyces somaliensis*. Estas infecciones afectan comúnmente a pacientes de zonas rurales de países tercermundistas (Beaman, 1994) (McNeil, 1994) (Welsh, 2007).

Las infecciones producidas por actinomicetos han sido reportadas con mayor frecuencia en áreas tropicales y subtropicales. En el continente americano, la mayor prevalencia se presenta en Venezuela y México (Welsh, 2007). En nuestro país la incidencia es mayor a 70 casos anuales. *Nocardia brasiliensis* es causante del 90% de los casos (Serrano, 2007).

A partir del aislamiento de *Nocardia* del suelo de Morelos, México se encontró que el 35.27% son especies patógenas; de éstas, *Nocardia brasiliensis* fue aislada con mayor frecuencia (20.83%) y *N. asteroides* en un 8.33% (López, 1992).

2.1.2.4 Lesión brasiliensis

Folb y colaboradores, describieron histopatológicamente las lesiones causadas por *N. asteroides* y *N. brasiliensis* en un modelo experimental en ratones. Encontraron que ambos actinomicetos causan lesiones con

características diferentes. En el caso de *N. brasiliensis* se encontró la presencia de microorganismos en diferentes estados de degeneración, dentro de macrófagos espumosos, a esto se le denominó como “lesión brasiliensis”. La lesión asteroides fue definida por la presencia de una zona fibrosa formada por células histiocíticas (Folb, 1976).

2.1.2.5 Factores de virulencia de *Nocardia*

La dificultad para estudiar los mecanismos de una enfermedad infecciosa, radica en lograr desarrollar o utilizar un modelo animal apropiado. De esta manera ha sido posible estudiar la interacción hospedero-parásito, el curso natural de la enfermedad y los mecanismos de defensa.

Los fagocitos eliminan a los organismos intracelulares durante la fase de estrés oxidativo inicial dependiente de NADPH oxidasa, seguido de una fase de estrés nitrosativo prolongado, durante la cual el crecimiento bacteriano es inhibido por iNOS.

En respuesta a estos compuestos antimicrobianos agresivos, las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia que promueven un balance dinámico durante la infección. Si los microorganismos no evaden el contacto físico con estas moléculas altamente reactivas, su supervivencia dependerá de mecanismos de detoxificación, incluyendo producción de enzimas antioxidantes, sistemas de reparación y expresión de reguladores antioxidantes específicos (Raupach, 2001).

Muchos patógenos bacterianos inducen la muerte celular. Varias vías de señalización pueden resultar en la muerte de los macrófagos, con diferencias cinéticas basadas en los factores de virulencia de cada bacteria y las caspasas involucradas.

Los mecanismos de virulencia de *Nocardia* no se ha dilucidado del todo. Se sabe que posee mecanismos efectivos con los que es capaz de evadir la respuesta inmune y, de esta manera, prevenir su destrucción dentro de los fagocitos. Dentro de los mecanismos que contribuyen a la supervivencia intracelular se incluyen la inhibición a la acidificación del fagosoma, inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma y restricción de hierro (Kaufmann, 2003).

Además de resistir al estrés oxidativo, las bacterias intracelulares deben adaptarse al ambiente hostil reinante dentro del fagosoma. Además de un ambiente metabólico propicio dentro del fagosoma, la presencia o ausencia de moléculas efectoras antibacterianas dentro de las vacuolas que contienen las bacterias intracelulares son clave en la persistencia del patógeno dentro del macrófago. La micobacteria cumple este objetivo al arrear el tráfico endosomal en un paso inicial, permitiéndose residir en un compartimento habitable que no se acidifica o se fusiona con lisosomas. En contraste, las vacuolas que contienen salmonelas progresan en la vía endosomal (Raupach, 2001).

Estudios realizados en *N. asteroides* cepa GUH-2 demostraron que la composición de su pared celular; particularmente los ácidos micólicos, conferían virulencia, a diferencia de la cepa mutada con luz ultravioleta (UV), carente de ácidos micólicos en su pared celular, la cual fue avirulenta (Beaman, 1988).

Las células fagocíticas son capaces de disminuir el pH a 5 a fin de degradar a las bacterias fagocitadas. En estudios realizados con *N. asteroides* (GUH-2) se ha demostrado que pierde la viabilidad a pH de 5 en un período de 50 horas. Black y colaboradores estudiaron el efecto de *Nocardia spp* en el pH fagosomal en macrófagos de ratón, observando que tras la ingestión de *Nocardia asteroides* GUH-2 viva o muerta, el pH fagosomal permaneció superior a 7 por 2 horas (Black, 1986).

Por otro lado, es conocida la habilidad de *Nocardia* para inhibir la fusión del fago-lisosoma; en estudios realizados en *N. asteroides* GUH-2, encontraron una correlación entre virulencia y la resistencia bacteriana a la fagocitosis y muerte por macrófagos alveolares (Davis, 1980).

La catalasa juega un papel importante dentro de los mecanismos microbicidas. Esta enzima participa en las reacciones de óxido-reducción, vitales para la supervivencia de la bacteria, al impedir la acumulación de productos tóxicos. El sustrato de la catalasa es el peróxido de hidrógeno y lo transforma en oxígeno y agua. Esta enzima contiene grupos hem con un centro de hierro (Fe^{+2}) como sitio activo y se encuentra en altas concentraciones en los peroxisomas. En la mayoría de los organismos procariontes tiene doble función, es decir, tanto actividad catalasa como peroxidasa. Esta última evita la acumulación de compuestos tóxicos RH_2 (Radical- H_2), derivados de las vías metabólicas de la célula. (Sykes, 2001)

En el caso de *N. brasiliensis*, se ha comprobado que una de sus proteínas, de peso molecular de 61 kilodaltones (kDa), posee actividad catalasa.

Esta proteína fue secuenciada parcialmente en su porción N-terminal y

aminoácidos internos; gracias al análisis de su secuencia, se encontró un alto grado de similitud con catalasas de origen procariota y eucariota. P61 parece estar relacionada con un grupo de catalasas, que incluye aquellas de *Klebsiella*, *Synechococcus violaceus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, entre otros. Estas catalasas comparten secuencias aminoacídicas en común y forman dímeros o tetrámeros con subunidades de aproximadamente 61 kDa (Vera-Cabrera, 1999).

Beaman y colaboradores demostraron *in vitro* que tanto la catalasa como la superóxido dismutasa (SOD) son dos factores asociados a la virulencia y por lo tanto, resistencia de *N. asteroides* a los efectos microbicidas de los leucocitos polimorfonucleares. *N. asteroides* produce grandes cantidades de catalasa intracitoplásmica *in vitro*; encontrando sus mayores niveles durante la fase estacionaria temprana. Cuando se añade catalasa de manera exógena al cultivo, se observa una protección total contra los efectos letales de los polimorfonucleares. Las células de *Nocardia* que contienen altos niveles de catalasa intracitoplásmica son más resistentes a la muerte intracelular que aquellas que contienen niveles 10 veces menores de catalasa. La adición exógena de SOD protegió parcialmente a la cepa carente de esta enzima, pero en la cepa GUH-2, la cual contiene grandes cantidades de SOD, esta adición exógena no mostró efecto extra (Beaman, 1985).

El efecto virulento de catalasa ha sido reportado para otras especies. Se encontró que una cepa de *Staphylococcus aureus* con altos niveles de catalasa fue más resistente a los mecanismos bactericidas oxidativos en comparación a las cepas menos virulentas con bajos niveles de catalasa. Otros estudios reportaron que

la adición de catalasa al cultivo, protegió a *S. aureus*, *Streptococcus viridans* y *Escherichia coli* de los efectos letales de los polimorfonucleares (Mandell, 1975). En la Infección por *Mycobacterium tuberculosis*, la pérdida de la actividad de catalasa se correlaciona con una marcada disminución en su virulencia, en comparación con la infección causada por cepas con el gen de catalasa (*katG*) intacto (Beaman, 1994).

2.1.2.6 Respuesta Inmune contra *Nocardia*

2.1.2.6.1 Inmunidad Innata

En los primeros estudios reportados sobre la interacción de *Nocardia* con las células del hospedero, se demostró que *N. asteroides* era fagocitada por macrófagos cultivados in vitro, y mediante microscopía electrónica se reveló la presencia de microorganismos tipo esferoplastos, sin pared celular, de forma L dentro de macrófagos; indicando que algunos de los microorganismos eran capaces de sobrevivir en los macrófagos en un estado celular alterado (Beaman, 1994).

Posteriormente, Beaman y Smathers encontraron que *Nocardia asteroides* ATCC 10905 era rápidamente fagocitada y destruida por macrófagos alveolares de conejo, mientras la cepa virulenta de *Nocardia asteroides* ATCC 14759, no era destruida tras ser fagocitada por macrófagos alveolares de conejo; al contrario, aumentaban las unidades formadoras de colonia dentro de los macrófagos. Además, las células infectadas con esta cepa ocasionaban una respuesta migratoria en el crecimiento in vitro de macrófagos alveolares e inducían la fusión de estos macrófagos, formando células gigantes

multinucleadas, las cuales parecen ser más destructivas contra bacterias intracelulares que los macrófagos individuales (Beaman, 1994).

Las células polimorfonucleares y monocitos eliminan a la mayoría de los microorganismos mediante mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno u oxígeno-independientes. En el caso de microorganismos intracelulares se han obtenido resultados diversos. Filice y colaboradores encontraron que los monocitos y polimorfonucleares de sujetos sanos eran capaces de erradicar el 90% de las células infectadas con *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* en un promedio de 4 horas (hr). La eliminación de células infectadas con *Nocardia asteroides* fue mucho menor, demostrando que la resistencia de *N. asteroides* a los mecanismos oxidativos de los fagocitos está asociada a altos niveles de actividad catalítica intracelular (Beaman, 1994).

2.1.2.6.2 Inmunidad Adquirida

2.1.2.6.2.1 Inmunidad Celular

Los linfocitos de origen esplénico obtenidos de ratones inmunizados y no-inmunizados han sido utilizados para determinar su habilidad para inducir la muerte de *N. asteroides* GUH-2 *in vitro*. Los linfocitos estimulados previamente con *Nocardia*, fueron capaces de eliminar a *N. asteroides*. Incluso, la habilidad de estos linfocitos para eliminar *N. asteroides* se incrementó *in vitro* al activarlos, 12 a 48 hr. antes del reto, con fragmentos de pared celular. La actividad bactericida de los linfocitos fue mayor en poblaciones enriquecidas de células T, y se eliminó al lisar los linfocitos con anti-Thy-1.2, por lo que se concluyó que la

habilidad inmunológica específica de células T para reconocer, unirse y eliminar a *Nocardia* es un mecanismo importante de defensa del hospedero (Deem, 1983).

Estudios realizados con ratones deficientes en células T (Nu^{-/-}) demostraron que estos ratones son más susceptibles a la infección crónica por *Nocardia*, en comparación con los ratones heterocigotos (Nu^{+/+}), al infectar por vía intravenosa con *Nocardia asteroides* GUH-2 en el cojinete plantar. Los ratones Nu^{-/-} desarrollaron una infección sistémica y fallecieron a las 4 semanas con poca inflamación en la extremidad; mientras que los ratones Nu^{+/+} sobrevivieron a pesar de desarrollar una extensa lesión local en la pata. Con estos resultados se llegó a la conclusión de que las células T son esenciales para una respuesta inmune adecuada contra la infección letal de una cepa virulenta de *N. asteroides* (Deem, 1982) (Beaman, 1994).

Ortiz-Ortiz y colaboradores encontraron que el extracto de *N. brasiliensis* posee actividad mitogénica para linfocitos B de ratones inmuno-competentes; así como de ratones atímicos y esplenocitos tratados con suero anti-timocitos más complemento. Probaron también el efecto mitogénico del extracto de *N. brasiliensis* en células B específicas para otros antígenos, tanto timo-dependientes como timo-independientes, encontrando proliferación celular. Por lo cual concluyeron que dicho extracto fue capaz de estimular de manera no específica la proliferación de linfocitos B, aumentando la posibilidad de la activación policlonal, lo cual puede contribuir a la patogénesis de la nocardiosis (Ortiz-Ortiz, 1979).

2.1.2.6.2.2 Inmunidad Humoral contra *Nocardia*

Rico y colaboradores transfirieron suero anti-*Noca relia* a ratones inmunocompetentes y a ratones deficientes de células T, encontrando que los anticuerpos no protegían a los ratones de desarrollar micetoma tras la infección en el cojinete plantar con *Nocardia brasiliensis*. De hecho, la transferencia pasiva de anticuerpos junto con el reto de *Nocardia* opsonizada con anticuerpos incrementaban la gravedad de los síntomas (Beaman,1994) (Rico, 1982).

Estudios realizados en ratones deficientes de linfocitos B CBD2/F1 (CBA/N x DBA/2) inmunizados y no inmunizados, infectados con *N. asteroides* GUH-2, encontraron que los machos deficientes en células B no fueron más susceptibles a la infección que las hembras del grupo control, las cuales eran capaces de producir anticuerpos anti-*Nocardia*. Con estos resultados concluyeron que los anticuerpos y ciertas sub-poblaciones de linfocitos B no son componentes esenciales en la resistencia del hospedero contra *N. asteroides* GUH-2 (Beaman, 1982).

Conde y colaboradores reportaron la presencia de anticuerpos anti-*Nocardia brasiliensis*, por medio de inmunohistoquímica en cortes de tejido de micetoma, alrededor de los 14 días posterior a la infección. Sin embargo, esto no correlacionó con los títulos séricos de anticuerpos, los cuales permanecieron bajos hasta el día 45, cuando se observó un incremento. Estos datos sugieren la posibilidad de que los complejos inmunes en los tejidos podrían favorecer la patogénesis de la enfermedad (Conde, 1983).

Por muchos años se tuvo la noción de que los títulos altos de anticuerpos específicos contra bacterias intracelulares no eran protectores para las enfermedades causadas por éstas. Puesto que en muchos de los casos, la respuesta inmune no era particularmente eficiente para proteger contra las infecciones.

Salinas y colaboradores reportaron la presencia de anticuerpos anti-*Nocardia brasiliensis* de tipo IgG en sueros de pacientes con micetoma. Estos sueros fueron capaces de reconocer principalmente tres proteínas inmunodominantes; P24, P26, P61. Estas proteínas son específicas de *N. brasiliensis* y no presentaron reacción cruzada con sueros de pacientes con tuberculosis o lepra (Salinas-Carmona, 1992). Una vez que estos antígenos fueron purificados (Vera-Cabrera, 1992) (Salinas-Carmona, 2003), se realizaron estudios para desarrollar una prueba de diagnóstico por el método de ELISA. Encontraron que los valores de absorbancia de los sueros de pacientes con micetoma activo eran positivos contra P24, mientras que los sueros de pacientes con historia de micetoma mostraron valores similares a los del grupo control. De esta manera confirmaron la utilidad del ELISA anti-P24 para el diagnóstico serológico (Salinas-Carmona, 1993, 2001).

Posteriormente, desarrollaron un modelo animal para poder reproducir fielmente la enfermedad causada por *N. brasiliensis*, tanto clínica como histológicamente. Analizaron el suero de ratones infectados, encontrando la presencia de IgM anti-P24 a los 7 días de la infección, mientras que el pico de IgG se observó a los 45 días (Salinas-Carmona, 1999).

Licón-Trillo y colaboradores realizaron experimentos de transferencia pasiva de sueros hiperinmunes provenientes de ratones inmunizados con proteínas del extracto crudo de *N. brasiliensis*, obtenidos a diferentes tiempos posterior a la inmunización (30, 60, 90 y 120 días) y fueron transferidos a ratones retados con *N. brasiliensis*. La transferencia de suero de 90 y 120 días, con altos títulos de IgG, no confirió protección; todos los animales desarrollaron micetoma. Sin embargo, la transferencia de los sueros de los días 30 y 60, con menores títulos de IgG, brindó una protección parcial (Licón Trillo, 2003).

Medina-Villanueva demostró en su trabajo de tesis doctoral que la inmunización activa con la enzima recombinante de SOD-A de *N. brasiliensis* fue capaz de inducir protección total (hasta 90 días posterior a la infección) contra el establecimiento del micetoma en ratones BALB/c. Además se observó una correlación entre los niveles altos de anticuerpos IgG con la protección anti-micetoma (Medina-Villanueva, 2008).

Estudios realizados por Pérez-Rivera, en su tesis doctoral, demostraron que la inmunización activa con antígenos solubles y particulados de *N. brasiliensis* fue capaz de prevenir transitoriamente el establecimiento del micetoma. La transferencia pasiva de células mononucleares de bazo de ratones inmunizados con antígenos de *N. brasiliensis*, confirió un efecto protector transitorio a un 80% de los ratones (Pérez-Rivera, 2004).

Salinas- Carmona y Pérez-Rivera demostraron que la transferencia pasiva de suero hiperinmune del día 7 posterior a la inmunización con antígenos particulados de *N. brasiliensis*, que contiene altos niveles de IgM, confirió

protección completa de larga duración. Por otra parte, el suero hiperinmune con títulos altos de IgG no protegió contra el establecimiento del micetoma. Al remover las euglobulinas del suero protector, se abolió el efecto en los ratones. Estos hallazgos apoyan el concepto de que los anticuerpos IgM antígeno-específicos pueden ser los responsables de la protección (Salinas-Carmona, 2004, 2006).

2.1.2.6.2.1 Producción de anticuerpos monoclonales *anti-Nocardia*

La primera publicación referente a la producción de anticuerpos monoclonales, fue la realizada por Köhler y Milstein (Köhler, 1975). Estos investigadores fueron los pioneros en la producción de anticuerpos monoclonales a partir de la fusión entre una célula plasmática de bazo productora de anticuerpos contra los eritrocitos de carnero y una célula de mieloma P3-X63Ag8. A partir de esta técnica muchos investigadores se han dado a la tarea de producir anticuerpos monoclonales contra un sinnúmero de antígenos diferentes, para su utilización en investigación, diagnóstico o tratamiento de numerosas enfermedades.

Gracias a la producción de anticuerpos monoclonales anti-superóxido dismutasa de *N. asteroides*, fue posible dilucidar el importante papel de esta enzima en la virulencia de la bacteria. En los estudios realizados, los anticuerpos monoclonales fueron capaces de inhibir la actividad enzimática *in vitro* y permitieron la rápida eliminación de las bacterias en el modelo animal. (Beaman, 1990)

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra los extractos celulares de *N. brasiliensis* y *N. asteroides*. Jiménez y colaboradores tuvieron como objetivo desarrollar un panel de anticuerpos monoclonales para su utilización en el análisis de antígenos de *Nocardia*, así como para el desarrollo de pruebas diagnósticas (Jiménez, 1990). Por otra parte, Boiron y colaboradores probaron 2 anticuerpos monoclonales del tipo IgG2a contra un antígeno de *Nocardia* con peso molecular de 54 kDa. Con el antígeno semi-purificado, inmunizaron ratas para fusionar los esplenocitos con células de mieloma para la obtención de hibridomas específicos (Boiron, 1992). En 1997, Salinas-Carmona y colaboradores, obtuvieron anticuerpos monoclonales de tipo IgG contra las proteínas P24 y P61. Estos anticuerpos fueron utilizados como herramienta en inmunofluorescencia, para determinar la localización de los antígenos en la bacteria (Salinas Carmona, 1997). En ninguno de los casos realizaron ensayos de inmunización pasiva.

2.2 Efecto Protector de la Inmunización Pasiva contra Otros Microorganismos Intracelulares.

Múltiples mecanismos mantienen los niveles séricos de anticuerpos. En base a estudios en ratones, se sabe que alrededor de un 10% de células plasmáticas pueden permanecer el tiempo de sobrevivencia del ratón. En ausencia de células B de memoria, el número de células plasmáticas de larga duración disminuye con el tiempo. Esto sugiere que el cambio de células B de memoria a células plasmáticas puede aumentar la cantidad de células plasmáticas de larga duración, manteniendo números estables de células plasmáticas antígeno-específicas de por vida. En el caso de infecciones latentes o crónicas es probable que las células B de memoria se diferencien a células plasmáticas debido a la presencia de antígenos específicos. Las células B de memoria se pueden diferenciar rápidamente a células plasmáticas en presencia del antígeno o re-infección (Gourley, 2004).

Los anticuerpos influyen el destino de la bacteria *in vivo* mediante la opsonización y lisis bacteriana. Las opsoninas son importantes para la ingestión del parásito, a pesar de la habilidad de éste a inactivar los efectos bactericidas del fagocito. La respuesta de anticuerpos contra microorganismos intracelulares es variable con respecto al grado de resistencia desarrollado contra ellos.

La tuberculosis y brucelosis son dos infecciones causadas por bacterias intracelulares. En ambos casos su estructura celular se ha relacionado como parte fundamental para su supervivencia. La respuesta inmune no es

particularmente eficiente en ninguno de los casos, a pesar de que las cepas virulentas de *Brucella* son susceptibles tanto a la opsonización y lisis por complemento en presencia de anticuerpos específicos (Mackness, 1962).

La inmunidad mediada por anticuerpos (AMI, por sus siglas en inglés) fue descubierta por Behring y Kitasato en 1891 cuando observaron que la transferencia del suero de un hospedero inmunizado a un sujeto sano, protegía a este último contra los efectos de las toxinas de difteria y tétanos. Este experimento dio lugar a la teoría humoral de la inmunidad y promovió el desarrollo de la terapia con anticuerpos de manera pasiva.

Los experimentos de Behring y Kitasato definieron el método central que aún se utiliza hoy en día para evaluar la eficiencia de la inmunidad mediada por anticuerpos, que consiste en demostrar que la transferencia de anticuerpos específicos a un hospedero sano aumenta la resistencia al reto con el agente infeccioso o su toxina. Como consecuencia de estos descubrimientos, se dio a conocer que la presencia de anticuerpos específicos en el suero conferían resistencia contra los patógenos. Este concepto fue validado por muchos estudios a inicios del siglo XX.

El conocimiento de que la administración de anticuerpos es la única opción disponible para brindar protección inmunológica inmediata a poblaciones susceptibles ha dado gran interés a la inmunidad mediada por anticuerpos dada la amenaza de armas biológicas.

La eficiencia de la inmunidad mediada por anticuerpos contra microbios en particular in vivo se establece con respecto a los siguientes criterios:

1. Demostrar que la administración del suero inmune o anticuerpos específicos a hospederos silvestres reduce la susceptibilidad a infección o enfermedad.
2. Demostrar una correlación entre la presencia de anticuerpos específicos y la resistencia a la infección o enfermedad.
3. Asociar susceptibilidad a infección o enfermedad al haber déficit en la inmunidad humoral (Casadevall, 2004).

2.2.1 Ensayos bactericidas con anticuerpos monoclonales.

Murphy y Bartos analizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína de membrana de *Haemophilus influenzae* mediante ensayos bactericidas. Como fuente de complemento utilizaron suero de adultos jóvenes con síndrome de inmunodeficiencia combinada, carente de anticuerpos bactericidas. Midieron el efecto bactericida de sus anticuerpos al inicio de la incubación, a los 60 y 120 minutos, mediante el conteo en placa de unidades formadoras de colonias. De los dos anticuerpos monoclonales probados, solo uno resultó ser bactericida, por lo que concluyeron que el epítotope al que estaba dirigido pudiera ser un candidato potencial para incluirse en una vacuna preventiva contra infecciones causadas por *H. influenzae* (Murphy, 1988).

Con el objetivo de analizar el efecto bactericida de anticuerpos monoclonales contra *Haemophilus parasuis*, Tadjine y colaboradores realizaron un ensayo utilizando un esquema de incubación similar al de Murphy (0, 60 y

120 minutos) y suero de cobayo como fuente de complemento. Los anticuerpos monoclonales estudiados no presentaron actividad bactericida contra *H. parasuis*, así como tampoco fueron capaces de activar el complemento de sueros de ratón y cobayo. Sin embargo, su efecto en el modelo de ratón fue protector en un 100% de los casos, en comparación con el grupo control, donde todos los animales padecieron la enfermedad (Tadjine, 2004).

Estudios realizados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes de polisacáridos del meningococo B probaron el efecto bactericida utilizando suero humano y suero de conejo para comparar ambos sueros como fuentes de complemento; estos fueron añadidos posterior a la opsonización de las bacterias a una concentración final de 20% (v/v). Utilizaron diluciones de los anticuerpos monoclonales para establecer los títulos bactericidas, los cuales se definieron como la concentración de anticuerpos capaz de disminuir 50% de UFC por ml después de 60 minutos de incubación de la bacteria en la mezcla de reacción, comparando con la bacteria control al inicio del período de incubación. Encontraron que los anticuerpos monoclonales fueron capaces de eliminar las bacterias a bajas concentraciones y que el suero de conejo proporcionó mejor fuente de complemento que el humano (Granoff, 1998).

Posteriormente, en otro estudio con meningococo evaluaron la actividad bactericida y protectora de un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo altamente conservado en la proteína NspA de meningococo. La actividad biológica del anticuerpo fue estudiada por tres métodos diferentes, un ensayo bactericida *in vitro* y dos modelos de ratón *in vivo*: modelo de bacteremia y

modelo de mortalidad. El anticuerpo monoclonal eliminó eficientemente *in vitro* las diferentes cepas de meningococo probadas en presencia de suero de conejo o humano. Además, fue capaz de reducir más del 75% los niveles de bacteremia reportados en ratones retados (Cadieux, 1999).

Goel y Kapil caracterizaron anticuerpos monoclonales contra proteínas membranales de *Acinetobacter baumannii*, los cuales fueron evaluados probando su actividad bactericida *in vitro*. Encontraron que fueron capaces de reducir o eliminar el 80 a 90% de las bacterias en comparación a los controles (Goel, 2001).

2.2.2 Transferencia pasiva de células B

Elkins y colaboradores (1998) mostraron que los ratones inmunocompetentes a los cuales se les producía una infección subletal de *Francisella tularensis* sobrevivían a un segundo reto letal de más de 10,000 dosis letal 50% tres días después; en comparación con ratones deficientes en células B, los cuales no sobrevivieron al reto. Concluyeron que la protección contra un inoculo letal máximo es debida a un mecanismo protector no específico, ya que ocurre a los primeros días posteriores a la primo-infección. Posteriormente, con la transferencia de células B estimuladas, a ratones genéticamente deficientes de estas células, mostraron una reconstitución en la inmunidad protectora; sin embargo, no se observó este efecto tras la transferencia pasiva de los anticuerpos específicos. Estos resultados indicaron que las células B juegan un

papel importante en la inmunidad secundaria contra patógenos intracelulares a través de una función diferente a la producción de anticuerpos (Elkins 1999).

2.2.3 Transferencia pasiva de anticuerpos policlonales

Para poder comprobar la protección mediada por anticuerpos específicos contra microorganismos intracelulares, se han realizado varios estudios de transferencia de sueros hiperinmunes.

Utilizando un modelo de infección experimental de *Ehrlichia chafeensis* en ratones con inmunodeficiencia combinada grave, Winslow y colaboradores estudiaron la respuesta inmune inducida por la transferencia pasiva de suero hiperinmune o anticuerpos de ratones inmunocompetentes, encontrando protección parcial a la infección. El efecto fue dependiente de la dosis, se encontró a los 2 días de la infección y perduró hasta por 2 semanas. La administración semanal de suero prolongó la sobrevivencia de los ratones susceptibles. De esta manera demostraron que los anticuerpos juegan un papel importante en la eliminación de esta bacteria intracelular obligada durante la infección activa (Winslow, 2000).

Para investigar la habilidad de anticuerpos humanos estimulados con BCG para proteger contra infecciones micobacterianas, de Vallière y colaboradores utilizaron muestras séricas de los individuos sanos, los cuales fueron inmunizados en 2 ocasiones con la BCG, encontraron altos niveles de anticuerpos contra la micobacteria, específicamente IgG contra lipoarabinomanana (LAM). Estos anticuerpos específicos fueron capaces de

estimular la fagocitosis y los efectos inhibitorios de neutrófilos y macrófagos sobre la bacteria; estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos y aumentar la producción de interferón gamma; así como aumentar la degranulación de linfocitos T CD8+. De esta manera comprobaron que los anticuerpos policlonales anti-micobacteria fueron capaces de aumentar tanto las respuestas de inmunidad innata y adquirida contra la micobacteria (de Vallière, 2005).

Uppington y colaboradores estudiaron el efecto de los anticuerpos policlonales en la interacción de macrófagos de ratón con *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium*. Demostraron que la opsonización de la bacteria con suero hiperinmune, aumenta la fagocitosis y la distribución bacteriana intracelular. Además, utilizando ratones deficientes en el gen que codifica para receptores Fe gamma I, comprobaron que el suero hiperinmune aumenta la internalización bacteriana por macrófagos a través de receptores de alta afinidad para IgG. La exposición de macrófagos de ratón con *S. entérica* serovar *Typhimurium* opsonizada con suero hiperinmune aumentó la producción de superóxido, permitiendo un aumento en las funciones antibacterianas de las células infectadas (Uppington, 2006).

2.2.4 Transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales

2.2.4.1 Transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales IgG

El modelo de infección experimental de *Brucella abortus* en ratones ha permitido dilucidar el efecto protector de anticuerpos monoclonales contra este

patógeno intracelular. A partir de la transferencia de sobrenadante concentrado de cultivo de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos, se encontró que los ratones inmunizados pasivamente antes de la infección, presentaban cuentas viables de bacteria menores en bazo e hígado al mes y a los 4 meses, en comparación con su grupo control. Los anticuerpos monoclonales eran de la clase IgG2 e IgG3. También probaron la protección inducida por anticuerpos monoclonales de clase IgM pero no fueron capaces de conferir protección (Montaraz, 1986).

Otro ejemplo del modelo de infección con *B. abortus* en ratones fue el reportado por Elzer y colaboradores, quienes estudiaron el efecto protector de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra el polisacárido O (OPS) de *Brucella abortus*. Utilizaron dos cepas, una representativa de la cepa silvestre y una cepa atenuada; midieron títulos de anticuerpos tras la infección con cada una de las cepas, encontrando, como era previsto, una mayor producción de anticuerpos tipo IgM las primeras dos semanas, seguido por un pico de IgG a partir de la tercer semana de infección. La transferencia de una mezcla de sueros de la semana 2 (con altos títulos de IgM y bajos de IgG) confirió protección contra la cepa silvestre, no así contra la cepa atenuada. En contraste, la transferencia de sueros de la tercera semana (altos títulos de IgG) confirió protección contra la cepa atenuada. Los anticuerpos monoclonales de tipo IgM también confirieron mayor protección contra la cepa silvestre, mientras que los anticuerpos monoclonales IgG3 protegieron contra la cepa atenuada. La

fagocitosis fue mayor para la cepa silvestre que para la atenuada, gracias a la opsonización por parte de IgM (Elzer, 1994).

Bowden y colaboradores inmunizaron pasivamente a ratones con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas membranales de *Brucella ovis*. Probaron 7 anticuerpos monoclonales diferentes, por separado y en combinaciones para medir el efecto protector contra la infección. Directamente, el líquido de ascitis con anticuerpos se diluyó 1:5 y fue inyectado subcutáneamente a los ratones. Posterior al reto, observaron protección total con 3 de los 7 anticuerpos monoclonales cuando fueron administrados individualmente (Bowden, 2000).

En el estudio realizado por Shahin y colaboradores encontraron que los anticuerpos monoclonales IgG1 e IgG3 dirigidos contra el lipooligosacárido A de *Bordetella pertussis* fueron capaces de proteger a los ratones de una infección letal. Sin embargo, no encontraron una correlación entre el efecto bactericida *in vitro*, en presencia de complemento y la protección conferida a los ratones por parte de algunos de los anticuerpos monoclonales, llegando a la conclusión de que la actividad bactericida no era un requisito para la protección mediada por ciertos anticuerpos anti-lipooligosacárido A (Shahin, 1994).

A pesar de que existía la premisa de que la inmunidad humoral no desempeña un papel prominente durante la criptococcosis experimental, Dromer y colaboradores encontraron que la administración intraperitoneal de anticuerpos monoclonales IgG1 anti- *Cryptococcus neoformans* 24 horas antes de la infección intravenosa con *C. neoformans* confería un efecto protector. Pese a

que utilizaron anticuerpos monoclonales anti-tiroglobulina como control, el tiempo de supervivencia de los ratones inmunizados con anticuerpos específicos fue mayor que el del grupo control. Demostraron que esta protección era dependiente de la dosis y que una dosis mínima de 10 pg de anticuerpos monoclonales específicos era capaz de proteger. Con estos resultados concluyeron que la seroterapia con anticuerpos monoclonales de tipo IgG puede participar en la prevención o tratamiento de la criptococcosis experimental (Dromer, 1986).

El modelo de infección experimental de *M. tuberculosis* en ratones, brindó información importante sobre la habilidad de los anticuerpos monoclonales específicos contra la superficie de *M. tuberculosis* para afectar el curso de la infección en ratones. Uno de los anticuerpos monoclonales de subtipo IgG3, específico para arabinomanana confirió una protección parcial en ratones después del reto (30-60% supervivencia mayor a 75 días). A pesar de ser protector en el modelo in vivo, no mostró efecto bactericida ni inhibición de la replicación bacteriana in vitro. Sin embargo, alteró la estructura de los granulomas en pulmones infectados (Teitelbaum, 1998).

La listeriolisina O (LLO) es una toxina secretada por *Listeria monocytogenes* que forma poros en las membranas celulares, también conocida como hemolisina. Edelson y colaboradores estudiaron la habilidad de un anticuerpo monoclonal de ratón específico contra esta toxina en un modelo in vivo. Los ratones inmunizados con este anticuerpo monoclonal obtuvieron protección contra la infección letal de una cepa virulenta de *Listeria* y mostraron

una reducción significativa de la cantidad bacteriana en órganos blanco. Los efectos de estos anticuerpos fueron independientes de las células B y T del hospedero, ya que la inmunización con anticuerpos monoclonales a ratones con síndrome de inmunodeficiencia combinada grave confirió resistencia aumentada a la infección (Edelson, 1999). En un estudio posterior, evaluaron el efecto de estos anticuerpos monoclonales en la actividad de los macrófagos infectados con *Listeria*. Encontraron que los macrófagos infectados en presencia de anticuerpos monoclonales anti-LLO mostraron una reducción marcada en el crecimiento intracelular de *Listeria*, con un bloqueo en el paso de la bacteria del fagosoma al citosol. Además demostraron que los efectos de los anticuerpos monoclonales fueron independientes de la expresión de receptores Fc gamma, señalización de IFN gamma y producción de óxido nítrico y superóxido (Edelson, 2001).

Se mencionó anteriormente la protección inducida por el suero policlonal en el modelo experimental de infección por *E. chaffeensis*. Con el uso de anticuerpos monoclonales específicos, Li, Winslow y colaboradores demostraron que ratones con síndrome de inmunodeficiencia combinada severa inmunizados con anticuerpos monoclonales específicos contra *Ehrlichia*, en ausencia de linfocitos, les confirió protección contra la infección letal por *E. chaffeensis*. Probaron una serie de anticuerpos monoclonales específicos, y de 100, encontraron que 39 reconocían una región amino-terminal de la proteína de membrana externa (OMP). Y seleccionaron 16 para su estudio. Encontraron que

solamente los del tipo IgG fueron efectivos; los del subtipo IgG2a fueron más efectivos que los IgG2b e IgG3 (Li, 2002).

Zhaohua y colaboradores caracterizaron 14 anticuerpos monoclonales dirigidos contra *F. tularensis* y observaron que un anticuerpo monoclonal IgG2a confirió protección total tras el reto intranasal con la bacteria virulenta (Zhaohua, 2007).

2.2.4.2 Transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales IgM

Los estudios realizados de protección contra microorganismos intracelulares con anticuerpos monoclonales han utilizado mayormente anticuerpos de tipo IgG. Sin embargo, Han y colaboradores se dieron a la tarea de comparar las actividades funcionales de anticuerpos monoclonales protectores y no-protectores específicos para *Candida albicans* de tipo IgM. Encontraron que los anticuerpos monoclonales protectores se unían más eficientemente al factor C3 del complemento en comparación con los anticuerpos monoclonales no protectores. Además, la IgM monoclonal era capaz de proteger contra infección localizada y diseminada (Han, 2001). Ambos anticuerpos monoclonales pertenecían a la misma clase (IgM) y eran específicos contra la misma proteína; sin embargo, la especificidad de sus epítopes era diferente, lo que permitía esa diferencia para conferir protección (Han, 1997). Posteriormente, se propusieron determinar si la protección era restringida a los anticuerpos de clase IgM; probaron un anticuerpo monoclonal de tipo IgG dirigido contra el mismo epítope que el anticuerpo monoclonal IgM protector,

demostrando que la especificidad del epítotope y la activación del complemento se encuentran relacionadas a la habilidad del anticuerpo en la protección, siendo que el anticuerpo IgG también era capaz de conferir protección (Han, 2000).

Taborda y Casadevall estudiaron dos anticuerpos monoclonales de clase IgM dirigidos contra *Cryptococcus neoformans* en ratones. Estudiaron tanto la cantidad del inocular, como la ruta de infección y la dosis de anticuerpos empleada. Uno de los anticuerpos confirió protección después de la administración de una dosis específica (100 pg), posterior a la infección intraperitoneal con una cantidad definida de inocular (10^7 UFC); promoviendo la fagocitosis, la aglutinación y la formación de anillos de células inflamatorias alrededor de las levaduras. Trataron con dosis mayores de anticuerpos, pero no resultaron en mayor protección ni mayor infección, consistentes con un efecto prozona (Taborda, 2001).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la respuesta inmune celular ha sido considerada como fundamental en la eliminación de bacterias intracelulares, los resultados reportados recientemente en la literatura nos muestran el importante papel de los anticuerpos contra este tipo de patógenos.

En estudios previos realizados en un modelo de infección por *Nocardia brasiliensis*, la protección transitoria con suero hiperinmune parece deberse a la presencia de anticuerpos IgM.

En el presente trabajo se investigó el efecto de la inmunidad pasiva con anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 en la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

Los anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 son capaces de conferir protección contra la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*, mientras que los anticuerpos monoclonales IgG de la misma especificidad no inducen protección.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto protector de anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 dirigidos contra *Nocardia brasiliensis*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producir anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358).
2. Caracterizar los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 de *Nocardia brasiliensis*.
3. Evaluar el efecto *in vitro* de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 en la viabilidad de *N. brasiliensis*.
4. Determinar el efecto protector de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 en la infección experimental por *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Lugar de trabajo.

Este proyecto de investigación se realizó en el Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.1.2 Material Biológico

6.1.2.1 Células para la generación de hibridomas

Se utilizaron células de mieloma de ratón BALB/c, P3X63Ag8, deficientes en la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa (HGPRT⁻). Además de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados.

6.1.2.2 Células bacterianas.

Se utilizó un cultivo puro de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1, la cual se aisló de una lesión de un paciente con micetoma en el Departamento de

Dermatología del Hospital Universitario Dr. José E. González (U.A.N.L.) y posteriormente fue registrada en la ATCC por Dr. Salinas-Carmona con el número 700358.

6.1.2.3 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa BALB/c de 10 a 12 semanas de edad, con un peso promedio de 30-40 g., descendientes de la cepa donada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda, MD. USA). Se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Inmunología a una temperatura alrededor de 25°C en jaulas de acrílico. Todos los animales fueron alimentados *ad libitum* con agua estéril y alimento para roedores (Purina; México). Se siguieron las recomendaciones del cuidado de los animales de bioterio referidos en la NOM 062-200-1999.

6.1.3 Reactivos.

6.1.3.1 Reactivos para los cultivos celulares

Para mantener las células mamíferas se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium, [D-MEM] (Gibco, USA); suero bovino fetal (Hyclone, USA); penicilina G (Sigma), estreptomycin (Sigma), aminoácidos no esenciales (Gibco, USA), (-)-glutamina (Sigma), HEPES (Sigma).

Para los cultivos de células mamíferas se utilizaron placas de poliestireno de 96, 24, 12 y 6 pozos (Corning, USA); frascos de cultivo celular de 25 ml, 25 cm², 75 cm², 150 cm², 175 cm², 300 cm². (BD Falcon, USA); tubos de plástico de

capacidad de 15 y 50 ml (Falcon, USA); tubos de plástico de capacidad de 1 ml (Eppendorf, USA); dimetil sulfóxido [DMSO] (USA); nitrógeno líquido (Praxair, México); dióxido de carbono industrial [CO₂] (Praxair, México); polietilenglicol-1500 al 50% (Roche, USA); alcohol etílico desnaturalizado (etanol) al 70% (Protec, México); membrana de nylon 0.22 µm de 13 mm (Whatmann, USA); membrana de celulosa de 0.22 µm de 30 mm (Millipore, USA)

Para realizar la selección clonal se utilizó hipoxantina-aminopterinatimidina [HAT] (Sigma) y posteriormente, hipoxantina-timidina [HT] (Sigma).

6.1.3.2 Reactivos para cultivo celular bacteriano

Para los cultivos bacterianos se utilizó el medio infusión cerebro corazón [BHI] (Difeo Laboratories, USA); agar bacteriológico (Bioxon; Becton Dickinson, México); tubos de ensayo de vidrio de 18 X 150 mm (Pyrex, México), matraces Erlenmeyer de 250 ml, 1000 ml y 2000 ml (Pyrex, México), homogenizador Potter-Evelham (USA), placas Petri desechables estériles de 13 cm de diámetro (Corning, USA).

6.1.3.3 Reactivos para pruebas inmunológicas

Para las emulsiones se utilizó adyuvante incompleto de Freund [AIF] (Sigma, USA)

Para la elaboración de los ensayos inmunológicos se utilizaron microplacas de poliestireno para ELISA (BD Falcon, USA); leche descremada (BD Falcon, USA), anticuerpos IgG de cabra anti-IgM y anti-IgG anti-ratón

marcados con peroxidasa de rábano (Sigma, USA); membranas de nitrocelulosa de 0.22 μ m (Sigma, USA), peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma, USA), marcador de peso molecular preteñido ColorBurst (Sigma, USA).

Para los ensayos de nefelometría se utilizaron anticuerpos IgM e IgG de ratón (Southern Biotech. Assoc., USA); anticuerpos IgG de conejo anti-IgM y anti- IgG anti-ratón (Jackson Laboratories, USA); cubetas para nefelometría de 12.5 x 12.5 X 45 mm (Plastibrand; Brand, USA).

Para la purificación de anticuerpos se utilizaron membranas de diálisis de tamaño de poro de 10,000 daltones (Spectra/Por; Spectrumlabs, USA); sulfato de amonio (México); membrana de polietersulfona de tamaño de poro de 10,000 Da; resina de agarosa con proteína A inmovilizada (Pierce, USA); columna para cromatografía de plástico (Bio-Rad, USA)

Para la determinación de proteínas se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm; albúmina sérica bovina (Sigma, USA)

6.1.4 Equipo.

El equipo utilizado en este proyecto doctoral incluyó: campana de flujo laminar Nivel II modelo 7L0 (Contamination Control Inc., USA); invertoscopio modelo 471203-9901 (Zeiss, Germany); incubadora de CO₂ modelo 4200 (Ñapeo, USA); incubadora con agitación (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/ Precisión Scientific; USA); estufa a 37°C modelo 143A (FELISA, México); estufa a 37°C modelo MDL2EG (Jouan Inc., USA); cuarto a 37°C; cuarto frío a 4°C; refrigerador/congelador (GE, México); congelador de -20°C modelo CV-16

(Torrey, México); congelador de -20°C (Norlake Scientific, USA); congelador de -70°C modelo ULT2586-3-A36 (Kendro Lab. Prod., USA); autoclave modelo STME (Market Forge Industries Inc, USA); baño de agua modelo BMT-4 (Casa Rocas, México); balanza analítica digital modelo LA 120S (Sartorius AG GOTTINGEN; Germany); cámara de electroforesis vertical modelo SE-250 (Pharmacia Biotech; USA); fuente de poder modelo EC3000-90 (Thermo EC; USA); tanque de 20 litros de nitrógeno líquido T20 (ThermoScientific, USA); micropipetas ajustables (Eppendorf, USA); unidad de filtración (Amicon, USA); plancha de agitación/calentamiento modelo SP18425 (Barnstead/ Thermolyne, USA); campana de extracción (Labconco, USA); agitadores magnéticos modelo SPA1025B (Thermolyne Corp; USA); medidor de pH modelo 430 (Corning, USA); conductómetro modelo 70 (Chemitrix Inc., USA); centrífuga refrigerada modelo TJ-6 (Beckman Instruments, USA); ultracentrífuga refrigerada modelo Centrifuge 5417R (Eppendorf, Germany); ultracentrífuga refrigerada modelo Allegra 64R (Beckman Instruments, USA);espectrofotómetro ultravioleta/ visible (Beckman DU7500, USA); lector de microplacas de ELISA Sunrise Remóte modelo 960063 (TECAN, USA); aparato rotador para producción modular de células modelo III (Wheaton Instruments, USA); nefelómetro láser (Berhing, USA); mechero de Bunsen; contador de colonias (Québec Darfield Colony Counter, Reichert-Jung; Canadá); liofilizadora modelo 77545-11 (Labconco, USA).

6.1.5 Software

En este proyecto doctoral se utilizaron los siguientes programas computacionales: sistema operativo Windows XP SP2 (Microsoft CO, USA); paquete de oficina Office 2007 (Microsoft Co, USA); GraphPad Prism V para Windows v.5.0 (GraphPad Software Inc, USA).

6.2 Métodos

6.2.1 Cultivo celular

6.2.1.1 Células mamíferas

Las células de mieloma de ratón BALB/c P3X63Ag8 y los hibridomas se cultivaron en medio D-MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 6.2 mg/L de penicilina G, 5 mg/L de estreptomicina, 585 mg/L de L-Glutamina, 1:1000 de aminoácidos no esenciales. Las células se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire. Se realizó recambio de medio cada tercer día y se realizaron pases cada 5 días de cultivo.

6.2.1.2 Células Bacterianas

Partiendo de una alícuota de *Nocardia brasiliensis* cepa ATCC 700358, conservada en leche descremada al 2% y almacenada a -70°C; se sembraron 500 microlitros en 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml_ conteniendo 50 mL de medio BHI y se mantuvo en incubación durante 72 horas a 37°C.

Después de la incubación, se recuperó la masa bacteriana y se realizaron 2 lavados con cloruro de sodio 0.85% estéril. Se centrifugó en cada lavado a 1000 g durante 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en 10 mL de NaCl 0.85% estéril y se homogenizó durante 20 minutos hasta obtener una suspensión unicelular por medio del homogenizador Potter-Evelham.

Con la masa bacteriana de cultivo de 72 horas se llevaron a cabo los experimentos detallados más adelante en este capítulo.

6.2.2 Almacenamiento Celular

6.2.2.1 Almacenamiento de células mamíferas.

Las células mamíferas fueron conservadas en una concentración de 5×10^6 células/mL, con 90% (v/v) de suero bovino fetal y 10% (v/v) de DMSO. Se incubaron 30 minutos a 4°C, posteriormente 1 hr a -20° C, 1 hr a -70°C y finalmente en nitrógeno líquido hasta su utilización. Algunos viales se mantuvieron a -70°C, con un máximo de 30 días de almacenamiento.

6.2.2.2 Almacenamiento de células bacterianas.

La masa bacteriana de cultivo de 72 horas homogenizada se recuperó en un tubo cónico y se resuspendió en 50 mL de leche descremada al 2% disuelta en una solución estéril de cloruro de sodio al 0.85%. Esta suspensión unicelular se fraccionó en alícuotas de 1 mL, y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.2.3 Obtención de proteínas

6.2.3.1 Obtención del Extracto celular crudo

A partir del cultivo de *N. brasiliensis* se inocularon 5 mL en 40 matraces de 2 L conteniendo 150 mL de BHI cada uno, se incubaron durante 7 días, se recuperó la masa bacteriana por filtración en vacío y se colectó en un refractario de vidrio, se registró su peso húmedo y se le realizaron 3 deslipidizaciones consecutivas con etanol y éter etílico en diferentes proporciones: 1:1, 1:2 y 1:3 respectivamente; esto se realizó en agitación a temperatura ambiente en una campana de extracción.

La masa bacteriana deslipidizada se dejó en un refractario de vidrio por 72 horas a temperatura ambiente dentro de la campana de extracción hasta que se evaporaron en su totalidad los solventes y se encontró seca por completo.

La masa bacteriana seca fue triturada con polvo de vidrio (v/v) durante 90 minutos en un mortero de cerámica. Una vez que se obtuvo una mezcla fina, de consistencia arenosa, se recuperó en tubos de 50 mL y se agregó la solución de extracción (Tris-HCL 0.1 M y acetato de magnesio 0.1 M). Se mantuvo en agitación a 4°C por 18 hrs. Posteriormente se centrifugó a 1000 g durante 30

0163961

minutos. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C. El procedimiento de extracción se repitió tres o cuatro ocasiones, hasta que el sobrenadante fue transparente.

Todos los sobrenadantes se mezclaron y se tomó una alícuota para determinar la concentración proteica mediante el método de Bradford. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12% en condiciones desnaturalizantes para obtener el patrón electroforético de las proteínas presentes en el extracto celular crudo de *N. brasiliensis* (ECC). El extracto fue fraccionado en alícuotas de 15 ml_ y almacenado en viales de vidrio. Después de congelar su contenido, fue liofilizado y almacenado a -20° C.

6.2.3.2 Purificación de P61.

A partir de 100 mg de extracto celular crudo, se prosiguió a la obtención y purificación de P61. El extracto celular liofilizado se reconstituyó en 12 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.4. Se realizó la precipitación de proteínas con sulfato de amonio saturado, añadiendo 12 ml para obtener una concentración final de sulfato de amonio al 50%, éste se fue agregando a la suspensión proteica mediante goteo a una velocidad de 1ml/ min en agitación a 4°C y se dejó agitando durante 60 minutos. Se recuperó la mezcla en un tubo de 50 ml_ y se centrifugó a 1000 g por 30 minutos. El sobrenadante y el precipitado se almacenaron por separado.

El precipitado se resuspendió en 1 mL, se dializó contra agua destilada para eliminar las sales y, se separó mediante electroforesis en un gel preparativo

12% sin SDS de 3 mm de grosor, con un carril único de muestra, que comprendía todo el ancho del gel. Posterior a la electroforesis, se cortaron tres bandas verticales de 0.2 cm de ancho, una en cada extremo y una central, estas se tiñeron con reactivo de Coomassie, a fin de localizar la banda correspondiente a P61. Dicha banda fue cortada en toda la longitud del gel y la proteína fue extraída por elución mecánica con agua destilada en un tubo de 50 mL, en agitación a 4° C, durante toda la noche. Se obtuvo una alícuota de la elución para determinar la concentración proteica y el resto se colocó en viales para almacenarse liofilizado a -20°C. A partir de estas muestras se realizó electroforesis analítica en gradiente 8-18% para confirmar la pureza de la proteína P61.

6.2.4 Determinación de la concentración proteica.

Para determinar las proteínas se utilizó el método de Bradford, usando como curva estándar a la albúmina sérica bovina (Sigma). A partir de una solución con 1 mg/mL de ASB disuelta en agua destilada, se diluyó 1:50 y se prepararon los estándares a diferentes concentraciones (2, 4, 10 y 18 pg/mL) en un volumen de 250 pL y posteriormente se agregaron 250 pL del reactivo de Bradford, para un volumen final de 500 pL. Las muestras proteicas se diluyeron 1:10 y 1:100 en agua destilada en un volumen de 250 pL y se añadió 250 pL del reactivo de Bradford, para un volumen final de 500 pL. Se incubaron las muestras por 15 min a temperatura ambiente y se registró su absorbancia a 595 nanómetros. Con las lecturas obtenidas de los estándares se calculó la

concentración proteica de la muestra con la ayuda del programa Graphad Prism

V.

6.2.5 Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli con las siguientes modificaciones. Se utilizó un gel concentrador al 5%T, 2.7%C y el gel de separación en gradiente 8-18%T, 2.7%C. Las proteínas del extracto crudo de *N. brasiliensis* se separaron electroforeticamente en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) La concentración proteica utilizada fue de 200 pg de proteína en el carril único del gel. La muestra de ECC se mezcló con el buffer de muestra 6X, con Tris-HCL 0.125M pH 6.8, 10% de dodecil-sulfato de sodio (SDS) y 10% de 2-mercaptoetanol (2ME), 10% de sacarosa y azul de bromofenol. El volumen final de la muestra fue de 500 pL; se sometió a ebullición 2 min antes de ser colocada en el carril del gel concentrador. Los geles se corrieron a 80 volts (V) durante 20 minutos. Como amortiguador de corrimiento se utilizó una solución de glicina 192mM, Tris 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3. Posteriormente, al llegar la muestra al gel en gradiente, se aumentó el voltaje a 150 V. Al término de la electroforesis, el gel se colocó en una solución de azul de Coomassie R, preparada al 0.1% p/v en metanol, 40% v/v, ácido acético, 10% v/v, durante 30 minutos en movimiento suave y después se destiñó utilizando una solución desteñidora (metanol 40%, ácido acético 10%v/v) en cantidad suficiente para eliminar el exceso del colorante.

Para otros geles de poliacrilamida donde se corrió la proteína purificada, se utilizó un peine separador de 10 carriles, colocando en cada carril una muestra diferente (ej. marcador de peso molecular, muestra del extracto celular crudo, muestra de la proteína purificada), con una concentración proteica de 10 µg/ carril, en un volumen de 30 µL.

6.2.6 Ensayos Inmunológicos

6.2.6.1 ELISA *anti-Nocardia* (ECC y P61)

Para la detección de anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 se utilizó la técnica inmunoenzimática (ELISA). La concentración proteica del antígeno fue de 2.5 µg/mL disuelto en solución amortiguadora de acetatos pH 5, colocando 200 µL por pozo en placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano. Los antígenos utilizados en los ensayos fueron el extracto celular crudo, para la determinación de anticuerpos en sobrenadante de mezcla de hibridomas en cultivo, y P61 para determinar anticuerpos específicos en el sobrenadante de hibridomas pre-seleccionados. Después de colocar el antígeno, se dejó incubando 18 hrs. a 4°C. Posteriormente la placa se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS 0.1 M pH 7.2- Tween 20 1:1000), cada lavado con una duración de 10 minutos. Después los pozos de la placa se bloquearon con 200 µL de leche descremada al 5% en PBS y, se incubó a 37°C durante 1 hora. Posterior a 5 lavados, se agregó 200 µL del sobrenadante del cultivo de hibridomas y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después se realizaron 5 lavados y, se agregaron 200 µL del anticuerpo anti-ratón anti-IgM o anti-IgG conjugado con peroxidasa

de rábano diluidos 1:1000 en PBS. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C y después se lavaron los pozos 5 veces. Finalmente para identificar la reacción antígeno-anticuerpo se agregó una solución de substrato/cromógeno (peróxido de hidrógeno y OPD) a un volumen de 160 µL/pozo y se incubó por 30 minutos en obscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 40 µL/pozo de ácido sulfúrico 1N. El resultado se obtuvo en unidades de absorbancia a 492 nm en el lector de microplacas. Como controles se usaron sueros de ratones inmunizados con ECC (control positivo) y sobrenadante de cultivo de células de mieloma (control negativo).

6.2.6.2 Western blot anti-*Nocardia* (ECC y P61)

Posterior a la electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente 8-18%, en condiciones desnaturalizantes, el gel se colocó en un recipiente con solución de transferencia (20 mM Tris base, 150 mM glicina, 20% metanol) con agitación suave durante 20 min. Después se realizó la electrotransferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 µm previamente colocada en solución de transferencia durante 15 minutos. La electrotransferencia se realizó con el método semi-húmedo durante 45 minutos a un voltaje constante de 20 V, a temperatura ambiente. Posterior a la transferencia, el gel se tiñó con azul de Coomassie, y la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS durante 1 hr., en agitación a 37°C. Después de realizar 3 lavados con solución de lavado (PBS 1X, Tween 20

1:1000) durante 10 minutos cada uno, la membrana se cortó en tiras de 0.3 cm de ancho.

Cada tira se incubó con el sobrenadante de los hibridomas sin diluir, durante 1 hora, en agitación a 37°C. Posteriormente se realizaron 5 lavados y se incubaron con anticuerpos anti-IgM y anti-IgG antiratón conjugados con peroxidasa de rábano diluidos 1:1000 en PBS, durante 1 hora en agitación a 37°C. Después se realizaron 5 lavados y las tiras se colocaron en un recipiente con 20 ml_ de PBS y 10 mg de diaminobenzidina. Se añadió 10 µL de H₂O₂ al 30% y se agitó hasta ver la señal de las bandas proteicas en las tiras. La reacción se detuvo con ácido clorhídrico 1N.

6.2.7 Inmunizaciones

6.2.7.1 Esquemas de inmunización activa

Se preparó una emulsión de 50 µl de adyuvante incompleto de Freund con 20 µg del ECC de *N. brasiliensis*, añadiendo la suspensión proteica por goteo para su completa homogenización, obteniendo un volumen final de 100 µl. El ratón fue sangrado antes de la inmunización. Posteriormente fue inmunizado en el cojinete plantar.

6.2.7.2 Re-inmunizaciones

Después de transcurridos 15 días de la primera inmunización, se obtuvo sangre periférica a partir del plexo retro-orbitario del ratón inmunizado. Se inmunizó con 15 pg del P61 de *N. brasiliensis* en un volumen de 50 µl emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (v/v), inyectado en el lomo del animal por vía subcutánea. Este mismo procedimiento se repitió a los 30 días posteriores a la primera inmunización.

6.2.8 Obtención de células de bazo de ratón inmunizado.

6.2.8.1 Obtención de esplenocitos totales

Cumplido el tiempo de inmunización, se obtuvo sangre periférica a partir del plexo retro-orbitario del ratón, que se sacrificó por dislocación cervical. Inmediatamente después, se removió el bazo con pinzas y tijeras en condiciones estériles y se colocó en una placa de cultivo celular conteniendo 3 ml de medio DMEM atemperado. Dentro de la campana de seguridad biológica, se perfundieron las células con el medio, utilizando una jeringa de 3 ml y una aguja de 25 G. El tejido esplénico fue macerado con la ayuda de una malla metálica estéril.

Se recuperó la suspensión celular en un tubo de 15 ml y se permitió sedimentar los residuos celulares durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos. Se resuspendió el precipitado celular en 10 ml de medio D-MEM y se centrifugó nuevamente con

las mismas condiciones. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en un volumen de 2 a 4 ml.

6.2.8.2 Separación de células mononucleares mediante gradiente de Ficoll

Se colocó lentamente por goteo, la suspensión de esplenocitos, en un tubo de 15 ml conteniendo 2 ml de Ficoll estéril y atemperado; cuidando de no romper el gradiente formado. Se centrifugó durante 30 minutos a 400 *g*, a 4° C.

El halo formado por las células mononucleares, gracias a la separación por gradiente, fue recuperado en un tubo de 15 ml y, se realizaron 3 lavados con medio D-MEM. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio para contar las células.

6.2.8.3 Lisis de eritrocitos a partir de esplenocitos totales

Una vez perfundidas las células de bazo, se prosiguió a la lisis de eritrocitos con cloruro de amonio. La suspensión celular se centrifugó a 400 *g* por 10 minutos y el paquete celular se resuspendió en 1 ml. Se añadió 14 ml de solución de lisis (cloruro de amonio 0.8 g, bicarbonato de sodio 0.084 g, EDTA 0.037 g en 100 ml de agua destilada) y se agitó suavemente por inversión durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

Después se centrifugó a 250 *g* durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 10 ml de medio D-MEM con 2% de suero bovino fetal. Se

centrifugó nuevamente y se resuspendió en 1 ml de medio para contar las células.

6.2.9 Conteo de células mamíferas en cámara de Neubauer.

Todas las células mamíferas utilizadas en este proyecto fueron contadas de la misma manera. Después de centrifugar las células en medio de cultivo, se retiró el sobrenadante con pipeta de vidrio de 10 ml y el precipitado fue suavemente resuspendido en 1 ml de medio atemperado. Se tomó una muestra de 10 µl en un tubo Eppendorf de 1ml y se añadieron 90 µl de ácido acético al 2%. Se mezcló la suspensión y se tomó una muestra de 10 µl, la cual fue colocada sobre la cámara de Neubauer. Se permitió sedimentar la muestra recién colocada durante 1 minuto y se contaron las células dentro de la cuadrícula trazada en la cámara de Neubauer, observadas con la ayuda del invertoscopio. Se contaron las células localizadas dentro de la cuadrícula central de la cámara, formada por 25 cuadros, que a su vez, cada cuadro está formado por 25 cuadros de menor tamaño. Finalmente se realizó la conversión siguiendo la fórmula: $[\# \text{ de células contabilizadas}/10] \times 10^6$ para obtener la concentración aproximada de células en millones de células/ ml.

6.2.10 Generación de Hibridomas

6.2.10.1 Fusión

En un tubo de 50 ml se mezclaron las células de bazo de ratón inmunizado (previamente separadas de los eritrocitos de bazo), con células de

mieloma de ratón en una relación 3:1. Se añadió 50 ml de medio D-MEM atemperado. Se centrifugó a 400 g durante 10 minutos y, el sobrenadante fue descartado con pipeta de vidrio. El tubo conteniendo el precipitado celular fue colocado en un baño de agua a 37°C. Se añadió lentamente 0.5 ml de polietilenglicol 1500 al 50% durante 1 minuto. Se continuó agitando durante 2 minutos más, a partir de los cuales se comenzó a añadir lentamente 1 ml de medio D-MEM en el lapso de 1 minuto. Luego se añadieron 3 ml de D-MEM en el lapso de 3 minutos. Se mantuvo en agitación manual con una pipeta de vidrio durante todo este procedimiento. Posteriormente se añadieron 10 ml más de D-MEM y se incubó durante 5 minutos en la incubadora de CO₂. Se centrifugó a 400 g durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en 50 ml de medio D-MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y HAT 1:50. Se colocó en placas de cultivo celular de 96 pozos de fondo plano, en una relación de 200,000 células/ pozo con un volumen final de 200 µl.

6.2.10.2 Selección con Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (HAT)

Se realizó cambio de medio a las placas de cultivo 4 días posterior a la fusión. Se utilizó medio D-MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y HAT 1:50. Solamente fue removido el 50% del medio en cada pozo, con cuidado de no dañar las células adheridas al fondo de la placa.

El cambio de medio conteniendo HAT en las placas de cultivo se realizó cada 3 días por una semana, en todas las ocasiones sustituyendo solo la mitad

del volumen total por pozo. Al séptimo día de la fusión, el medio de cultivo D-MEM fue suplementado con HT. El cambio de medio conteniendo HT se realizó cada 3 o 4 días por una semana, en todas las ocasiones sustituyendo solo la mitad del volumen total por pozo. El cultivo se continuó suplementando con HT por 28 días, al término de los cuales se fue disminuyendo la concentración de HT en el medio de 1:50 a 1:25 durante 3 días; en el siguiente cambio de medio se redujo la concentración de HT de 1:25 a 1:10 durante los siguientes 3 días. Finalmente se suspendió por completo el HT y se continuó el cultivo celular sin utilizar este suplemento.

6.2.10.3 Selección de pozos productores de anticuerpos.

Una vez que los pozos llegaron a una confluencia del 100%, se recuperó el sobrenadante de cada pozo confluyente y se determinó la presencia de anticuerpos dirigidos contra alguna de las proteínas del extracto celular crudo de *N. brasiliensis* por la técnica de ELISA.

Aquellos pozos que resultaron positivos mediante ELISA fueron expandidos en tres pozos de una placa de cultivo de 96 pozos. Cada tercer día se fue colectando el sobrenadante de estos pozos positivos a fin de tener una cantidad suficiente (alrededor de 1 ml de sobrenadante) para realizar un Western blot.

Los sobrenadantes de los pozos positivos fueron concentrados mediante liofilización con el fin de que la señal de las bandas proteicas fueran de buena

intensidad para poder ser apreciadas en el Western blot y de esta manera conocer contra qué proteínas eran dirigidos específicamente los anticuerpos.

6.2.10.4 Selección de clonas mediante dilución limitante.

Después de seleccionar las clonas productoras de anticuerpos de interés, se llevó a cabo la dilución limitante. Los hibridomas cultivados en el pozo de una placa de doce pozos fueron removidos mecánicamente con la utilización de micropipeta y colocados en un tubo de 15 ml (Falcon). Se centrifugaron a 400 g por 5 minutos, el sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue resuspendido en 1 ml. Se realizó conteo celular en cámara de Neubauer, y se ajustó la concentración final de 1 cel/ 200 µl. Se sembraron 96 pozos con 200 µl cada uno con medio D-MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y la placa se dejó incubando 7 días.

A los 7 días se observó al invertoscopio para identificar los pozos con crecimiento celular. A los cuales se realizó un cambio de medio del 50% del volumen. Se continuaron observando los pozos diariamente hasta que llegaron a máxima confluencia. Se recuperaron los sobrenadantes y se realizó una ELISA para seleccionar los pozos que contuvieran anticuerpos contra P61.

Una vez que los pozos de la dilución limitante fueron identificados, se prosiguió a realizarles una segunda dilución limitante, consistente en los mismos pasos descritos anteriormente para la primera dilución. Cuando se tuvieron los hibridomas productores de anticuerpos positivos, de la segunda dilución limitante, se expandieron lo suficiente para tener un volumen adecuado de

sobrenadante para realizar el Western blot, sin necesitar concentrar la muestra. Se realizaron Western blots para confirmar que los hibridomas positivos por ELISA eran productores de anticuerpos específicos contra las proteínas de interés. Se congelaron viales con clonas de cada una de las etapas de selección.

6.2.10.5 Expansión clonal.

6.2.10.5.1 Expansión clonal in vitro

Una vez confirmadas las clonas positivas productoras de anticuerpos contra P61, se realizó una expansión escalonada de los hibridomas, de placa de cultivo celular de 96 pozos, a placas de 24 pozos; posteriormente a placas de 12 pozos y finalmente a placas de 6 pozos. De ahí se expandió a frascos de cultivo celular; comenzando con frascos de menor volumen (25 ml), aumentando de frascos de 25 cm² a frascos de 50 cm²; posteriormente de frascos de 150 cm² a frascos de 225 cm², y finalmente de frascos de 500 cm² a 750 cm². En todos los pasos de la expansión clonal, las células fueron desprendidas del fondo de las placas y frascos mediante pipeteo vigoroso. Los frascos fueron incubados en las mismas condiciones descritas anteriormente para el resto de las células mamíferas anteriormente cultivadas en placas.

El siguiente paso fue la expansión clonal en botellas de cultivo celular. A partir de las células cultivadas en frascos de 750 cm², se añadieron a la botella 1×10^5 células/ml, con un volumen final de 150 ml de D-MEM suplementado con 10% suero bovino fetal. Se incorporó una mezcla de gases conteniendo 5%

CO₂, a una presión de 15 psi durante 15 minutos. Rápidamente se cerró herméticamente la botella y se colocó en el cuarto a 37°C en un aparato de rotación, a una velocidad de 1 rpm. Se realizó recambio de medio y se añadió la mezcla de gases cada 4 días.

6.2.10.5.2 Expansión clonal in vivo.

Para la producción de anticuerpos monoclonales en líquido de ascitis se siguió el protocolo descrito por la Universidad de Stanford (1999). Se inyectó por vía intraperitoneal 0.2 ml de pristano 15 días previos a la inyección de las células a un ratón BALB/c macho de 10 semanas de edad. Se observó y se pesó al animal cada tercer día para determinar si existía la presencia de ascitis. Después de 15 días, se inoculó 1×10^6 hibridomas, productores de anticuerpos IgM e IgG anti-P61, respectivamente, por vía intraperitoneal en un volumen de 0.15 ml. Se observó y se pesó al animal cada tercer día para ver la presencia de ascitis.

6.2.11 Purificación de anticuerpos monoclonales

6.2.11.1 Purificación de IgM monoclonal anti-P61

6.2.11.1.1 Concentración de sobrenadante de hibridomas productores de IgM

El sobrenadante de 72 hrs. de cultivo de hibridomas productores de anticuerpos IgM anti-P61 fue filtrado con papel filtro Whatmann utilizando vacío;

este proceso se repitió dos veces. Posteriormente fue filtrado con membrana de nitrocelulosa de poro 0.45 µm en vacío.

Para concentrar el sobrenadante filtrado, fue colocado en la unidad de filtración AMICON, con una membrana de polietersulfona de tamaño de poro de 10,000 Da. Se utilizó nitrógeno gaseoso a 40 psi, y se mantuvo en continua agitación a 4 °C.

6.2.11.1.2 Precipitación de euglobulinas.

Una vez concentrado el sobrenadante; se colocó en membranas de diálisis con tamaño de poro de 10,000 daltones y se dializó contra agua destilada en agitación, a 4°C, durante 18 hrs. Después de dializar, el contenido de las membranas de diálisis fue centrifugado a 24,000 g por 30 minutos a 4°C.

(Paul, 1995)

Se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a -20°C y el precipitado fue resuspendido en solución amortiguadora de fosfatos [PBS] 0.1 M. Se probó la presencia y funcionalidad de los anticuerpos monoclonales IgM tanto del precipitado como del sobrenadante mediante Western blot, así como su concentración aproximada mediante espectrofotometría a 280 nm (Howard, 2000) y nefelometría láser.

6.2.11.2 Purificación de IgG monoclonal anti-P61.

6.2.11.2.1 Precipitación con Sulfato de Amonio.

El sobrenadante de 72 hrs. de cultivo de hibridomas productores de anticuerpos IgG anti-P61 fue filtrado con papel filtro Whatmann utilizando vacío; este proceso se repitió dos veces. Posteriormente fue filtrado con membrana de nitrocelulosa de poro 0.45 µm en vacío.

Una vez filtrado, el sobrenadante de cultivo de hibridoma fue colocado en un matraz Erlenmeyer de 1L, sobre una plancha de agitación dentro de un recipiente conteniendo cubos de hielo. Se añadió sulfato de amonio saturado al 100% a pH 7.4, gota a gota a una velocidad de 1 ml/ min, hasta llegar a una concentración de sulfato de amonio al 80%. Este procedimiento se realizó a 4°C.

Después de terminar de añadir el sulfato de amonio, se continuó la agitación a 4°C durante 1 hora. Posterior a la cual, se centrifugó el contenido del matraz a 1000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a -20°C y el precipitado fue resuspendido en PBS 0.1 M al volumen original previo a la precipitación.

Se realizó una segunda precipitación con sulfato de amonio, en las mismas condiciones previamente mencionadas, hasta llegar a una concentración de 50% de sulfato de amonio. Después de centrifugar a 1000 g durante 30 minutos a 4°C, el sobrenadante fue almacenado a -20°C y el precipitado fue resuspendido en PBS 0.1 M a un 10% del volumen original del sobrenadante previo a la precipitación.

El precipitado resuspendido en PBS fue dializado contra agua destilada en agitación a 4°C durante 48 hrs, con recambios de agua cada 4 a 8 hrs. Una vez que se llegó a una concentración mínima de sales, se determinó la concentración aproximada de IgG mediante espectrofotometría a 280 nm (Howard, 2000) y nefelometría láser; así como la actividad de los anticuerpos monoclonales mediante Western blot.

6.2.11.2.2 Purificación de IgG mediante cromatografía de afinidad.

La columna de plástico BioRad de volumen de 10 ml fue empacada con 5 ml de resina de agarosa con proteína A inmovilizada. Se lavó la columna con solución de unión (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.15 M). Se ajustó el flujo a 1 ml/min. Posteriormente se pre-eluyó con solución de elución (Glicina-HCl 0.1 M pH 3.5). Nuevamente se añadió solución de unión para equilibrar la columna. Se añadieron 5 ml del precipitado de IgG monoclonal proveniente del sobrenadante de cultivo de hibridomas. Se lavó la columna con solución de unión hasta que la absorbancia a 280 nm fue < 0.02. Se disoció la interacción de IgG a la proteína A utilizando la solución de elución. Se monitoreó la absorbancia a 280 nm y se colectaron las fracciones del pico de absorbancia, se neutralizó inmediatamente con Tris 1M pH 8 y se lavó la columna con la solución de unión hasta que el pH fue neutro. Se guardó la columna conteniendo solución de unión y 0.1% de azida de sodio (Walker, 2002).

Se dializó la preparación de IgG contra agua destilada para remover la solución de elución. Se determinó la concentración aproximada de IgG mediante espectrofotometría a 280 nm (Howard, 2000) y nefelometría láser; así como la actividad de los anticuerpos monoclonales mediante Western blot.

6.2.12 Determinación de la concentración de anticuerpos monoclonales

6.2.12.1 Determinación mediante absorbancia a 280 nm

Siguiendo el protocolo descrito por Howard (2000), se tomó una muestra de 500 μ l de las suspensiones de anticuerpos purificados y se colocaron en una cubeta de cuarzo de 1 ml. Se determinó su absorbancia a 280 nm y se calculó la concentración aproximada mediante las siguientes fórmulas:

Para IgM= (Absorbancia a 280 nm) X 0.84

Para IgG= (Absorbancia a 280 nm) X 0.72

6.2.12.2 Determinación mediante nefelometría láser.

Para llevar a cabo la estimación de la concentración de anticuerpos monoclonales a utilizar en los ensayos, se requirió de la elaboración de curvas de estándares de concentraciones de anticuerpos conocidas.

Para la curva de estándares de IgM y de IgG2a, se utilizaron IgM e IgG2a de ratón, respectivamente, a concentraciones conocidas (1, 5 y 10 μ g). Las cuales se diluyeron en 100 μ l. Se añadió, respectivamente, 200 μ l de anti-IgM y anti-IgG anti-ratón, elaborado en conejo (sin conjugar); se incubó en las celdas



para nefelometría láser, a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se leyó la turbidez en el nefelómetro láser.

Las muestras de anticuerpos monoclonales diluidas 1:10 en agua destilada fueron incubadas de la misma manera y la turbidez registrada fue analizada con ayuda del programa GraphPad Prism V, para obtener la concentración de IgM e IgG, respectivamente. Se reportó en unidades nefelométricas de turbidimetría (NTU, por sus siglas en inglés).

6.2.13 Inhibición de Actividad de Catalasa.

Los ensayos iniciados por Beers (1951) para determinar la velocidad de reacción de la enzima catalasa contribuyeron al desarrollo de la técnica mejorada por Cohén (1970), con la cual los resultados obtenidos sobre la actividad de catalasa son más reproducibles. Posteriormente Jin (2003) modificó la técnica de Cohén de manera que permitió la utilización de anticuerpos monoclonales anti-catalasa para determinar si estos eran capaces de bloquear la actividad enzimática. En este proyecto se llevó a cabo el ensayo de inhibición de actividad catalasa descrita por Cohén, con la modificación realizada por Jin.

En 3 tubos de ensayo de 20 ml se colocó 0.5 ml de P61 a una concentración de 10^{-9} M en PBS. Uno de los tubos se utilizó como control positivo. A otro de los tubos se le añadió 10 µg de IgM monoclonal purificada anti-P61. Al tercer tubo se le añadió 10 µg de IgG monoclonal purificada anti-P61. Ambos tubos se incubaron por una hora a temperatura ambiente. En un

tubo de ensayo de 20 ml que se utilizó como testigo, se colocó 0.5 ml de agua destilada. A los 4 tubos, (control positivo, P61-IgM, P61-IgG, testigo) se les añadió 5 ml de H_2O_2 6 mM. Se mezcló su contenido, y después de 3 minutos se detuvo la reacción añadiendo 1 ml de H_2SO_4 6 N.

Para la medición espectrofotométrica, se requirió de una muestra estándar. Para la cual, en un tubo de ensayo de 20 ml, conteniendo 5.5 ml de PBS y 1 ml de H_2SO_4 6 N, se añadió 7 ml de KMnO_4 0.01 N. Y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 480 nm.

Se añadió a las muestras y al testigo 7 ml de KMnO_4 0.01 N, se mezcló e, inmediatamente se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 480 nm.

Para obtener la concentración de sustrato al tiempo cero (SO) se restó la absorbancia del testigo de la absorbancia de la muestra estándar. Para obtener la concentración del sustrato a los 3 minutos posterior a la reacción (S3) se restó la absorbancia del control positivo de la absorbancia de la muestra estándar.

Para calcular el porcentaje de actividad catalítica se lleva a cabo la conversión de la absorbancia de las muestras, teniendo en cuenta que SO corresponde a 0% de actividad, y S3 al 100% de actividad.

6.2.14 Obtención de sueros para ensayos in vivo e in vitro.

6.2.14.1 Obtención de suero de cobayo como fuente de complemento.

Se obtuvo sangre mediante punción cardiaca de cobayos albinos machos y hembras adultos de la cepa Hartley. Se colocó inmediatamente en un tubo de

ensayo de 20 mi previamente enfriado, y se mantuvo en hielo hasta su coagulación. Se recuperó el suero, el cual se centrifugó por 15 minutos a 14,000 g a 4°C. Se separó el sobrenadante del suero de cobayo, el cual se guardó en alícuotas de 0.5 mi a -70°C, hasta su uso.

6.2.14.2 Adsorción de suero de cobayo.

Se siguió el protocolo descrito por Murphy (1988), con modificaciones. A partir de un cultivo de *N. brasiliensis* de 72 hrs., se recuperó la masa bacteriana, la cual fue lavada con solución salina y centrifugada a 1000 g por 10 minutos en 3 ocasiones. Finalmente, la masa bacteriana fue resuspendida en 10 mi de solución salina. Se tomaron 100 pl de esta suspensión bacteriana y se colocaron en un tubo de 1ml en un recipiente con hielo. Se añadió 1 mi de suero de cobayo y se incubó en el hielo por 30 minutos, agitando cada 10 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 14, 000 g por 30 minutos, y el sobrenadante, conteniendo el suero adsorbido se esterilizó mediante filtración con filtro de jeringa de 0.22 µm.

6.2.14.3 Recolección de suero hiperinmune anW-*Nocardia* muerta por calor.

Se inmunizaron 10 ratones BALB/c de 10 semanas de edad con 100 pl (2×10^7 UFC) de *N. brasiliensis* muerta por calor, por vía subcutánea en cojinete plantar. Se sangraron del plexo retroorbital a los días 5, 6 y 7 posterior a la

inmunización. Se coaguló la sangre periférica obtenida y se separó el suero. El suero fue centrifugado a 14,000 g por 15 minutos, posteriormente el sobrenadante se guardó en alícuotas de 0.5 ml a -20°C hasta su uso.

6.2.15 Conteo de unidades formadoras de colonias

Se siguió el procedimiento descrito por Miles y Misra con modificaciones.

La masa bacteriana homogenizada de *N. brasiliensis* de un cultivo de 72 hrs., fue colocada en un tubo de 15 ml; se ajustó a un volumen de 10 ml con solución salina y se dejó sedimentar por 90 minutos. Después de los cuales se tomó 1 ml de la suspensión bacteriana y se colocó en un tubo conteniendo 9 ml de solución salina estéril; se realizaron 10 diluciones seriadas a partir de este tubo. Un mililitro de cada uno de los tubos fue sembrado en una caja petri, a la cual se le añadió 15 ml de BHI-agar 1.5%. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Una vez que el agar solidificó, las placas fueron incubadas por 72 hrs. a 37°C.

> í

Después de transcurrido este tiempo, se contaron las unidades formadoras de colonias de cada una de las diluciones.

6.2.16 Ensayos Bactericidas.

6.2.16.1 Estandarización en Nefelómetro de McFarland de la suspensión bacteriana de *N. brasiliensis*.

Se llevo a cabo la elaboración del estándar 0.5 de McFarland (OMS, 2006) cuya turbidez corresponde a una densidad aproximada de 1×10^8 UFC.

Se mezclaron 0.5 ml de cloruro de bario dihidratado al 1.175% con 99.5 ml de ácido sulfúrico al 1%. La turbidez de la suspensión bacteriana de *N. brasiliensis* de cultivo de 72 hrs. fue ajustada a la turbidez del estándar 0.5 de McFarland. De ahí se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución salina (aproximadamente 1×10^7 UFC/ml). De este tubo se tomaron 10 μ l y se añadieron 10 ml de solución salina (aproximadamente 1×10^4 UFC/ml). A partir de este último tubo se llegó a la concentración requerida de bacterias para los ensayos bactericidas. Se tomaron 20 μ l conteniendo aproximadamente 200 UFC de *N. brasiliensis* y se sembraron en cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular de 96 pozos.

6.2.16.2 Procedimiento de ensayos bactericidas.

Se siguieron los protocolos descritos por Murphy y colaboradores (1988), en combinación con los ensayos realizados por Cadieux y colaboradores (1999).

Como controles se utilizaron pozos conteniendo la suspensión bacteriana en contacto con la solución salina, el suero de cobayo adsorto (como fuente de complemento) y el suero de los días 5,6 y 7 de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* muerta por calor, calentado a 56°C y sin calentar, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales IgM e IgG fueron probados a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 μ g), para obtener el porcentaje bactericida de los mismos; se incluyeron pozos con los anticuerpos sin fuente del complemento como control (ver tabla 1). La bacteria estuvo en incubación con los anticuerpos monoclonales por 60 minutos a 37 ° C en agitación. Posteriormente, se añadió

Se mezclaron 0.5 ml de cloruro de bario dihidratado al 1.175% con 99.5 ml de ácido sulfúrico al 1%. La turbidez de la suspensión bacteriana de *N. brasiliensis* de cultivo de 72 hrs. fue ajustada a la turbidez del estándar 0.5 de McFarland. De ahí se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución salina (aproximadamente 1×10^7 UFC/ml). De este tubo se tomaron 10 μ l y se añadieron 10 ml de solución salina (aproximadamente 1×10^4 UFC/ml). A partir de este último tubo se llegó a la concentración requerida de bacterias para los ensayos bactericidas. Se tomaron 20 μ l conteniendo aproximadamente 200 UFC de *N. brasiliensis* y se sembraron en cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular de 96 pozos.

6.2.16.2 Procedimiento de ensayos bactericidas.

Se siguieron los protocolos descritos por Murphy y colaboradores (1988), en combinación con los ensayos realizados por Cadieux y colaboradores (1999).

Como controles se utilizaron pozos conteniendo la suspensión bacteriana en contacto con la solución salina, el suero de cobayo adsorto (como fuente de complemento) y el suero de los días 5,6 y 7 de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* muerta por calor, calentado a 56°C y sin calentar, respectivamente.

Los anticuerpos monoclonales IgM e IgG fueron probados a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 μ g), para obtener el porcentaje bactericida de los mismos; se incluyeron pozos con los anticuerpos sin fuente del complemento como control (ver tabla 1). La bacteria estuvo en incubación con los anticuerpos monoclonales por 60 minutos a 37 °C en agitación. Posteriormente, se añadió

20% (v/v) de suero de cobayo como fuente de complemento a los pozos indicados y se incubó durante 120 minutos. Este ensayo se realizó por triplicado. Se recuperó el contenido de los pozos a los tiempos 0, 60 y 120 minutos de incubación posterior a la adición del complemento. Estas muestras fueron sembradas en placas de petri a las cual se les añadió 15 ml de BHI- agar. Una vez solidificado el agar, las placas fueron incubadas a 37 °C por 72 hrs, después de las cuales se contaron las UFC en placa.

Tabla 1. Grupos de estudio para investigar el efecto bactericida de los anticuerpos monoclonales mediante ensayos bactericidas.

16 Grupos	(por triplicado)
Control Negativo	Solución Salina (sin Ac ni Complemento)
Control Interno	Solo Complemento (Suero de Cobayo)
Control Positivo	Suero de Ratón del día 5,6 y 7 Inmunizado con <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Calor
Control Positivo	Suero de Ratón del día 5,6 y 7 Inmunizado con <i>N. brasiliensis</i> Muerta por Calor calentado a 56°C + complemento
IgM monoclonal anti-P61	En concentraciones de 10, 50 y 100 pg/ pozo
IgG monoclonal anti-P61	En concentraciones de 10, 50 y 100 pg/ pozo
IgM monoclonal anti-P61 + Complemento	En concentraciones de 10, 50 y 100 pg/ pozo
IgG monoclonal anti-P61 + Complemento	En concentraciones de 10, 50 y 100 pg/ pozo

6.2.17 Ensayos de inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales.

6.2.17.1 Ensayo 1

El primer experimento consistió en la inmunización pasiva de anticuerpos monoclonales IgM contenidos en el sobrenadante concentrado de cultivo de *bridoma*; se midió su concentración de IgM mediante nefelometría láser. El esquema de inmunización pasiva fue de 3 dosis consecutivas en los días 0, 4 y posteriores a la infección con *N. brasiliensis* en cojinete plantar, las vías de ministración probadas fueron la vía intraperitoneal y la vía subcutánea. La primera dosis se administró 4 horas antes de la infección experimental.

Como grupos controles se utilizaron un grupo de ratones al que se le administró solución salina y otro grupo al que se le inyectó sobrenadante concentrado de cultivo de células de mieloma.

6.2.17.2 Ensayo 2

El segundo experimento de inmunización pasiva consistió en la ministración de anticuerpos monoclonales de tipo IgM e IgG por vía peritoneal a dos grupos de ratones BALB/c, 4 hrs. antes de la infección con *rasiliensis* en cojinete plantar. Se aplicó una sola dosis de los anticuerpos monoclonales. Como grupos controles se administró solución salina estéril a un grupo de ratones, como control negativo y, a otro grupo de ratones, suero de ratones inmunizados con nocardias muertas por calor de los días 5, 6 y 7 post-inmunización, como control positivo de protección.

De cada uno de los ratones utilizados en los experimentos se llevó un registro de las medidas de las patas infectadas, cada 3 a 5 días. Las medidas fueron tomadas con un vernier, y registradas en centímetros. Se midió el eje vertical, horizontal y transversal de la pata; y los datos fueron aplicados a la fórmula de la elipsoide ($\frac{4}{3} \pi abc$) para obtener el volumen en cm^3 . Además se llevó un registro fotográfico de cada uno de los grupos de estudio.

CAPITULO 7

RESULTADOS

7.1 Obtención del extracto celular crudo de *N. brasiliensis*

Se realizaron 5 cosechas de 40 matraces cada una, obteniendo un peso seco de masa bacteriana 17 ± 2.5 g. Posterior a la extracción de proteínas, se determinó la concentración del extracto celular crudo, siendo de 16.3 ± 1.3 mg totales por cosecha. (Figura 1)

7.2 Obtención de P61 de *N. brasiliensis*

Se obtuvieron 1.1 ± 0.3 mg por cosecha de P61 purificada.(Figura 1)

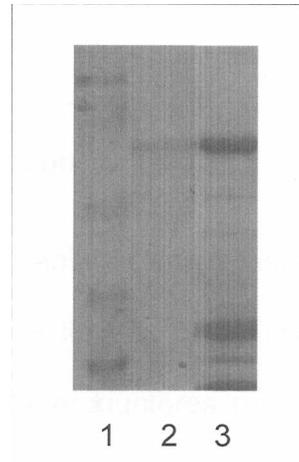


Figura 1. Gel de poliacrilamida en gradiente 8-18%. Carril 1. Marcador de Peso molecular. Carril 2. P61 purificada. Carril 3. Extracto celular crudo de *N. brasiliensis*.

7.3 Esquema de Inmunización.

Se comprobó la presencia de anticuerpos policlonales contra el ECC de *N. brasiliensis* en los sueros de ratones inmunizados, encontrando absorbancias de 1.082 ± 0.1 en ELISA.

7.4 Obtención de células de bazo de ratón inmunizado.

Mediante la técnica de separación de células por el método de gradiente con Ficoll; de los esplenocitos de ratón inmunizado se obtuvieron entre 2.5 a 3.9 millones de células mononucleares/ml. Esta cantidad de células es menor a la obtenida mediante la técnica de tisis de eritrocitos con cloruro de amonio, la cual dio como resultado 30 a 60 millones de células/ ml.

7.5 Generación de hibridomas.

Dado que se requiere establecer una relación de (3:1) de esplenocitos y células de mieloma para que se lleve a cabo una fusión exitosa; en la fusión donde se utilizaron esplenocitos productores de IgM en mayor proporción, se emplearon 61 millones de células de bazo y 20 millones de células de mieloma de ratón, la mezcla de estas células se sembró en 4.5 placas de cultivo celular de 96 pozos dando un total de 432 pozos sembrados. Para la fusión con células de bazo productoras de IgG se utilizaron 32 millones de esplenocitos con 10 millones de células de mieloma. La mezcla de estas células se sembró en 240 pozos de placas de cultivo celular de 96 pozos.

La selección de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-P61 utilizados en este proyecto se muestran en la tabla 2; en ella se describen los pozos que resultaron positivos mediante las técnicas de ELISA, Western blot y los que dieron positivo posterior a la dilución limitante, para llegar a la elección de la clona con mayor respuesta contra P61 de cada isotipo.

La visualización de la formación de acúmulos celulares fue posible después de 10 días a partir de la fusión (figura 2). En los pozos de las placas de cultivo celular de los probables hibridomas productores de IgM se contabilizaron 65 pozos con proliferación. Se observaron 70 pozos con proliferación en las placas de cultivo celular de probables hibridomas de IgG.

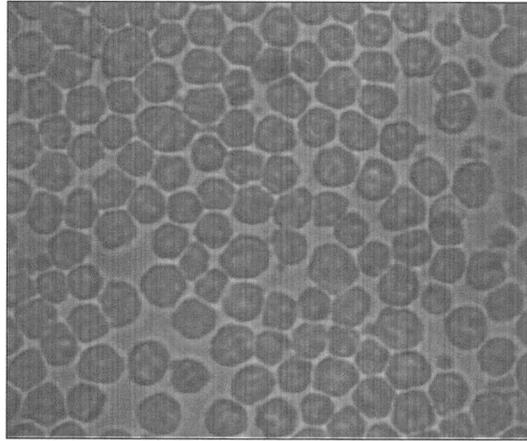


Figura 2. Hibridomas. Invertoscopio 40x. Fotografía digital.

7.6 Determinación de Isotipo y Subisotipo de Anticuerpos

Monoclonales Anti-P61

De los pozos donde se observó proliferación, al realizar la técnica de ELISA contra el extracto celular crudo de *N. brasiliensis*, se comprobó que 20 de los sobrenadantes de los probables hibridomas productores de IgM producían anticuerpos de isotipo IgM contra alguna de las proteínas del extracto celular crudo de *N. brasiliensis* y; de los sobrenadantes de los probables hibridomas productores de IgG se comprobó que 25 pozos producían anticuerpos del isotipo IgG contra proteínas del extracto celular crudo. (Tabla 2)

Tabla 2. Determinación del isotipo IgM e IgG anti-ECC mediante la técnica de ELISA.

	IgM	IgG
Blancos	0.07 ±0.02	0.089 ±0.01
Control Positivo (Suero del Ratón Inmunizado)	1.305 ±0.1	0.590 ±0.1
Control Negativo (Medio de cultivo + suero bovino fetal)	0.085 ±0.03	0.017 ±0.03
Clonas positivas utilizadas en los ensayos	0.302 0.573	0.222 0.313

De los 20 sobrenadantes de hibridomas que se comprobó que producían anticuerpos del isotipo IgM solamente 7 mostraron una señal específica contra alguna de las proteínas después de realizar los Western blots de los sobrenadantes. Se realizaron Western blots a 14 de los sobrenadantes de 25 pozos que producían anticuerpos de isotipo IgG y 10 de ellos mostraron especificidad contra alguna de las proteínas del extracto celular crudo de *N. brasiliensis*. Algunos de los sobrenadantes, tanto de IgM como de IgG, mostraron especificidad a más de una proteína. (Figura 3)

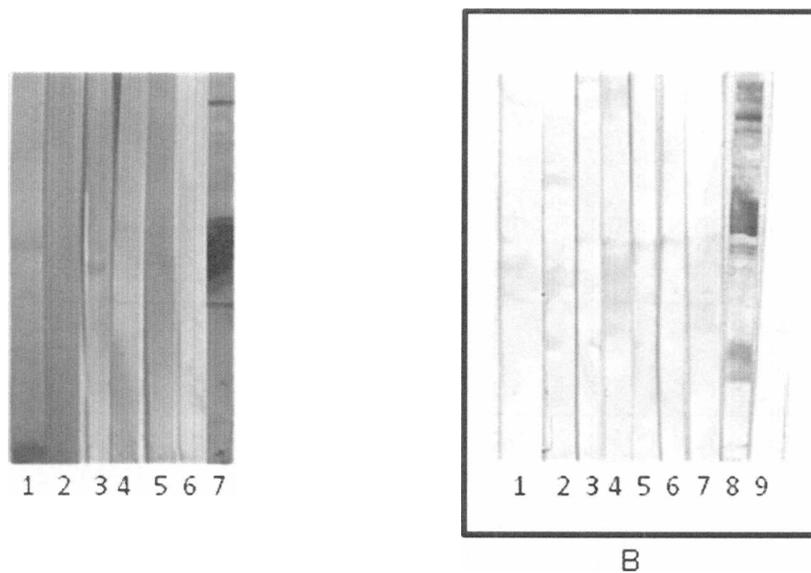


Figura 3. Western blot de los sobrenadantes de hibridomas productores de IgM e IgG anti-ECC de *N. brasiliensis*. A. Carriles 1-5. Sobrenadantes concentrados mediante liofilización de diferentes clonas productoras de IgM anti- ECC. Carril 6. Sobranadante de cultivo de mieloma. Carril 7. Suero de ratón de 7 días posterior a inmunización con ECC. B. Carriles 1-7. Sobrenadantes concentrados mediante liofilización de diferentes clonas productoras de IgG anti- ECC. Carril 8. Suero de ratón de 30 días posterior a inmunización con ECC, y re-inmunizaciones con **P61**. Carril 9. Sobranadante de cultivo de mieloma.

De los hibridomas que dieron mejor señal en Western blot, se seleccionaron cuatro clonas del isotipo IgM y dos clonas positivas del isotipo IgG para ser purificadas mediante dilución limitante, las clonas restantes fueron almacenadas en nitrógeno líquido.

%

Se seleccionaron cuatro clonas positivas contra P61 del isotipo IgM y dos clonas positivas del isotipo IgG contra P61 y fueron purificadas mediante dilución limitante, las clonas restantes fueron almacenadas en nitrógeno líquido. Finalmente, se eligió la clona con mayor respuesta contra P61 de cada isotipo mediante Western blot. (Tabla 3) (Figura 4)

Tabla 3. Selección de clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-P61.

HIBRIDOMAS	Productores de IgM	Productores de IgG
POZOS CON HIBRIDOMAS	65/ 432	70/ 240
POZOS CON HIBRIDOMAS POSITIVOS CONTRA ECC. de <i>N. brasiliensis</i>	20	25
CLONAS PURIFICADAS POR DILUCIÓN LIMITANTE (2 diluciones limitantes)	4	2
CLONAS POSITIVAS ANTI-P61	4	2
CLONAS UTILIZADAS EN ENSAYOS EN ESTE PROYECTO	1 (la más positiva por ELISA)	1 (la más positiva por ELISA)

Tabla 3. Selección de clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-P61.

HIBRIDOMAS	Productores de IgM	Productores de IgG
POZOS CON HIBRIDOMAS	65/ 432	70/ 240
POZOS CON HIBRIDOMAS POSITIVOS CONTRA ECC. de <i>N. brasiliensis</i>	20	25
CLONAS PURIFICADAS POR DILUCIÓN LIMITANTE (2 diluciones limitantes)	4	2
CLONAS POSITIVAS ANTI-P61	4	2
CLONAS UTILIZADAS EN ENSAYOS EN ESTE PROYECTO	1 (la más positiva por ELISA)	1 (la más positiva por ELISA)

A**B**

Figura 4. Western blot anti-P61. **A.** Carril 1. Marcador de peso molecular 65 kDa. Carril 2. IgM anti-P61. **B.** Carril 1. Marcador de peso molecular 65 kDa. Carril 2. IgG anti-P61.

Como se observa en la tabla 4, mediante la técnica de ELISA se determinó que el subisotipo de los anticuerpos monoclonales IgG, resultando ser IgG2a, puesto que posterior a la incubación con el anticuerpo anti-IgG2a fue el que presentó mayor densidad óptica.

Tabla 4. Determinación del subisotipo de IgG monoclonal anti-P61.

Anticuerpos Anti-IgG	Densidades Ópticas
Blancos	0.050 ±0.007
Anti-IgG1	0.060 ±0.004
Anti-IgG2a	0.219 ±0.02
Anti-IgG2b	0.038 ±0.01
Anti-IgG3	0.060 ±0.02

7.7.1 Expansión clonal in vitro

La expansión clonal in vitro de los hibridomas anti-P61 IgM e IgG que inició a partir de la dilución limitante de una célula/pozo en una placa de cultivo de 96 pozos, después de 15 días de incubación llegó a la máxima confluencia, requiriendo su transferencia a un pozo de mayor dimensión. Las transferencias posteriores (placas de 24, 12 y 6 pozos) se realizaron cada 4 días, cuando se alcanzó la máxima confluencia en cada etapa. Las confluencias máximas alcanzadas en la expansión celular in vitro se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Confluencia Máxima según la dimensión

Cultivos Celulares in vitro	Máxima confluencia celular alcanzada
Placa de 96 pozos	$1.5 \times 10^{-2} \times 10^5$ células/ pozo
Placa de 24 pozos	$2.5 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ células/ pozo
Placa de 12 pozos	5×10^5 células/pozo
Placa de 6 pozos	$7.5 \times 10^{-9} \times 10^5$ células/ pozo
Fascos de Cultivo de 25 ml	1×10^5 células
Fascos de Cultivo de 50 ml	$3 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ células
Fascos de Cultivo de 75 ml	$7 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células
Fascos de Cultivo de 225 ml	$1.3 \times 10^7 - 1.4 \times 10^7$ células
Fascos de Cultivo de 500 ml	$1.5 \times 10^7 - 1.8 \times 10^7$ células
Fascos de Cultivo de 750 ml	$2.0 \times 10^7 - 2.1 \times 10^7$ células
Botella	$2.0 \times 10^7 - 2.1 \times 10^7$ células

7.7.2 Expansión clonal in vivo

En los experimentos de proliferación clonal de hibridomas productores de IgM anti-P61 in vivo, realizado con dos clones diferentes productoras de IgM anti-P61, se observó que posterior a 4 semanas de la inyección de las células vía peritoneal; los ratones no presentaron distensión abdominal. Sin embargo, se evidenciaron tumoraciones a la palpación abdominal en ambos ratones, correspondientes a masas tumorales. Estos ratones fueron sacrificados. No fue posible inducir la producción de anticuerpos monoclonales IgG anti-P61 en peritoneo, debido a que los ratones a los que se les inyectó hibridomas productores de IgG anti-P61, por vía intraperitoneal no desarrollaron ascitis.

7.8 Purificación de anticuerpos monoclonales anti-P61 de cultivo in vitro

La purificación de anticuerpos monoclonales IgM a partir de la precipitación con sulfato de amonio disminuyó la eficiencia de los mismos para reaccionar contra la P61 en los Western blot realizados. Para mantener la actividad de estos anticuerpos, se requirió la utilización del método de concentración por filtración con AMICON.

El método de precipitación con sales de amonio fue eficaz para la purificación de los anticuerpos monoclonales IgG, ya que se observó que la actividad de la IgG monoclonal para reaccionar contra la P61, en los Western blots, no disminuyó después de las precipitaciones con sulfato de amonio; así mismo la actividad se mantuvo posterior a la elución de la columna de afinidad (figura 5).



Figura 5. Western blot IgG anti-P61 posterior a la elución de la columna de afinidad.

7.9 Determinación de la Concentración de Anticuerpos monoclonales

anti-P61

7. 9.1 Curvas de Calibración

Las figuras 6 y 7 muestran las curvas de calibración obtenidas con concentraciones de 1-10 pg/ml de los estándares de IgM e IgG2a de ratón

respectivamente. En base estas curvas de estándares, fue posible determinar la concentración de los anticuerpos monoclonales de ambos isotipos.

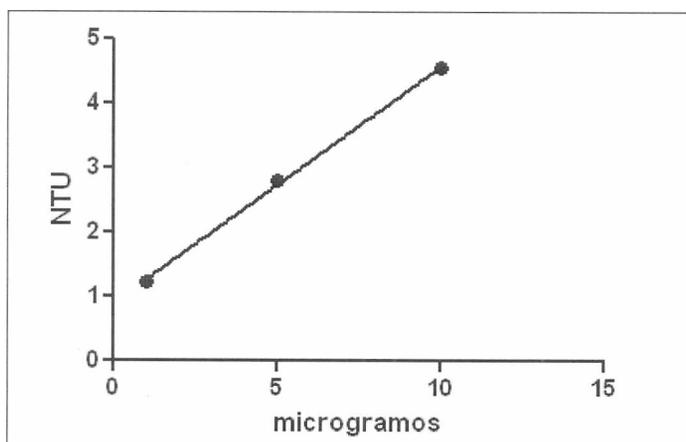


Figura 6. Curva de Calibración de los estándares de IgM de ratón.

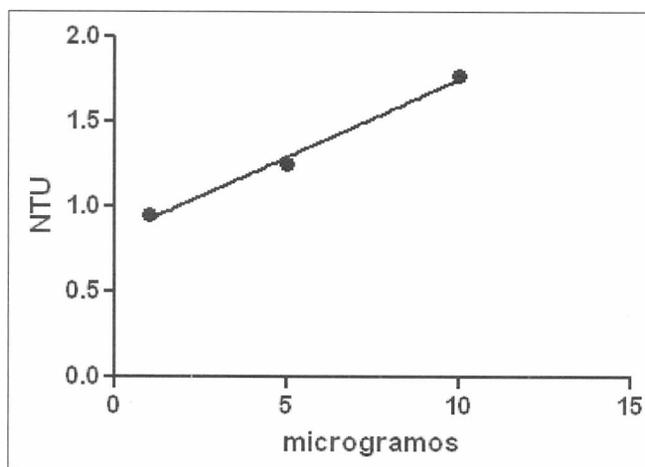


Figura 7. Curva de Calibración de los estándares de IgG2a de ratón.

7.9.2 Concentración de anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 de cultivo in vitro.

Como puede observarse en la tabla 6, después de concentrar con la unidad de filtración, se obtuvieron 25 mg/ ml de IgM monoclonal. La purificación de IgM mediante la precipitación por euglobulinas dio como resultado un rendimiento del 58% en el precipitado y 23.36% en el sobrenadante, con respecto a la concentración obtenida previa a dicha precipitación (figura 8).

Tabla 6. Concentración in vitro de IgM monoclonal anti-P61.

IgM monoclonal anti-P61	Concentración
En Cultivo	10-13 pg/ ml
Posterior a Concentración con AMICON	25 mg/ ml
Posterior a Precipitación por Euglobulina:	
Precipitado	14.5 mg/ml
Sobrenadante	5.84 mg/ml

1 2

Figura 8. Western blot IgM anti-P61 purificada por método de precipitación por euglobulinas.

Carril 1. IgM en precipitado. Carril2. IgM en sobrenadante.

7.9.3 Concentración de anticuerpos monoclonales IgG anti-P61 de cultivo in vitro.

En la tabla 7 se presentan las concentraciones de IgG calculadas a partir de muestras en cultivo y cada etapa de purificación. A pesar de que el rendimiento de la IgG monoclonal posterior a la elución de la columna de afinidad disminuyó 88.61%, su pureza fue mayor.

Tabla 7. Concentración *in vitro* de IgG monoclonal anti-P61.

IgG total	Concentración
En Cultivo	15-30 pg/ml
Posterior a Precipitación con Sulfato de Amonio	7.9 mg/ ml
Posterior a Columna de Afinidad	0.9-1 mg/ml

7.10 Determinación de la Inhibición de la Actividad de P61

De acuerdo a los resultados obtenidos de la determinación de la actividad enzimática de catalasa, se observa que posterior a la incubación de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 con la proteína P61 no disminuyó a actividad enzimática. Los valores de absorbancia obtenidos para ambas uestras son similares a los obtenidos para el control positivo. (Tabla 8)

Tabla 8. Determinación de la Actividad Enzimática de Catalasa.

	Absorbancia a 480 nm
Estándar	0.796
Testigo	0.312
Control Positivo (P61)	0.863
P61+ IgM Anti-P61	0.813
P61+ IgG Anti-P61	0.821

Tabla 7. Concentración *in vitro* de IgG monoclonal anti-P61.

IgG total	Concentración
En Cultivo	15-30 gg/ml
Posterior a Precipitación con Sulfato de Amonio	7.9 mg/ ml
Posterior a Columna de Afinidad	0.9-1 mg/ml

7.10 Determinación de la Inhibición de la Actividad de P61

De acuerdo a los resultados obtenidos de la determinación de la actividad enzimática de catalasa, se observa que posterior a la incubación de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 con la proteína P61 no disminuyó la actividad enzimática. Los valores de absorbancia obtenidos para ambas muestras son similares a los obtenidos para el control positivo. (Tabla 8)

Tabla 8. Determinación de la Actividad Enzimática de Catalasa.

	Absorbancia a 480 nm
Estándar	0.796
Testigo	0.312
Control Positivo (P61)	0.863
P61+ IgM Anti-P61	0.813
P61+ IgG Anti-P61	0.821

7.11 Ensayos bactericidas in vitro.

7.11.1 Ensayos bactericidas in vitro de los grupos controles positivos.

En la figura 9 se observa el efecto de los sueros utilizados como controles en este ensayo. Los pozos utilizados como control negativo muestran 100% de viabilidad a los diferentes tiempos de incubación. Los pozos que representan los controles positivos mostraron una disminución en la viabilidad bacteriana con respecto al tiempo de incubación; observando que al tiempo final de tres horas, en los pozos de control positivo donde se utilizó suero de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* muertas por calor se obtuvo una viabilidad bacteriana de 8.7%, mientras que los pozos de control positivo en el que se empleó suero de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* muertas por calor calentado a 56°C adicionado con complemento de cobayo, presentó una viabilidad bacteriana de 30% a las 3 horas de incubación.

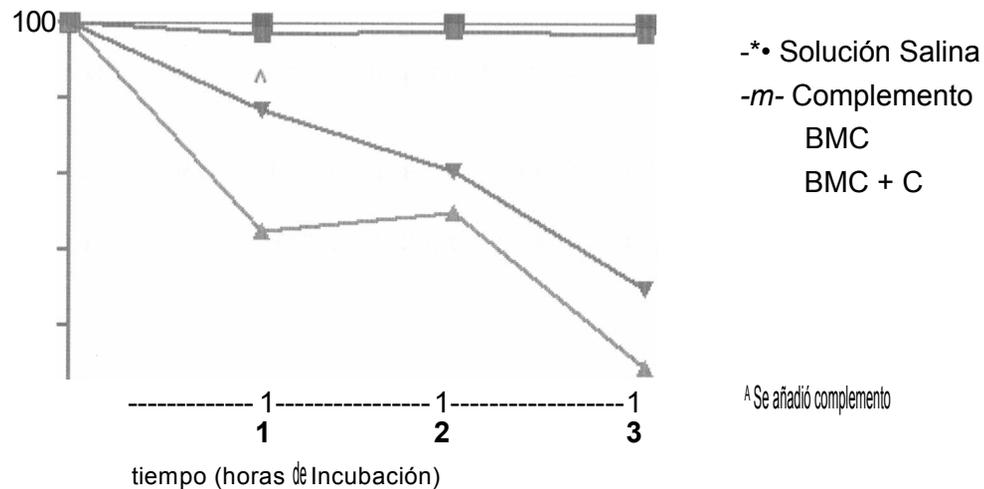


Figura 9. Efecto bactericida in vitro de los grupos controles.

7.11.2 Ensayos bactericidas in vitro de los anticuerpos monoclonales anti-P61

Como se puede apreciar en las tablas 9 y 10, la adición de complemento incrementó el efecto bactericida de los anticuerpos monoclonales contra *N. brasiliensis*, este efecto aumenta conforme avanza el tiempo de incubación. Para IgM monoclonal anti-P61 a una concentración de 50 pg, en presencia de complemento, posterior a 3 horas de incubación, el porcentaje de inhibición alcanzado es de 74.44; para IgG monoclonal anti-P61 a 10 pg de concentración en presencia de complemento posterior a 3 horas de incubación, el porcentaje de inhibición alcanzado es de 92.38.

No se observó una diferencia de la acción bactericida de los anticuerpos monoclonales en ausencia del complemento, en ambos casos.

Es importante destacar que a una menor concentración, la IgG monoclonal muestra un efecto bactericida *in vitro* mayor a la IgM monoclonal. (tabla 9 y 10).

Tabla 9. Efecto bactericida *in vitro* de IgM anti-P61 contra *N. brasiliensis*

Inhibición de Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> (%)			
Grupos de Estudio IgM	t1	t2	t3
10 M3	1.22	4.06	9.37
50 pg	5.05	5.73	16.98
100 pg	13.59	6.68	31.27
10 pg + Compl	8.71	2.86	46.03
50 pg + Compl	12.20	53.46	74.44
100 pg+Compl	17.07	36.75	53.97

Tabla 10. Efecto bactericida *in vitro* de IgG anti-P61 contra *N. brasiliensis*

Inhibición de Viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> (%)			
Grupos de Estudio IgG	t1	t2	t3
10 pg	1.22	11.46	18.89
50 pg	6.27	12.89	31.75
100 pg	4.70	21.72	21.90
10 pg + Compl	4.18	76.85	92.38
50 pg + Compl	6.62	72.55	77.62
100 pg+Compl	1.74	46.78	84.76

Los resultados de las tablas antes presentadas se encuentran graficados en las figuras 10 y 11, donde se muestra el efecto in vitro de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 en la viabilidad bacteriana. Existe una diferencia estadísticamente significativa de los pozos que recibieron 50 pg de IgM monoclonal anti-P61 y complemento, con respecto a los pozos de control negativo a las 3 horas de incubación. ($p= 0.028$) (Figura 10). En el caso de los pozos con anticuerpos monoclonales IgG anti-P61, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los pozos con 10 pg de IgG y complemento y los pozos de control negativo. ($p= 0.014$) además de una diferencia significativa de los pozos con 10 pg de IgG y complemento con respecto a los pozos con la misma concentración pero sin el complemento a las 3 horas de incubación. ($p= 0.007$) (Figura 11)

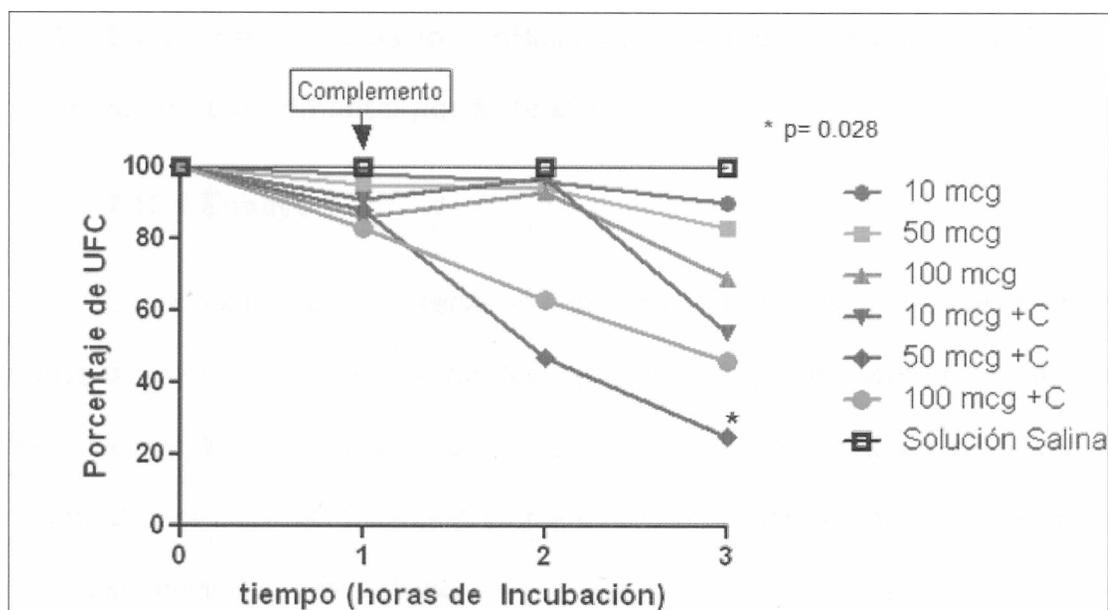


Figura 10. Efecto bactericida in vitro de los anticuerpos monoclonales IgM anti-P61.

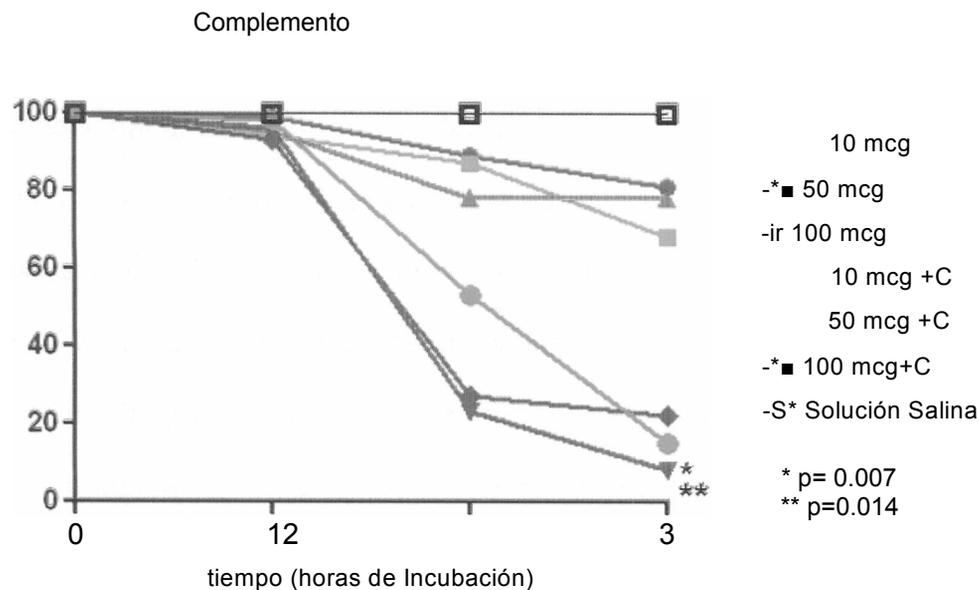


Figura 11. Efecto bactericida in vitro de los anticuerpos monoclonales IgG anti-P61

7.12 Efecto protector de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG en la infección experimental por *N. brasiliensis*.

7.12.1 Ensayo 1

En la figura 12 se observa el curso normal de la infección experimental causada por *N. brasiliensis* en los ratones del grupo control negativo. El establecimiento del micetoma sigue el patrón inflamatorio anteriormente reportado por Salinas Carmona y colaboradores (Salinas-Carmona, 1999), con una disminución en la inflamación en los primeros 15 días posteriores a la infección, repuntando hacia el día 21, y estableciéndose como micetoma al día 30; aumentando en volumen durante el resto del tiempo del experimento. A

pesar de que en los primeros días después de la infección no hubo diferencia en la inflamación presentada en los grupos de ratones que recibieron tres dosis de IgM monoclonal anti-P61 por diferentes vías (IP y SC); después de establecido el micetoma hacia el día 50 posterior a la infección, existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas vías de administración ($p=0.042$). De la misma manera existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control negativo y el grupo que recibió tres dosis de IgM monoclonal por vía intraperitoneal ($p=0.032$), cuya inflamación es mínima, sin establecimiento del micetoma.

El grupo de ratones que recibió el sobrenadante de células de mieloma (no productoras de anticuerpos), tuvo un comportamiento similar al del grupo control negativo que recibió solución salina, presentando el establecimiento del micetoma al día 30 y posteriormente, un aumento del volumen de la extremidad afectada hasta el día 60.

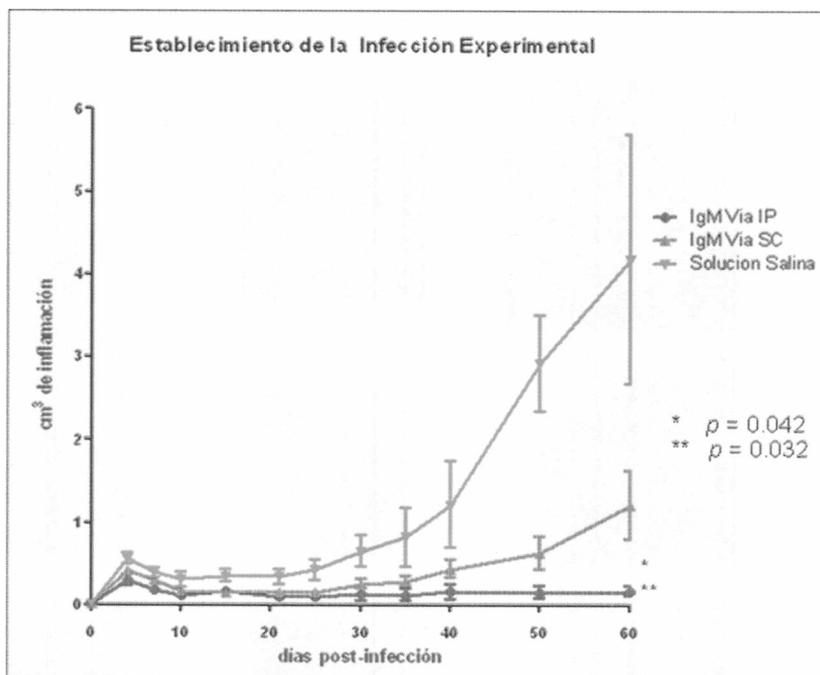


Figura 12. Establecimiento de la infección experimental por *N. brasiliensis* Ensayo 1

En la figura 13 se muestran las fotografías digitales representativas de un sujeto de cada uno de los grupos de estudio del Ensayo 1, a diferentes días posteriores a la infección.

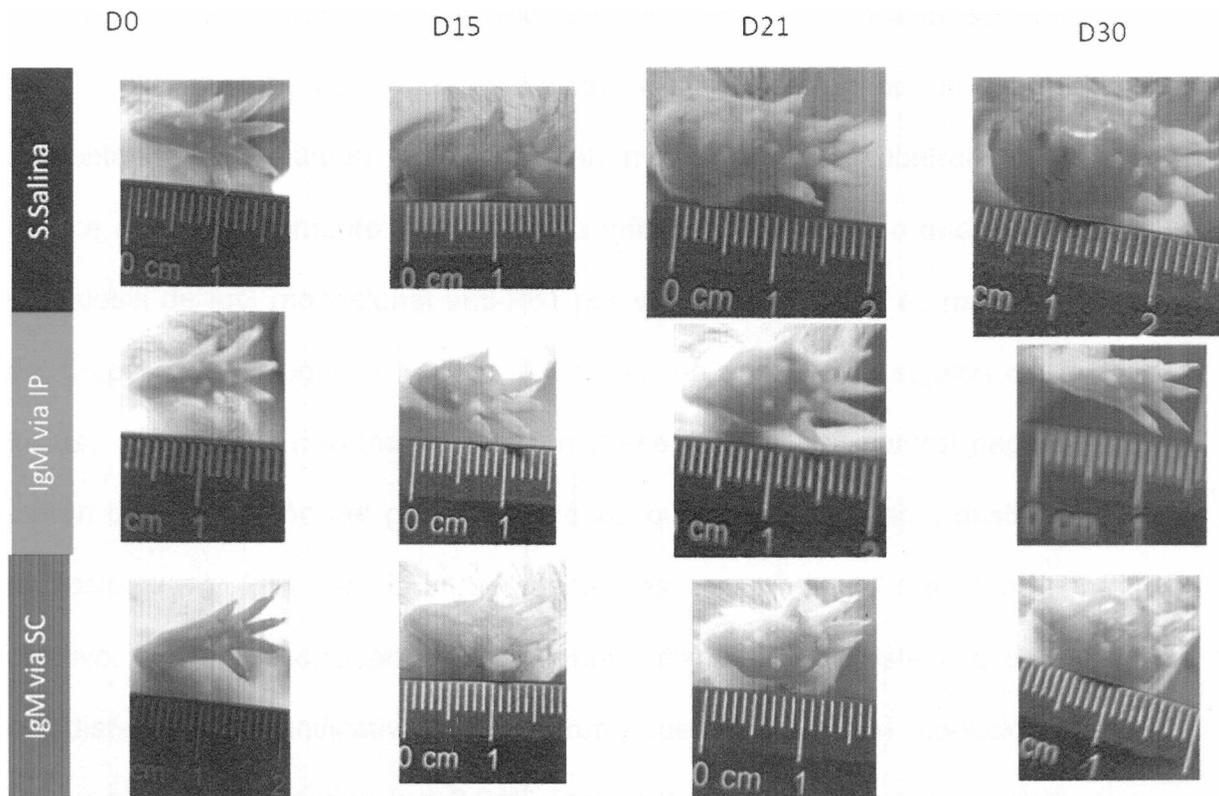


Figura 13. Fotografías digitales del seguimiento del establecimiento del micetoma desde el día de la infección experimental hasta el día 30 posterior a la infección. Grupos: Control (solución salina), IgM por vía IP, IgM por vía SC.

7.12.2 Ensayo 2

En los resultados graficados del ensayo 2 en el grupo control negativo (solución salina) se observa el patrón característico del curso de la enfermedad experimental, semejante al descrito para el control negativo del ensayo 1. A partir del día 30, cuando se establece el micetoma, se aprecia una separación muy marcada entre las cifras de los grupos controles negativo y positivo (suero de ratón inmunizado con *N. brasiliensis* muerta por calor los días 5,6,7 posteriores a la inmunización); el control negativo continúa

positivo (suero de ratón inmunizado con *N. brasiliensis* muerta por calor los días 5,6,7 posteriores a la inmunización); el control negativo continúa aumentando su volumen de inflamación mientras que el control positivo lo reduce considerablemente. El patrón de inflamación del grupo que recibió una sola dosis de IgG monoclonal anti-P61 por vía intraperitoneal es muy similar al del grupo control negativo, siendo la inflamación en algunos sujetos del grupo incluso mayor a la máxima inflamación presentada por el control negativo. El patrón de inflamación del grupo de ratones que recibió una sola dosis de IgM monoclonal anti-P61 por vía intraperitoneal es muy similar al del grupo control positivo, con una reducción en el volumen inflamatorio. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo que recibió la IgM monoclonal anti-P61 y el control negativo ($p= 0.045$), así como también entre los grupos que recibieron IgM e IgG monoclonales anti-P61 ($p= 0.049$). (Figura 14)

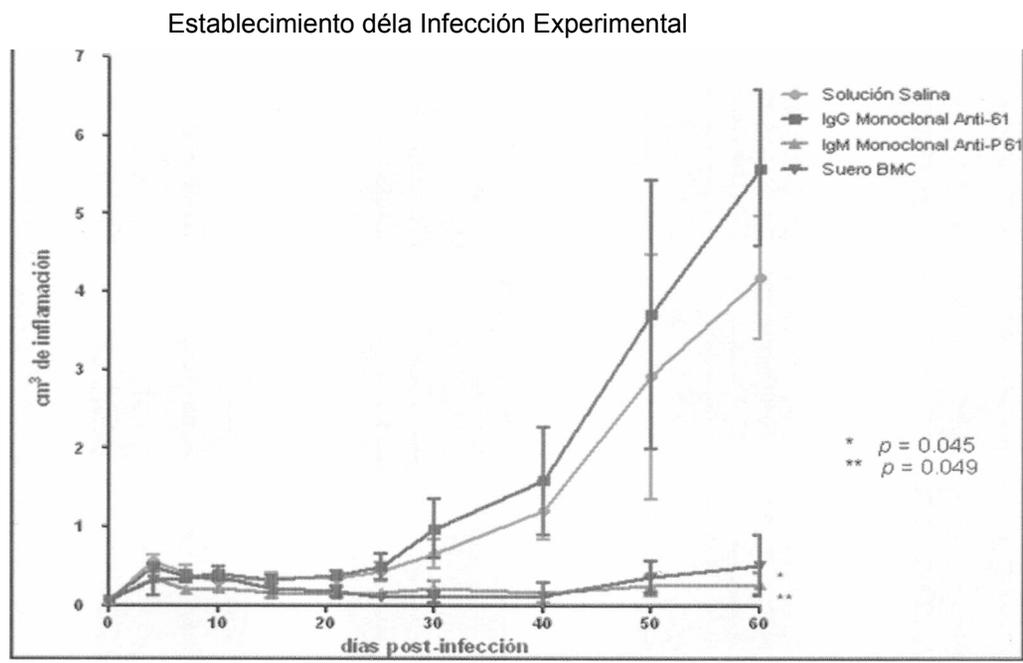


Figura 14. Establecimiento de la infección experimental por *N. brasiliensis* Ensayo 2

En la figura 15 se muestran las fotografías digitales representativas de un sujeto de cada uno de los grupos de estudio del Ensayo 2, a diferentes días posteriores a la infección.

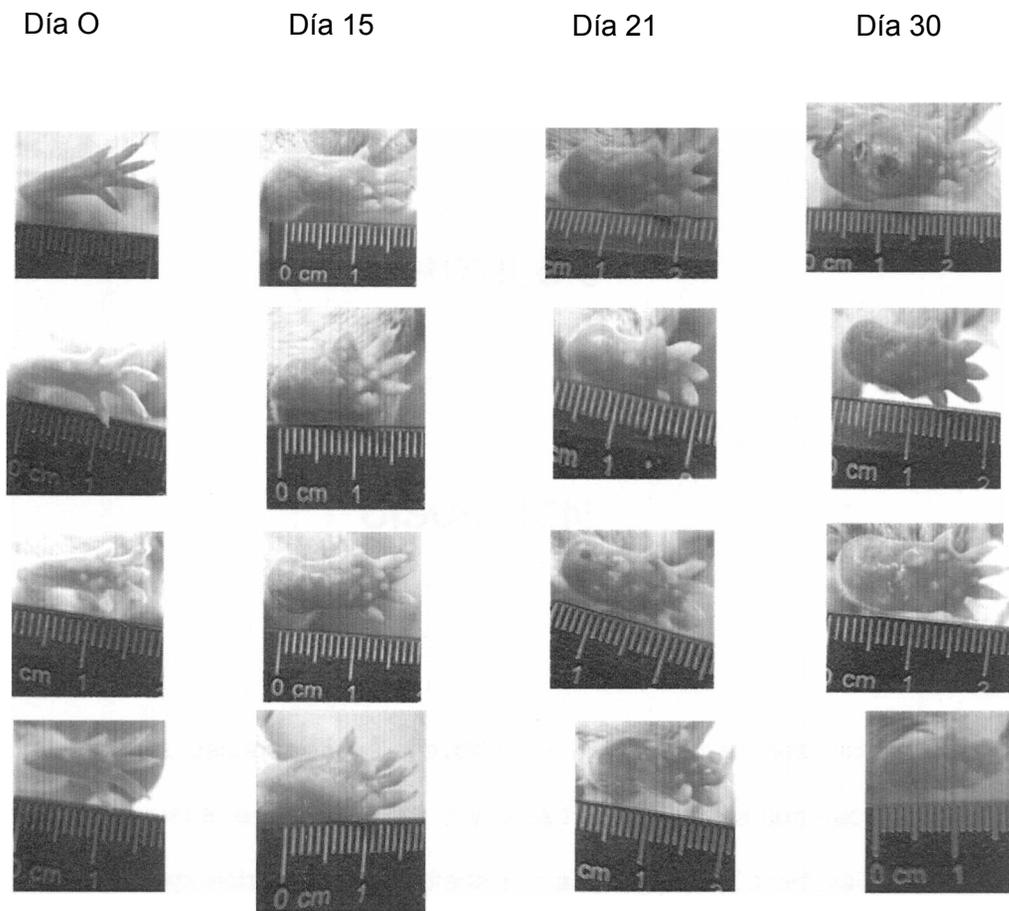


Figura 15. Fotografías digitales del seguimiento del establecimiento del micetoma desde el día de la infección experimental hasta el día 30 posterior a la infección. Grupos: Control negativo (solución salina), IgM por vía IP, IgG por vía IP, control positivo (suero de ratón inmunizado con BMC de los días 5,6 y 7)

CAPITULO 8

DISCUSION

Gracias a la vacunación, la mayoría de las enfermedades virales han sido reducidas drásticamente en incidencia; la viruela fue erradicada con vacunas capaces de provocar una respuesta inmune mediada por anticuerpos (Casadevall, 2003). Hoy en día, aún existen muchas enfermedades para las cuales la vacunación activa puede inducir una respuesta inmune incapaz de eliminar antígenos, a pesar de que éstos sean inmunodominantes. Las vacunas efectivas no necesariamente imitan la respuesta inmune natural contra un patógeno, sino que los anticuerpos pueden inmunomodular esta respuesta a favor del huésped. (Brady, 2005).

Hoy en día, existe solo un número reducido de vacunas contra bacterias intracelulares. De ellas, la BCG, utilizada para proteger contra la tuberculosis. El éxito de esta vacuna ha sido limitado, confiriendo protección contra las formas graves de la enfermedad, pero cuya eficacia contra la tuberculosis pulmonar es alrededor del 70-80%.

La protección contra bacterias intracelulares ha sido difícil por muchas razones, entre ellas, la compleja estructura de los microorganismos, sus mecanismos de defensa contra la respuesta inmune del huésped, y muchos otros factores, que a la fecha no han sido completamente dilucidados.

El concepto reinante acerca de la respuesta inmune contra bacterias intracelulares había sido que la inmunidad celular mediada por linfocitos T CD4+ Th1 y CD8+ es crucial para la protección contra estos patógenos. Mientras que la inmunidad humoral, mediada por anticuerpos, carecía de efecto protector.

Muchos investigadores han comenzado a cuestionar esa marcada división de la inmunidad adquirida, acerca de si realmente la inmunidad mediada por anticuerpos jugase o no un papel importante en la protección contra patógenos intracelulares.

En estudios previos publicados en 2004 por Salinas-Carmona y colaboradores demostraron que el suero hiperinmune de animales inmunizados con antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis*, de los primeros días posterior a la inmunización, (con altos títulos de IgM), transferido a animales sanos, es capaz de proteger parcialmente contra el establecimiento del micetoma; y de manera contraria, la transferencia pasiva de suero hiperinmune de animales inmunizados con antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis*, del día 30 posterior a la inmunización, (con altos títulos de IgG), transferido a animales sanos, no confirió protección. (Salinas-Carmona, 2004).

El suero hiperinmune es una preparación policlonal que incluye anticuerpos de muchas especificidades e isotipos diferentes; el suero policlonal puede contener anticuerpos bloqueadores (Joiner, 1985), y anticuerpos de otras especificidades que

afectan la infección; por lo que los anticuerpos monoclonales, al presentar una sola especificidad y un solo isotipo, representan una herramienta muy útil para investigar la protección humoral. (Casadevall, 2003).

Puesto que los estudios realizados previamente para investigar el papel protector de los anticuerpos policlonales anti-*A. brasiliensis* contra el establecimiento de la infección fue a través de la transferencia pasiva con sueros hiperinmunes (Salinas-Carmona, 2004); en este proyecto se investigó el papel protector de los anticuerpos monoclonales en el mismo modelo in vivo de infección experimental, para poder dilucidar de una manera más fina, si la IgM es capaz de conferir protección contra la infección experimental por *N. brasiliensis* y si la IgG carece de ese efecto protector.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizó la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína inmunodominante de *N. brasiliensis*, que tiene función de catalasa (Vera-Cabrera, 1992,1999) y ha sido identificada como factor de virulencia para otras especies de *Nocardia*. (Beaman, 1985).

Los anticuerpos monoclonales son una herramienta importante para investigar el papel de la inmunidad humoral contra esta bacteria, ya que al tener una gran cantidad de anticuerpos dirigidos contra un mismo epítotope, nos permite dirigir una respuesta inmune más precisa para dilucidar si contribuyen en la protección.

Los protocolos descritos para la producción de anticuerpos monoclonales, utilizan alrededor de 100,000 células de bazo para la realización de una fusión exitosa. En las primeras fusiones realizadas para este proyecto, se utilizó la técnica de separación de células mononucleares por gradiente de Ficoll. La recuperación de células de bazo mediante esta técnica fue muy baja, y el bazo de un solo ratón no

bastó para reunir la cantidad de células requeridas, por lo que las fusiones realizadas con una cantidad pequeña de células no resultaron en una adecuada producción de hibridomas.

Después de implementada la técnica de separación de células mediante la lisis con cloruro de amonio, permitió recuperar una mayor cantidad de células de bazo, y por ende, una producción suficiente de hibridomas. Cabe destacar que, a pesar de utilizar una cantidad de células de bazo menor a las reportadas en la literatura para la generación de hibridomas, ambas fusiones fueron exitosas para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-A/ocard/a.

Los resultados de las fusiones descritas en este proyecto doctoral, entre células de bazo de ratón inmunizado (previa lisis de eritrocitos con cloruro de amonio) y células de mieloma, son similares a los reportados en la literatura (Walker, 2002), obteniendo una cantidad alrededor de entre 70 y 80 hibridomas por fusión.

El criterio descrito en la literatura (Walker, 2002) para considerar que existe la presencia de anticuerpos de interés en el sobrenadante de los hibridomas es calcular 2 desviaciones estándar por encima de la media de los controles negativos en la técnica de ELISA. De acuerdo a este criterio, muchos pozos en ambas fusiones resultaron positivos; sin embargo, se enfocó en trabajar con los hibridomas de los pozos que dieron un resultado positivo doble o mayor al doble de la densidad óptica que los controles negativos y blancos.

El subisotipo de IgG más comúnmente reportado en la producción de anticuerpos monoclonales es el IgG2a (Ramírez, 2002) (Li, 2002), el mismo subisotipo

encontrado en los anticuerpos monoclonales utilizados en este proyecto. Lo cual es un resultado esperado al inmunizar con un antígeno proteico timo-dependiente.

Los reportes acerca de la producción de anticuerpos monoclonales en cultivo celular indican que las concentraciones de anticuerpos que se pueden llegar a obtener in vitro son muy bajas, alrededor de 10 a 30 pg/ ml; en comparación a las que se pueden llegar a obtener in vivo, alrededor de 2 a 5 mg/ml. En este proyecto doctoral la concentración obtenida en cultivo de IgM monoclonal estuvo dentro de los valores reportados en la literatura, en los límites bajos, aproximadamente de 10 a 13 pg/ ml; mientras que la concentración obtenida de los cultivos de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales IgG se encontró en los rangos altos de lo descrito por otros autores, entre 15 y 30 pg/ ml. Es decir, la producción in vitro de IgG monoclonal fue mayor que la de IgM monoclonal.

Existen varias técnicas para la proliferación de hibridomas in vivo. Primero se debe de inducir una irritación en peritoneo, capaz de atraer células al sitio de inflamación que ayudarán a la proliferación de los hibridomas posteriormente inyectados. El más comúnmente utilizado es el pristano (*pristis*: tiburón), que es un alcano terpenoide saturado que se obtiene principalmente de aceite de hígado de tiburón. Otro agente más recientemente utilizado es el adyuvante incompleto de Freund. En este proyecto se utilizaron ambos agentes, sin embargo, no fue posible la inducción de producción de anticuerpos en líquido de ascitis, tanto para IgM como para IgG; por lo que se continuó su producción in vitro.

Existen varios métodos para purificar anticuerpos. Los métodos comúnmente utilizados incluyen: precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel, intercambio

iónico, columnas de afinidad, entre otros. Por lo general se requiere la combinación de mínimo 2 métodos distintos para asegurar la pureza de los anticuerpos. (Walker,2002)

La precipitación con sulfato de amonio funciona sólo si la proteína se encuentra en un volumen relativamente concentrado. Además, para una mejor precipitación el pH debe ser menor a su punto isoeléctrico.

Las gammaglobulinas precipitan con sulfato de amonio a una concentración entre 40-50%. (Walker,2002) La cantidad de IgM precipitada al 50% con sulfato de amonio fue muy poca, casi indetectable por nefelometría. Dos posibles explicaciones a este fenómeno son que la IgM puede llegar a desnaturalizarse durante la precipitación con sales (Walker,2002) y, la segunda explicación, (más posible) es que la concentración de la IgM en el sobrenadante fue tan baja que no fue posible precipitarla con las sales de amonio. Por lo tanto, se decidió concentrar el sobrenadante previo a su precipitación.

Tomando en cuenta que la mayoría de los anticuerpos de isotipo IgM son insolubles en presencia de fuerzas iónicas bajas; es decir, tienen la característica de poder precipitar por diálisis contra concentraciones muy bajas de sales, en frío. Una vez concentrada en solución, la precipitación de IgM bajo estas condiciones resultó muy efectiva. Además, son pocas las proteínas que pueden precipitar en estas condiciones; lo cual permitió aumentar su pureza tras una segunda precipitación similar. Fue posible precipitar el 58% de los anticuerpos IgM monoclonales en la solución previamente concentrada, pero el resto continuó soluble a pesar de someterla a un segundo ciclo de diálisis.

En el caso de la IgG monoclonal, se realizó un Western blot posterior a una precipitación inicial con sulfato de amonio al 50%, tanto del precipitado como del sobrenadante, para confirmar su actividad. Se observó que una gran cantidad de anticuerpo monoclonal permanecía en el sobrenadante sin precipitar, por lo que se decidió modificar el protocolo de precipitación. Se realizaron 2 precipitaciones consecutivas: una primera al 80% de sulfato de amonio, que permitió la precipitación de una gran cantidad de proteínas, incluidos la gran mayoría de los anticuerpos monoclonales en el sobrenadante, seguido de una segunda precipitación al 50% de sulfato de amonio, donde precipitó un número menor de proteínas, principalmente la IgG monoclonal.

Debido a que tras la precipitación con sulfato de amonio, existía aun la presencia de otras proteínas junto con el anticuerpo monoclonal IgG, se realizó la purificación con una columna de afinidad. El rendimiento del anticuerpo monoclonal posterior a la elución disminuyó considerablemente, sin embargo su pureza fue mayor.

La catalasa ha sido reportada como factor de virulencia de *Nocardia asteroides*; en el caso de *Nocardia brasiliensis*, la P61 es un antígeno inmunodominante, con actividad catalasa. (Salinas-Carmona, 1992) (Vera-Cabrera, 1999). Debido a su naturaleza enzimática, se trató de dilucidar si los anticuerpos monoclonales anti-P61, eran capaces de unirse al sitio activo de la P61 y, de esta manera, bloquear su actividad. A pesar de que los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer a la enzima, no se unen a ella en su sitio activo, ya que la incubación con los anticuerpos monoclonales no disminuyó su actividad catalasa en presencia del sustrato.

Las funciones de los anticuerpos incluyen principalmente: la neutralización de toxinas, la opsonización de antígenos y posterior unión a receptores en los fagocitos,

células NK o eosinófilos para permitir su eliminación mediante fagocitosis o lisis celular. También pueden activar el complemento por la vía clásica. Por si solos, es decir, sin la presencia del complemento o de células del sistema inmune, los anticuerpos solamente son capaces de unirse a su antígeno, sin llevar a cabo la destrucción del mismo. En ocasiones, pueden impedir que los antígenos se unan a receptores específicos, bloqueando su efecto. Los anticuerpos requieren de la presencia, ya sea, del complemento o de células del sistema inmune para que los antígenos sean eliminados.

La fuente de complemento utilizada en este proyecto provino de suero de cobayo. El suero tenía efecto bactericida al contacto con la *Nocardia* probablemente debido a la acción de anticuerpos no-específicos presentes en el suero, así como a la presencia de proteínas del complemento escindidas espontáneamente que pudiesen iniciar la cascada del complemento por la vía alterna. Posterior a la adsorción del suero, su efecto bactericida fue escaso. Los sueros utilizados como control positivo en los ensayos bactericidas *in vitro* calentados a 56°C (para inhibir la acción del complemento), adicionados con el suero de cobayo fueron capaces de activar al complemento presente en dicho suero; sin embargo, presentaron una menor inhibición bacteriana que los sueros del control positivo que no fueron calentados. El complemento presente en el suero del ratón inmunizado con bacterias muertas por calor, tuvo una acción bactericida superior contra la *N. brasiliensis* que el complemento del suero de cobayo; lo que convierte al suero hiperinmune de ratón en una mejor fuente de complemento para los ensayos realizados. Sin embargo, la cantidad que se puede obtener de suero es mucho menor en el ratón que en el cobayo. Por esta razón se decidió utilizar suero de cobayo como fuente de complemento para los ensayos bactericidas de este proyecto.

La forma pentamérica de la IgM le permite activar mejor el complemento en comparación a la IgG, que es un dímero (Abbas, 2003). Contrario a lo reportado en la literatura, en este proyecto se encontró que la IgG monoclonal dirigida contra la P61 tuvo un mayor efecto bactericida in vitro en presencia de complemento en comparación con la IgM monoclonal. Además, se requirieron concentraciones menores de IgG que las concentraciones requeridas de IgM para mostrar altos porcentajes de inhibición bacteriana. Cabe mencionar que el efecto bactericida de la IgM monoclonal en presencia del complemento fue considerablemente mayor al encontrado en ausencia del complemento. Tanto los anticuerpos monoclonales IgM como los IgG anti-P61 fueron capaces de activar la cascada del complemento para provocar la lisis bacteriana.

Los reportes en la literatura indican que la catalasa de especies de *Nocardia* no es secretada al medio, tal es el caso de estudios realizados con la catalasa de *N. asteroides*, donde no se encontraron niveles detectables de la enzima en el medio del cultivo bacteriano (Beaman, 1983). Esto sugiere que la catalasa se encuentra a nivel intracelular, y que la interacción con los anticuerpos se da cuando existe lisis bacteriana y esta enzima se encuentra expuesta. Probablemente en la preparación bacteriana utilizada en los ensayos bactericidas in vitro, la P61 quedó expuesta tras la lisis celular posterior a la disgregación mecánica de la masa bacteriana; lo que permitió que la catalasa se encontrara en solución y de esta manera los anticuerpos monoclonales pudiesen unirse a ella.

Los anticuerpos de mayor afinidad pueden ser más efectivos contra ciertos patógenos; sin embargo, la relación entre afinidad y eficacia protectora ha sido poco entendida para la mayoría de los patógenos; para *E. chaffensis*, la máxima afinidad se

correlaciona con la eficacia protectora; para la eficacia de anticuerpos contra *S. pneumoniae*, la avidéz es un parámetro importante. (Casadevall, 2003) Una posible explicación al mayor efecto bactericida encontrado en IgG monoclonal pudiese ser una mayor afinidad a P61 que IgM, permitiendo que, con bajas concentraciones de anticuerpos IgG anti-P61, se active rápidamente el complemento causando la lisis bacteriana; mientras que la IgM, a pesar de que su estructura le permita activar mejor el complemento que la IgG, pudiese ser que su afinidad por el antígeno fuese menor. Para llegar a comprobar esta teoría, sería necesario realizar experimentos de velocidad de reacción entre antígeno y anticuerpo, y de esta manera comparar la afinidad de ambos anticuerpos al antígeno.

En general, el cambio de isotipo de anticuerpos monoclonales, en hibridomas en cultivo es muy esporádico. La mayoría de los cambios de isotipo reportados ocurren de IgG1 a IgG2b o IgG3 (Spira, 1994). Otra posibilidad para comparar anticuerpos monoclonales de la misma especificidad sería inducir el cambio de isotipo de IgM a IgG en hibridomas en cultivo *in vitro* (Faguet, 1993)

Estudios realizados *in vivo* para investigar el papel protector de los anticuerpos monoclonales han concluido que la administración de cantidades insuficientes de anticuerpos puede ocasionar una falta de la eficacia protectora. (Brady, 2005)

Las dosis reportadas en estudios donde investigan la protección mediada por anticuerpos monoclonales *in vivo*, varían desde dosis bajas de 10 pg (Ramírez, 2002) a dosis altas de anticuerpos monoclonales de 1 mg (Edelson, 1999). Los ensayos de infección experimental *in vivo* realizados en este proyecto, tuvieron como objetivo principal fue determinar el efecto protector de la IgM monoclonal contra la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*. Se trató de estandarizar la dosis administrada,

que fuese capaz de conferir protección. En el primer ensayo se administraron 3 dosis alternadas de una concentración de 100 pg cada una de anticuerpo monoclonal IgM anti-P61 por dos vías diferentes.

El grupo de ratones que recibió 3 dosis por vía intraperitoneal no desarrolló micetoma; los anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 brindaron protección total contra la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*. El grupo de ratones que recibió 3 dosis de IgM monoclonal por vía subcutánea desarrollaron inflamación en cojinete plantar, pero no presentaron el volumen de inflamación observado por el grupo control negativo, en los cuales se estableció el micetoma. Es decir, la administración de tres dosis de anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 por vía subcutánea protegió parcialmente contra el establecimiento del micetoma al día 60 posterior a la infección experimental por *N. brasiliensis*. La administración de los anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 por vía intraperitoneal brindó mejores resultados protectores que la administración por vía subcutánea.

Una posible explicación a la diferencia encontrada en la vía de administración puede ser la absorción de un anticuerpo monoclonal desde el espacio intersticial a la circulación sistémica. Esta absorción ocurre a través de la vía linfática. La degradación proteolítica pre-sistémica puede ser una variable de la biodisponibilidad posterior a la administración extravascular. Por lo general, al aumentar la dosis de anticuerpos monoclonales, aumenta la biodisponibilidad absoluta, debido a una capacidad proteolítica saturada a dosis mayores. El proceso de absorción es muy lento a medida que la linfa drena hacia el sistema vascular; la duración de la absorción puede ocurrir en horas o varios días. La biodisponibilidad de los anticuerpos posterior a la administración subcutánea puede variar de un 50% al 100%. (Mascelli, 2007).

Debido a que la preparación de anticuerpos monoclonales utilizada en estos ensayos contenía bajas concentraciones de suero bovino fetal y, este suero puede contener anticuerpos no-específicos que pudieran actuar en la protección de manera inespecífica; se utilizó un grupo control al cual se le administró sobrenadante de cultivo de células de mieloma, conteniendo la misma concentración de suero bovino fetal que el contenido en las preparaciones de los anticuerpos monoclonales. La presencia de anticuerpos bovinos en el suero bovino fetal no confirió protección contra la infección experimental; este grupo tuvo un comportamiento muy similar al grupo control negativo en el establecimiento del micetoma.

Además de la cantidad de anticuerpo y su vía de administración, existen otras variables relacionadas con las inmunoglobulinas que tienen gran importancia en su eficacia protectora, como son la especificidad del anticuerpo, el isotipo, y el idiotipo. (Casadevall, 2003) (Brady, 2005). Las funciones efectoras de los anticuerpos pueden diferir dependiendo de su isotipo; la eficacia de la transferencia pasiva de *C. neoformans* y *E. chaffensis* depende del isotipo del anticuerpo. (Casadevall, 2003) En el caso de *C. albicans*, dependiendo del isotipo de anticuerpo monoclonal, los resultados variaron de ser protectores, a no-protectores, o incluso a potenciadores de la enfermedad, con niveles mayores de anticuerpos asociados a un peor pronóstico. (Han, 1997).

En el segundo ensayo realizado en este proyecto doctoral, se comparó la acción protectora entre la IgM monoclonal, a una dosis menor de 100 pg por vía intraperitoneal, y la IgG monoclonal dirigida contra el mismo antígeno, misma dosis y vía de administración. El grupo de ratones que recibió la IgG monoclonal desarrolló el micetoma con una inflamación similar, y en algunos sujetos mayor, a lo observado en

el grupo control negativo. Mientras que el grupo que recibió la IgM monoclonal, presentó inflamación, no se estableció completamente el micetoma al día 60 posterior a la infección, de la misma manera que se comportó el grupo control positivo. Es decir, la IgG monoclonal a la dosis empleada careció de efecto protector en el establecimiento de la infección experimental.

Con estos experimentos fue posible comprobar la hipótesis planteada en este proyecto doctoral; los anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 son capaces de conferir protección contra la infección experimental por *Nocardia brasiliensis*, mientras que los anticuerpos monoclonales IgG dirigidos contra el mismo antígeno no inducen protección.

Los hallazgos encontrados en este proyecto doctoral, apoyan el concepto de que la IgM específica de antígeno, secretada en los primeros días posteriores a la infección, juega un papel importante en la protección contra *Nocardia brasiliensis*. El hecho de que la IgG no haya presentado efecto protector pudiese sugerir que en realidad carecen de tal efecto; sin embargo, se requiere de la realización de otros estudios para poder llegar a esa conclusión, ya que es necesario dilucidar si ambos anticuerpos utilizados en este proyecto van dirigidos contra los mismos epítopes; puesto que, se ha reportado que existe diferencia protectora entre anticuerpos del mismo isotipo dirigidos contra diferentes epítopes, así como también anticuerpos de diferentes isotipos pero dirigidos contra el mismo epítope pueden presentar el mismo efecto protector. (Han, 1999)

De acuerdo a los resultados encontrados, el efecto protector mediado por la IgM monoclonal anti-P61 no es mediante el bloqueo de la actividad enzimática de P61, así como no es enteramente debido a la activación de la cascada del complemento por

la vía clásica. A la fecha se desconocen receptores p en las superficies de fagocitos y otras células del sistema inmune, por medio de los cuales los anticuerpos IgM pudieran realizar su efecto protector.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

1. Los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 son capaces de reconocer a la catalasa de *N. brasiliensis*, pero no bloquean su actividad enzimática.
2. Los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 mostraron efecto bactericida in vitro contra *N. brasiliensis*.
3. El efecto bactericida in vitro de los anticuerpos monoclonales IgG anti-P61 contra *N. brasiliensis* fue mayor al mostrado por los anticuerpos monoclonales IgM anti-P61.
4. La administración intraperitoneal de tres dosis consecutivas de anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 confirió protección total contra el establecimiento de la infección experimental por *N. brasiliensis*.

5. La administración intraperitoneal de una sola dosis de anticuerpos monoclonales IgM anti-P61 disminuyó la inflamación en el establecimiento del micetoma, confiriendo protección parcial.
6. La administración intraperitoneal de una sola dosis de anticuerpos monoclonales IgG anti-P61 no confirió protección contra el establecimiento de la infección experimental por *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

1. Realizar ensayos terapéuticos con la administración pasiva de anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 en ratones con micetoma establecido.
2. Analizar los epítopes de los anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-P61 para comprobar si tienen especificidad idéntica.
3. Si la especificidad fuese diferente; inducir el cambio de isotipo de IgM a IgG, en los hibridomas productores de IgM anti-P61, para obtener anticuerpos monoclonales de diferente isotipo e idéntica especificidad y con ellos realizar otros ensayos de protección en el establecimiento del micetoma en la infección experimental por *N. brasiliensis*.

REFERENCIAS

- Abbas, A.H., Lichtman, A.K. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. Saunders. (2003).
- Adamus, G., Zam, Z.S., Emerson, S.S., Hargrave, P.A. A practical method for rescuing desired hybridomas during monoclonal antibody production. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 25: 1141-1146. (1989).
- Beaman, B. L., Beaman, L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:213-264. (1994).
- Beaman, B.L. Scates, S.M., Moring, S.E., Deem, R., Misra, H.P. Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. *J. Biol. Chem.* 258: 91-96. (1983).
- Beaman, B.L., Black, C.M., Doughty, F., Beaman, L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 47: 135-141. (1985).
- Beaman, B.L., Gershwin, M.E., Ahmed, A., Scate, S.M., Deem, R. Response of CBA/N X DBA2/F-I mice to *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* 35: 111-116. (1982).
- Beaman, B.L., Moring, S.E. Relationship among cell wall composition, stage of growth, and virulence of *Nocardia asteroides* GUH-2. *Infect. Immun.* 56: 557-563. (1988).
- Beaman, L., Beaman, B.L. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect. Immun.* 58: 3122-3128. (1990).
- Beers, R.F., Sizer, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 157:133-139. (1951).
- Black, C. M., Paliescheskey, M., Beaman, B.L., Donovan, R.M., Goldstein, E. Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockages by *Nocardia asteroides*. *J. Infect. Dis.* 154:952-958.(1986).

REFERENCIAS

- Abbas, A.H., Lichtman, A.K. Cellular and Molecular Immunology. Fifth Edition. Saunders. (2003).
- Adamus, G., Zam, Z.S., Emerson, S.S., Hargrave, P.A. A practical method for rescuing desired hybridomas during monoclonal antibody production. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 25: 1141-1146. (1989).
- Beaman, B. L., Beaman, L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:213-264. (1994).
- Beaman, B.L. Scates, S.M., Moring, S.E., Deem, R., Misra, H.P. Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. *J. Biol. Chem.* 258: 91-96. (1983).
- Beaman, B.L., Black, C.M., Doughty, F., Beaman, L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 47: 135-141. (1985).
- Beaman, B.L., Gershwin, M.E., Ahmed, A., Scate, S.M., Deem, R. Response of CBA/N X DBA2/F₁ mice to *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* 35: 111-116. (1982).
- Beaman, B.L., Moring, S.E. Relationship among cell wall composition, stage of growth, and virulence of *Nocardia asteroides* GUH-2. *Infect. Immun.* 56: 557-563. (1988).
- Beaman, L., Beaman, B.L. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect. Immun.* 58: 3122-3128. (1990).
- Beers, R.F., Sizer, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 157:133-139. (1951).
- Black, C. M., Paliescheskey, M., Beaman, B.L., Donovan, R.M., Goldstein, E. Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockages by *Nocardia asteroides*. *J. Infect. Dis.* 154:952-958.(1986).

- Boes, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 37: 1141-1149. (2000).
- Boiron, P., Stynen, D., Belkacem, G., Goris, A., Provost, F. Monoclonal antibodies to a specific 54-kilodalton antigen of *Nocardia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1033-1035. (1992).
- Bowden, R.A., Esteln, S.M., Zygmunt, M.S., Dubray, G., Cloeckert, A. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microb. Infect.* 2: 481-488. (2000).
- Brady, L.J. Antibody-mediated immunomodulation: a strategy to improve host responses against microbial antigens. *Infect. Immun.* 73: 671-678. (2005).
- Cadieux, N., Plante, M., Rioux, C.R., Hamel, J., Brodeur, B.R., Martin, D. Bactericidal and cross-protective activities of a monoclonal antibody directed against *Neisseria meningitidis* NspA outer membrane protein. *Infect. Immun.* 67: 4955-4959. (1999).
- Casadevall, A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect. Immun.* 71:4225-4228. (2003).
- Casadevall, A. The methodology for determining the efficacy of antibody-mediated immunity. *J. Immunol. Meth.* 291:1-10. (2004).
- Cohén, G., Dembiec, D., Marcus, J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 34:30-38. (1970).
- Conde, C., Mancilla, R., Fresan, M., Ortiz- Ortiz, I. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immun.* 40: 1218-1222. (1983).
- Davis-Scibienski, C., Beaman, B.L. Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages: association of virulence, viability, ultrastructural damage, and phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 28: 610-619. (1980).
- de Vallière, S., Abate, G., Blazevic, A., Pleuertz, R.M., Hoft, D.F. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect. Immun.* 73:6711-20. (2005).

- Deem, R. L., Doughty, F. A., Beaman, B. L. Immunologically specific direct T lymphocyte-mediated killing of *Nocardia asteroides*. *J. Immunol.* 130:2401-2406.(1983).
- Deem, R.L., Beaman, B. L., Gershwin, M. E. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infect. Immun.* 38: 914-920. (1982).
- Dromer, F., Charreire, J., Contrepois, A., Carbón, C., Yeni, P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-C/ypfococc ζ vs *neoformans* monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 55:749-52. (1987).
- Edelson, B.T., Cossart, P., Unanue, E.R. Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J Immunol.* 163:4087-90. (1999).
- Edelson, B.T., Unanue, E.R. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity.* 14:503-12. (2001).
- Elkins, K.L., Bosio, C.M., Rhinehart-Jones, T.R. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Franciseiia tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* 67: 6002-6007. (1999).
- Elkins, K.L., Macintyre, A.T., Rhinehart-Jones, T.R. Nonspecific early protective immunity in *Franciseiia* and *Listeria* infections can be dependent on lymphocytes. *Infect. Immun.* 66: 3467-3469. (1998).
- Elzer, P.H., Jacobson, R.H., Jones, S.M., Nielsen, K.FI., Douglas, J.T., Winter, A.J. Antibody-mediated protection against *Brucella abortus* in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19. *Immunology.* 82: 651-658. (1994).
- Faguet, G.B., Agee, J.F. A simple technique for the rapid enrichment of class and subclass hybridoma switch variants: a 1000- fold enrichment in half the time, for half the cost. *J. Immunol. Methods* 165: 217-224 (1993).
- Fedoroff, S. Richardson, A. Protocols for neural cell culture. Humana Press, EUA, pg. 318-320. (2001).
- Folb, P.I., Jaffe, R., Altmann, G. *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infections in mice. *Infect. Immun.* 13: 1490-1496. (1976).

- Gardner, A. R., Eiteman, M. A. Determination of monoclonal antibody concentration in cell culture by capture ELISA. *Biotech. Tech.* 3:401-406. (1989).
- Gebel, H.M., Scott J.R., Parvin, C.A., Rodey, G.E. In vitro immunization to KLH. II. Limiting dilution analysis of antigen-reactive cells in primary and secondary culture. *J. Immunol.* 130: 29-32. (1983).
- Glover, H., Glover, D.M., Hames, B.D. *DNA Cloning*. Oxford University Press, EUA, pg. 53-54. (1995).
- Goel, V.K., Kapil, A. Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC Microbiol.* 1: 16 (2001).
- Gourley, T.S., Wherry, E.J., Masopust, D., Ahmed, R. Generation and maintenance of immunological memory. *Sem. Immunol.* 16: 323-333. (2004).
- Granoff, D.M., Bartoloni, A., Ricci, S., Gallo, E., Rosa, D., Ravenscroft, N., Guarnieri, V., Seid, R.C., Shan, A., Usinger, W.R., Tan, S., McHugh, Y.E., Moe, G.R. Meningococcal B polysaccharide epitopes that do not cross-react with human polysialic acid. *J. immunol.* 160: 5028-5036. (1998).
- Han, Y., Kozel, T.R., Zhang, M.X., MacGill, R.S., Carroll, M.C., Cutler, J.E. Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* 167:1550-7. (2001).
- Han, Y., Riesselman, M.H., Cutler, J.E. Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannose as an IgM protective antibody. *Infect Immun.* 68:1649-54. (2000).
- Han, Y., Kanbe, T., Cherniak, R., Cutler, J.E. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* 65: 4100-4107. (1997).
- Hauser, H., Wagner, R. *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*. Walter de Gruyter Ed., EUA, pg. 425 (1997).
- Hay, R. I., Mahgoub, E.S., Lean, G. Mycetoma. *J. Med Vet Mycol.* 1:41-49. (1992)

Howard, G.C., Bethell, D.R. Basic Methods in Antibody Production and Characterization. CRC Press, EUA. (2000).

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

Jin, L. H., Kim, D.W., Eum, W.S., Yoon, C.S., Jang, S.H., Choi, H.S., Choi, S.H., Kim, Y.H., Kim, S.Y., Jung, M.R., Kang, T.C., Won, M.H., Lee, H.Y., Kang, J.H., Kwon, O.S., Cho, S.W., Lee, K.S., Park, J., Choi, S.Y. Human liver catalase: cloning, expression and characterization of monoclonal antibodies. Mol. Cells. 15:381-386. (2003).

Joiner, K.A., Scales, R., Warren, K.A., Frank, M.M., Rice, P.A. Mechanism of action of blocking immunoglobulin G for *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Investig. 76: 1765-1772. (1985).

Kaufmann, S. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. Tuberculosis. 83: 107-111. (2003).

Kaufmann, SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. Nat. Rev. Immunol. 1: 20-30. (2001).

Klein, D.L. From *Pertussis* to Tuberculosis: what can be learned?. Clin. Infect. Dis. 30(Suplem. 3): S302-S308. (2000).

Köhler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497. (1975).

Lazzarotto, T., Varani, S., Spezzacatena, P., Pradelli, P., Potena, L., Lombardi, A., Ghisetti, V., Gabrielli, L., Abate, D.A., Magelli, C., Landini, M.P. Delayed acquisition of high-avidity anti-Cytomegalovirus antibody is correlated with prolonged antigenemia in solid organ transplant recipients. J. Infect. Dis. 178: 1145-1149. (1998).

Li, J.S., Chu, F., Reilly, A., Winslow, G.M. Antibodies highly effective in SCID mice during infection by the intracellular bacterium *Ehrlichia chaffeensis* are of picomolar affinity and exhibit preferential epitope and isotype utilization. J. Immunol. 169:1419-25. (2002).

Licón-Trillo, A., Castro-Corona, M.A., Salinas-Carmona, M.C. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 37: 37-44. (2003).

- Lidell, J.E., Cryer, A. A practical guide to monoclonal antibodies. Wiley_Default. EUA. (1991).
- López Martínez, R., Mendez Tovar, L.J., Lavalle, P. Epidemiology of mycetoma in México. Gac. Med. Mex. 128:477-481. (1992).
- Mackaness, G.B. Cellular resistance to infection. J. Exp. Med. 110: 381-406 (1962).
- Mandell, G.L. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. J. Clin. Invest. 55: 561-566. (1975).
- Marquis, C.P., Harbour, C., Barford, J.P., Low, K.S. A comparison of different culture methods for hybridoma propagation and monoclonal antibody production. Cytotechnology. 4: 69-76. (1990).
- Mascelli, M.A., Zhou, H., Sweet, R., Getsy, J., Davis, H.M., Graham, M., Abernethy, D. Molecular, biologic, and pharmacokinetic properties of monoclonal antibodies: Impact of these parameters on early clinical development. J. Clin. Pharm. doi: 10.1177/0091270006298360. (2007)
- McGill, M.W., Rowan, A.N. Refinement of Monoclonal Antibody Production and Animal Well-Being. ILAR News. 31:1-10. (1989).
- McNeil, M.M., Brown, J.M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 7: 357-417. (1994).
- Medina-Villanueva, I.I. Papel de la superóxido dismutasa en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*. Tesis doctoral. (2008).
- Montaraz, J.A., Winter, A.J. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. Infect Immun. 53:245-51 (1986).
- Murphy, T.F., Bartos, L.C. Purification and analysis with monoclonal antibodies of P2, the major outer membrane protein of nontypable *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. 56: 1084-1089. (1988).
- Ortiz-Ortiz, L., Parks, D.E., López, J.S., Weigle, W.O. B-lymphocyte activation with an extract of *Nocardia brasiliensis*. Infect. Immun. 25: 627-634. (1979).

Salinas-Carmona, M.C. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microb. Infect.* 2: 1373-1381. (2000).

Salinas-Carmona, M.C., Castro-Corona, M.A., Sepúlveda-Saavedra, J., Pérez, L.I. Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4: 133-137. (1997).

Salinas-Carmona, M.C., Pérez-Rivera, I. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immun.* 72:5597-5604. (2004).

Salinas-Carmona, M.C., Pérez-Rivera, L.I., Torres-López, E. Isolation and purification of the immunodominant antigen P61 from *Nocardia brasiliensis* culture filtrate. *J. Mycol. Med.* 13: 117-121. (2003).

Salinas-Carmona, M.C., Ramos, A.I., Pérez-Rivera, I. Immunogenicity is unrelated to protective immunity when induced by soluble and particulate antigens from *Nocardia brasiliensis* in BALB/c mice. *Microb. Infect.* 8: 2531-2538. (2006).

Salinas-Carmona, M.C., Torres-López, E., Ramos, A.I., Licón-Trillo, A., González-Spencer, D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 67: 2428- 2432. (1999).

Salinas-Carmona, M.C., Vera, L., Welsh, O. Rodríguez, M. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl. Bakt.* 276: 390-397. (1992).

Santos, G.F., Deck, R.R., Donnelly, J., Blackwelder, W., Granoff, D.M. Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8: 616-623. (2001).

Serrano, J.A., Sandoval, H.A., Beaman, B.L. Actinomicetoma. Plaza y Valdez Editores, México. (2007).

Shahin, R.D., Hamel, J., Leef, M.F., Brodeur, B.R. Analysis of protective and nonprotective monoclonal antibodies specific for *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide. *Infect Immun.* 62:722-5. (1994).

Shepherd, P., Dean, C.J. Monoclonal Antibodies: A practical approach. Oxford University Press. EUA. (2000).

- Spira, G., Gregor, P., Aguila, H.L., Scharff, M.D. Clonal variants of hybridoma cells that switch isotype at a high frequency. PNAS. 91: 3423-3427. (1994).
- Sykes, A.G., Mauk, G. Enzymology and structure of catalase. Advances in inorganic chemistry. Vol.51. p.52-103. Elsevier. EUA. (2001).
- Taborda, C.P., Casadevall, A. Immunoglobulin M efficacy against *Cryptococcus neoformans*: mechanism, dose dependence, and prozone-like effects in passive protection experiments. J. Immunol. 166: 2100-2107. (2001).
- Taborda, C.P., Rivera, J., Zaragoza, O., Casadevall, A. More is not necessarily better: prozone-like effects in passive immunization with IgG. J Immunol. 170: 3621-3630. (2003).
- Tadjine, M., Mittal, K.R., Bourdon, S., Gottschalk, M. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. Microbiol. 150: 3935-3945. (2004).
- Taswell, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. J. Immunol. 126: 1614-1619. (1981).
- Teitelbaum, R., Glatman-Freedman, A., Chen, B., Robbins, J.B., Unanue, E., Casadevall, A., Bloom, B.R. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 15688-15693. (1998).
- Tomita, G.M., Wnag, Y., Paape, M.J., Poultriel, B., Rainard, P. Influence of biospecific antibodies on the in vitro bactericidal activity of bovine neutrophils against *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 83: 2269-2275. (2000).
- Treanor, J., Dolin, R., Madore, H.P. Production of a monoclonal antibody against the Snow Mountain agent of gastroenteritis by in vitro immunization of murine spleen cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 3613-3617. (1988).
- Uppington, H., Menager, N., Boross, P., Wood, J., Sheppard, M., Verbeek, S., Mastroeni, P. Effect of immune serum and role of individual Fe gamma receptors on the intracellular distribution and survival of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in murine macrophages. Immunology. 119:147-58. (2006).

Van Eldik, L.J., Ehrenfried, B., Jensen, R.A. Production and characterization of monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide of brain S100 fractions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6034-6038. (1984).

Van Ness, J., Laemmli, U.K., Pettijohn D.E. Immunization in vitro and production of monoclonal antibodies specific to insoluble and weakly immunogenic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 7897-7901. (1984).

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K.F., van Sinderen, D. Genomics of *Actinobacteria* Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:495-548. (2007).

Vera-Cabrera, L., Salinas-Carmona, M.C., Welsh, O., Rodríguez, M.A. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1183-1188. (1992).

Vera-Cabrera, L., Johnson, W.M., Welsh, O., Resendiz-Uresti, F.L., Salinas-Carmona, M.C. Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the Genera *Nocardia*, *Gordona*, and *Rhodococcus*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1971-1976. (1999).

Walker, J.M. The protein protocols handbook. Second Edition. Humana Press. EUA. (2002).

Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Salinas-Carmona, M.C. Mycetoma. *Clin. in Dermatol.* 25: 195-202. (2007).

Winslow, G.M., Yager, E., Shilo, K., Volk, E., Reilly, A., Chu, F.K. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. *Infect. Immun.* 38: 2187-2195. (2000).

Wohlleben, G., Gray, D., Schimpl, A. In vitro immunization of naive mouse B cells: establishment of IgM secreting hybridomas specific for soluble protein or hapten from B cells cultured on CD40 ligand transfected mouse fibroblasts. *Int. Immunol.* 8: 343-349. (1996).

Yokoyama, W.M. Monoclonal Antibody Supernatant and Ascites Fluid Production. Current Protocols in Immunology. Unit 2.6 : 2.6.1-2.6.5. (2000).

- Zhaohua,L., Roche, M.I., Hui, J.H., Unal, B., Felgner, P.L., Gulati, S., Madico, G., Sharon,J. Generation and characterization of hybridoma antibodies for immunotherapy oftularemia. *Immunol. Lett.* 112: 92-103. (2007).
- Zollinger, W.D., Mandrell, R.E. Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide. *Infect. Immun.* 40: 257-264. (1983).

- Zhaohua,L., Roche, M.I., Hui, J.H., Unal, B., Felgner, P.L., Gulati, S., Madico, G., Sharon.J. Generation and characterization of hybridoma antibodies for immunotherapy of tularaemia. *Immunol. Lett.* 112: 92-103. (2007).
- Zollinger, W.D., Mandrell, R.E. Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide. *Infect. Immun.* 40: 257-264. (1983).