

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**IZTACALA**



**CARACTERIZACION DE LA PROTEASA DE  
IgA<sub>1</sub> DE P. aeruginosa**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**OFELIA VELASCO CASTAÑEDA**

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1990

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio y bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Esta tesis está dedicada:

A MIS PADRES

Por su sacrificio, por su apoyo y por  
su cariño ya que gracias a ellos he  
llegado a ser lo que soy.

A MIS TIOS:

GLORIA Y JAVIER

Por el cariño, respeto y admiración que siento hacia ellos y porque han sido un gran apoyo y estímulo en mi carrera.

A MIS HERMANOS:

LUIS FELIPE Y AGUSTIN

Con mucho cariño y por haberme soportado durante todos estos años.

A MIS PRIMOS:

LORENA, MYRIAM, PACO,  
YUVIA, CHIO, ROCY,  
JAVIS Y CARLITOS.

A FRANCISCO:

Con todo mi amor por su cariño  
por su apoyo, por su paciencia  
y porque estuvo presente en cada  
instante y en cada uno de los  
pasos que dí para realizar este  
trabajo.

Gracias por ser algo de lo más  
bonito que me ha sucedido en la  
vida.

A MIS TIOS:

WENDY, ESTELA, IRMA, RAMIRO,  
CASIMIRO, RAFAEL, PEPE,  
AMERICA Y PABLO.

A MIS ABUELOS:  
SANTOS Y HOMERO

A MIS AMIGOS:

Por su apoyo, por su cariño y  
por hacer mi vida tan agradable.

AL DR. RUBEN LOPEZ REVILLA:

Por su excelente dirección,  
y por el cariño y respeto  
que siento hacia él ya que  
ha sido el responsable de  
mi formación profesional.

A todos los que a lo largo de mi  
camino han creído en mi.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS, xiii  
LISTA DE FIGURAS, xv  
LISTA DE ABREVIATURAS, xvii  
RESUMEN, xix

### I. INTRODUCCION

- A. Sistema inmune secretor, 1
- B. Inmunoglobulina A, 2
  - 1. Estructura, 2
  - 2. Funciones de la IgA, 4
    - a. Inhibición de la adhesión bacteriana, 4
    - b. Neutralización viral, 5
    - c. Exclusión de antígenos solubles y particulados, 5
  - 3. Características biológicas y químicas de la sIgA, 5
- C. Proteasas de inmunoglobulinas, 6
- D. Proteasas específicas de IgA, 7
- E. Pseudomonas, 9
  - 1. Características generales, 9
  - 2. Pseudomonas aeruginosa, 10
    - a. Hábitat, 10
    - b. Patogenicidad, 11
- F. Antecedentes directos del trabajo, 11

### II. OBJETIVOS

- A. Generales, 15
- B. Particulares, 15

### III. MATERIALES

- A. Origen de los reactivos, 16
- B. Origen del material biológico, 17
- C. Composición y preparación de soluciones, reactivos y medios de cultivo, 17
  - 1. Preparación de los geles de agarosa, 17
    - Solución A. CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, 17
    - Solución B. Trizma base 1 M, 18
    - Solución C. Tris-HCl 15 mM pH 8.6, 18
    - Solución D. Tris-HCl 15 mM/CaCl<sub>2</sub> 18 mM pH 8.6, 18
    - Agarosa al 1.5% en Tris-HCl 15 mM pH 8.6, 18
    - Agarosa al 1.5% en Tris-HCl 15 mM pH 8.6/CaCl<sub>2</sub>, 18
    - Azul de Coomassie al 0.5%, 19
  - 2. Reactivos para la cuantificación de proteínas, 19
    - Reactivo de Bradford, 19
  - 3. Amortiguadores y soluciones para la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, 19
    - a. Soluciones para preparar los geles y las corridas electroforéticas, 19
      - Solución A. Acrilamida-Bis, 20

- Solución B. Tris-HCl 3 M pH 8.8-9.0, 20
- Solución C. Tris-HCl 0.49 M pH 8.6, 20
- Solución D. SDS al 10%, 20
- Solución E. TEMED, 20
- Solución F. Persulfato de amonio al 10%, 21
- Solución G. Amortiguador de corrida 10X, 21
- b. Soluciones para disolver las muestras y teñir los geles, 21
- Azul de bromofenol al 0.2%, 21
- Amortiguador de muestras 2X, 22
- Colorante de Fairbanks, 22
- Solución desteñidora rápida, 22
- Acido acético al 7.5%, 22
- c. Soluciones de uso general, 22
- Glicerol al 50%, 23
- EDTA 0.2 M pH 8, 23
- Agar al 1%, 23
4. Soluciones para activación y equilibrio de la DEAE celulosa (DEAE-c)
- a. Soluciones madre, 23
- Fosfato de potasio dibásico 1 M, 23
- Fosfato de potasio monobásico 1 M, 24
- b. Soluciones de trabajo
- HCl 0.5 M, 24
- NaOH 0.5 M, 24
5. Amortiguadores para probar el efecto del pH y la concentración de sal sobre la unión de la IgA a la DEAE-c
- a. Preparación de soluciones de diferente pH, 24
- b. Preparación de soluciones con diferente concentración de sal, 24
6. Amortiguadores y reactivos para la cromatografía en DEAE-c, 24
- Solución saturada de sulfato de amonio, 27
7. Solución salina amortiguada con fosfatos 10 mM pH 7.2, 27
8. Agar de soya-tripticaseína para el cultivo de *P. aeruginosa*, 27
9. Amortiguadores para inmunoelectroforesis, 27
- Tris-HCl 15 mM pH 8.0, 27
- Tris-HCl 15 mM pH 8.6, 29
- Tris-HCl 15 mM/CaCl<sub>2</sub> 18 mM pH 8.6, 29
10. Soluciones y reactivos para el ensayo de la actividad proteolítica
- Caseína al 10%, 29
- Agar bacteriológico al 2.4%, 29
- Tris-HCl 50 mM pH 8.0, 29
- Mezcla de activadores 2X, 30
- Papaína 2 y 4 mg/ml, 30
- Mezcla para activación de papaína, 30

Caldo nutritivo, 30

Fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) 100 mM, 30

#### IV. METODOS

##### A. Obtención y preparación del material biológico

1. Suero humano normal, 31

2. Saliva humana total, 31

3. Jacalina, 31

##### B. Preparación de los geles de agarosa

1. Recubrimiento de portaobjetos con agarosa, 31

2. Perforación de los geles de agarosa, 32

3. Lavado de los geles de agarosa, 32

4. Tinción de los geles de agarosa, 32

##### C. Precipitación con jacalina en geles de agarosa, 33

##### D. Determinación de proteínas con el método de Bradford, 33

##### E. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, 34

1. Formación del gel separador (inferior), 34

2. Formación del gel concentrador (superior), 35

3. Preparación de las cámaras electroforéticas, 35

4. Preparación de las muestras, 37

5. Corrida electroforética, 37

6. Tinción de los geles, 38

7. Secado de los geles, 38

8. Regeneración de las soluciones con carbón activado, 39

##### F. Obtención de la fracción de inmunoglobulinas del suero de mieloma, 39

1. Precipitación con sulfato de amonio saturado al 50%, 39

2. Diálisis de la fracción precipitada, 40

3. Cuantificación de proteínas de la fracción precipitada, 40

##### G. Prueba de la unión de la fracción de inmunoglobulinas a la DEAE-c,

1. Lavado, activación y equilibrio de la resina, 40

2. Condiciones de unión de la IgA a la DEAE-c, 41

a. Efecto del pH, 41

b. Efecto de la concentración de NaCl, 41

c. Efecto de la cantidad de proteína, 42

##### H. Purificación de la IgA del suero de mieloma

1. Preparación de la cromatografía en columna de DEAE-c

a. Empacado de la columna y equilibrio de la resina, 43

b. Dispositivo de la cromatografía, 43

2. Cromatografía en DEAE-c, 44

a. Aplicación de la muestra, 44

b. Condiciones de la cromatografía, 44

c. Preservación de la resina, 46

3. Análisis de las fracciones cromatográficas, 40
  - a. Reunión, diálisis y concentración de las fracciones
  - b. Inmunodifusión radial, 40
- I. Cultivo de Pseudomonas aeruginosa, 47
- J. Concentración de los antisueros anti-IgA, 47
  1. Precipitación con sulfato de amonio, 47
    - a. Obtención del precipitado, 47
    - b. Diálisis, 48
    - c. Cuantificación de proteínas, 48
  2. Titulación de los antisueros concentrados, 48
- K. Efecto de la incubación de IgA<sub>1</sub> y sIgA con P. aeruginosa PAφ1, 49
  1. Incubación, 49
  2. Inmunolectroforesis, 49
    - a. Electroforesis, 49
    - b. Incubación con antisueros, 50
    - c. Observación de los arcos de precipitación, 50
    - d. Tinción y secado de los geles, 50
- L. Patrón electroforético de cantidades variables de IgA incubada, 50
  1. Incubación, 50
  2. Análisis de las fracciones en PAGE-SDS, 51
  3. Inmunolectroforesis, 51
- M. Cinética de la fragmentación de la IgA por la incubación con P. aeruginosa, 53
- N. Actividad de la proteasa extracelular principal de P. aeruginosa, 53
  1. Ensayo de la actividad proteolítica de papaína, 53
    - a. Prueba de concentraciones variables de agar y caseína para ensayo proteolítico en placa, 53
    - b. Preparación de placas de agar 1.2%-caseína 1%, 56
    - c. Ensayo proteolítico, 56
    - d. Observación y medida de los halos, 59
  2. Actividad de la proteasa de P. aeruginosa, 59
    - a. Cultivo de P. aeruginosa, 59
    - b. Separación de bacterias y medios de cultivo, 59
    - c. Ensayo proteolítico, 59
- O. Obtención de la proteasa de IgA
  1. Actividad proteolítica en el medio de cultivo usado por P. aeruginosa, 61
  2. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio del medio de cultivo usado por P. aeruginosa, 61
  3. Obtención de la fracción P<sub>20-40</sub> enriquecida en actividad proteolítica, 63

- a. Enriquecimiento de la actividad proteolítica principal, 63
- b. Lisis del paquete bacteriano, 63
- c. Análisis de las fracciones obtenidas y de las bacterias lisadas, 65
- 4. Tratamiento de lisados de *P. aeruginosa* con PMSF, 65
- 5. Efecto de cantidades variables de la fracción P<sub>1</sub> y del tiempo de incubación sobre la fragmentación de IgA, 67

## V. RESULTADOS

- A. Montaje del método de precipitación con jacalina
  - 1. Experimento preliminar, 69
  - 2. Concentración mínima de jacalina, 70
  - 3. Precipitación de diversas muestras con jacalina, 72
  - 4. Precipitación "espontánea" del suero de mieloma, 72
  - 5. Efecto de la diálisis sobre la precipitación espontánea del suero de mieloma, 75
- B. Proteínas presentes en el precipitado y en el sobrenadante del suero de mieloma dializado, 77
- C. Determinación de la capacidad de la DEAE-c para unir las inmunoglobulinas obtenidas a partir del suero de mieloma
  - 1. Contenido y patrón electroforético de las proteínas del suero, 77
  - 2. Obtención de la fracción de inmunoglobulinas del suero de mieloma, 79
    - a. Precipitación de IgA con sulfato de amonio, 79
  - 3. Condiciones de unión de la IgA<sub>1</sub>, 80
    - a. Efecto del pH, 80
    - b. Efecto de la cantidad de proteínas de la fracción de inmunoglobulinas sobre la unión a la DEAE-c, 80
      - Ensayo preliminar, 80
    - c. Efecto de la concentración de NaCl, 85
    - d. Unión de la fracción de inmunoglobulinas a la DEAE-c, 85
- D. Purificación de la IgA de mieloma, 90
  - 1. Cromatografía en DEAE-c, 90
  - 2. Detección de IgA en los picos cromatográficos, 91
  - 3. Análisis de las proteínas de cada pico, 91
- E. Efecto de la incubación con *P. aeruginosa* PA01 sobre el patrón inmunoelectroforético de la sIgA y de la IgA<sub>1</sub>
  - 1. Ensayos preliminares, 98
    - a. Selección de los antisueros anti-IgA de mayor título, 98
    - b. Concentración de las inmunoglobulinas de los antisueros, 98
    - c. Efecto del calcio sobre el aspecto y nitidez de los arcos de inmunoprecipitación de sIgA e IgA<sub>1</sub>, 100

2. Inmunolectroforesis de sIgA e IgA<sub>1</sub> incubadas con P. aeruginosa, 102
- F. Patrón electroforético de cantidades variables de IgA incubada con P. aeruginosa, 102
- G. Cinética de la fragmentación de la IgA<sub>1</sub> por la incubación con P. aeruginosa, 104
- H. Actividad de la proteasa extracelular principal de P. aeruginosa, 105
  1. Ensayo de la actividad proteolítica de papaína
    - a. Efecto de concentraciones variables de agar y caseína, 108
    - b. Condiciones finales del ensayo, 108
  2. Actividad de la proteasa de P. aeruginosa, 114
- I. Obtención de la proteasa de IgA, 116
  1. Actividad proteolítica sobre IgA del medio de cultivo usado por P. aeruginosa, 116
  2. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio del medio de cultivo usado, 117
  3. Obtención de la fracción P<sub>30-40</sub> enriquecida en actividad proteolítica, 119
    - a. Enriquecimiento de la actividad proteolítica principal, 119
    - b. Patrón electroforético de lisados de P. aeruginosa, 119
    - c. Actividad proteolítica, proteínas principales y rendimiento de la fracción P<sub>30-40</sub>, 120
  4. Efecto de cantidades variables de la fracción P<sub>30-40</sub> y del tiempo de incubación sobre la fragmentación de IgA<sub>1</sub>, 129
- VI. DISCUSION, 133
- VII. CONCLUSIONES, 144
- VIII. REFERENCIAS, 146

## LISTA DE TABLAS

1. Preparación de soluciones de PBS 10 mM NaCl 38 mM con diferentes pH, 25
2. Preparación de soluciones de PB 10 mM pH 6 con diferente concentración de sal, 26
3. Preparación de los eluyentes para la cromatografía en DEAE-c, 28
4. Formación de los geles de poliacrilamida-SDS, 36
5. Diluciones de IgA<sub>1</sub>, 52
6. Prueba de concentraciones variables de agar para ensayo proteolítico en placa, 54
7. Prueba de diferentes concentraciones de caseína para ensayo proteolítico en placas de agar, 55
8. Diluciones de papaína activada para un ensayo proteolítico en placas de agar, 57
9. Diluciones de papaína activada para un ensayo proteolítico en placas de agar, 58
10. Diluciones del medio de cultivo usado por *P. aeruginosa* (PA $\phi$ 1) para ensayo proteolítico en placas de agar, 60
11. Precipitación con sulfato de amonio de la actividad proteolítica del medio usado por *P. aeruginosa*, 62
12. Precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> del medio de cultivo usado por *P. aeruginosa* PA $\phi$ 1, 64
13. Prueba de diferentes diluciones de PMSF 100 mM para determinar su efecto como inhibidor de la proteasa de *P. aeruginosa* PA $\phi$ 1 en geles de poliacrilamida-SDS, 66
14. Diluciones de la fracción P para determinar su efecto sobre la fragmentación de IgA, 68
15. Efecto del pH del eluyente sobre la capacidad de unión de IgA<sub>1</sub> por DEAE-c, 81
16. Efecto de la cantidad de IgA sobre su unión a DEAE-c eluida con PB 10 mM pH 6 y PBS 10 mM pH 6 NaCl 38 mM, 83

17. Unión de la IgA a DEAE-c en función de la concentración de NaCl, 86
18. Unión de proteínas de la fracción de inmunoglobulinas de un suero de mieloma de IgA a volúmenes variables de DEAE-c equilibrada con PB 10 mM pH 6, 88
19. Purificación de la IgA<sub>1</sub> de un suero de mieloma de IgA humano, 92
20. Rendimiento de la IgA<sub>1</sub> obtenida a partir de un mieloma humano por cromatografía en DEAE-c, 97
21. Cinética de degradación de IgA incubada con una colonia de *P. aeruginosa* PAØ1, 107<sup>1</sup>
22. Actividad proteolítica de papaína en agar/caseína con pozos de 3 mm (A = 706 mm<sup>2</sup>), 113
23. Relación de los valores (absolutos e inversos) entre los diámetros y áreas de los halos de proteólisis y las cantidades de caseína hidrolizada con la cantidad de papaína (en masa y unidades de actividad), 115
24. Contenido de proteínas en las fracciones obtenidas a partir del medio usado por *P. aeruginosa* PAØ1 mediante precipitación con sulfato de amonio, 122
25. Relación entre la cantidad de medio usado por *P. aeruginosa* PAØ1 y la proteólisis de caseína, 123
26. Relación entre la cantidad de la fracción sobrenadante (S<sub>30</sub>) tratada con sulfato de amonio al 30% y la proteólisis de caseína, 124
27. Relación entre la cantidad de la fracción P<sub>30</sub> tratada con sulfato de amonio al 30% y la proteólisis de caseína, 125
28. Relación entre la cantidad de la fracción (P<sub>30-40</sub>) tratada con sulfato de amonio al 40% y la proteólisis de caseína, 126
29. Relación entre la cantidad de la fracción sobrenadante (S<sub>30-40</sub>) tratada con sulfato de amonio al 40% y la proteólisis de caseína, 127
30. Actividad proteolítica y contenido de proteínas en el medio de cultivo usado por *P. aeruginosa* PAØ1 y en las fracciones S<sub>30</sub>, P<sub>30-40</sub>, S<sub>30-40</sub>, P<sub>30-40</sub> tratadas con sulfato de amonio, 128

## LISTA DE FIGURAS

1. Diagrama de la cromatografía en DEAE-c, 45
2. Precipitación del suero humano normal (SH) y saliva total (ST) con jacalina en placas de agarosa, 71
3. Precipitación de diversas muestras con jacalina (J), 73
4. Precipitación "espontánea" del suero de mieloma, 74
5. Precipitación por jacalina del suero de mieloma no dializado, del sobrenadante y precipitado del suero de mieloma dializado y del suero humano normal, en placas de agarosa con  $\text{CaCl}_2$  18 mM, 76
6. Patrones electroforéticos en poliacrilamida-SDS del suero humano normal, del suero de mieloma y del sobrenadante del suero de mieloma dializado, 78
7. Efecto del pH sobre la unión de la IgA a la DEAE-c, 82
8. Efecto de la cantidad de  $\text{IgA}_1$  sobre su unión a DEAE-c, 84
9. Unión de la  $\text{IgA}_1$  a DEAE-c en función de la concentración de  $\text{NaCl}$ , 87
10. Unión de la  $\text{IgA}_1$  a volúmenes variables de DEAE-c, 89
11. Perfil cromatográfico del suero de mieloma eluido en DEAE-c con un gradiente discontinuo, 93
12. Localización de la  $\text{IgA}$  mediante inmunodifusión radial de las fracciones cromatográficas del suero de mieloma, 94
13. Patrones electroforéticos de las fracciones del suero de mieloma obtenidos mediante cromatografía en DEAE-c, 95
14. Titulación de las fracciones de inmunoglobulinas de los antiseros C80 y C88 concentradas y dializadas, 99
15. Inmunolectroforesis de sIgA incubada con *P. aeruginosa*, 101
16. Inmunolectroforesis de  $\text{IgA}_1$  de suero de mieloma humano incubada con *P. aeruginosa*, 103
17. Patrón electroforético de  $\text{IgA}_1$  incubada con *P. aeruginosa* PA01, 106

18. Ensayo proteolítico de diferentes concentraciones de papaína en placas de agar/caseína, 110
19. Efecto de la cantidad de papaína sobre la hidrólisis de caseína, 111
20. Gráfica de las inversas de la concentración de papaína y del área neta de los halos de hidrólisis, 112
21. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio del medio de cultivo usado por PAφ1, 118
22. Patrón electroforético de la fracción P<sub>30-40</sub>, 121
23. Patrón electroforético de la IgA<sub>1</sub> incubada con la fracción P<sub>30-40</sub>, 131

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BALT</b>	Tejido linfoide asociado a bronquios
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CS</b>	Componente secretor
<b>Da</b>	Daltones
<b>DALT</b>	Tejido linfoide asociado a ductos
<b>DEAE-c</b>	Dietilaminoetil celulosa
<b>EDTA</b>	Etiléndiaminotetracetato disódico
<b>Fab</b>	Fragmento Fab (sitio de unión al antígeno)
<b>Fc</b>	Fragmento cristalizante
<b>FD</b>	Factor de dilución
<b>FDF</b>	Factor de dilución final
<b>g</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>GALT</b>	Tejido linfoide asociado al intestino
<b>IEF</b>	Inmunolectroforesis
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina de la clase A
<b>IgA<sub>1</sub></b>	Inmunoglobulina A de la subclase 1
<b>IgA<sub>2</sub></b>	Inmunoglobulina A de la subclase 2
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina de la clase G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina de la clase M
<b>MCU</b>	Medio de cultivo usado por PAφ1
<b>Mr</b>	Peso molecular aparente en PAGE-SDS
<b>P<sub>30</sub></b>	Precipitado del medio usado por <i>P. aeruginosa</i> PAφ1 y tratado con sulfato de amonio al 30%
<b>P<sub>30-40</sub></b>	Precipitado con sulfato de amonio al 40% del sobrenadante del medio usado por <i>P. aeruginosa</i> PAφ1 con sulfato de amonio saturado al 30%
<b>P</b>	Precipitado con sulfato de amonio saturado al 50%
<b>PA<sup>o</sup></b>	Persulfato de amonio
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PB</b>	Amortiguador de fosfatos
<b>PBS</b>	Salino amortiguado con fosfatos
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación con la recta
<b>Rf</b>	Migración en relación al frente en PAGE-SDS
<b>RM 2X</b>	Regulador de muestras 2X
<b>S<sub>30</sub></b>	Sobrenadante del medio usado por <i>P. aeruginosa</i> PAφ1 tratado con sulfato de amonio saturado al 30%
<b>S<sub>30-40</sub></b>	Sobrenadante obtenido con sulfato de amonio al 40% del precipitado del medio usado por <i>P. aeruginosa</i> PAφ1 con sulfato de amonio saturado al 30%
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SH</b>	Suero humano normal
<b>SIS</b>	Sistema Inmune Secretor
<b>SN</b>	Sobrenadante 1
<b>SN<sup>1</sup></b>	Sobrenadante 2
<b>ST<sup>2</sup></b>	Saliva humana total
<b>TEMED</b>	4 N'-tetrametiletiléndiamina

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Rubén López Revilla por su excelente dirección.

A todos mis amigos del laboratorio 17 ya que con ellos compartí una de las etapas mas bonitas de mi vida.

A Adrian Trejo Carmona y a Crecencio Flores Reyes por su amistad y eficiente trabajo.

Al todo el personal de los Departamentos de copiado, dibujo y fotografía de este centro de investigación.

A Imelda, Roberto y a todos los que laboran en la biblioteca del área biológica por su amistad, por su ayuda, por su excelente trabajo y por hacer de la biblioteca un sitio muy agradable.

A Manuel Hernández y Víctor Vega por su amistad, por sus grandes valores humanos y porque siempre estan dispuestos a brindar su tiempo.

A mi querido Dr. Saul Villa por haber creído en mí.

Al Dr. Jesús Calderón porque me brindó todas las facilidades para la escritura de esta tesis.

A todos los integrantes del Departamento de Biología Celular ya que de alguna manera contribuyeron con la elaboración de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización del presente trabajo.

A mis amigos, por que son ellos la fuerza que me empuja y motiva a seguir adelante.

## RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una especie bacteriana oportunista que puede causar infecciones severas en pacientes debilitados por quemaduras, tumores malignos y enfermedades crónicas. Varias cepas de P. aeruginosa producen proteasas extracelulares como la elastasa y la colagenasa, que han sido consideradas factores de virulencia; en lo que se refiere a la actividad proteolítica sobre IgA, los datos que se tienen son muy contradictorios. Sin embargo, Quezada y col. (manuscrito enviado a publicación) al estudiar en nuestro laboratorio 11 cepas de P. aeruginosa procedentes de infecciones clínicas encontraron que siete cepas produjeron claras modificaciones en el arco de IgA (en inmunolectroforesis). Esta actividad proteolítica tuvo las características de una proteasa clásica de IgA.

El propósito de este trabajo fue el de detectar y caracterizar la actividad proteolítica sobre IgA en la cepa PA $\phi$ 1 de P. aeruginosa. Monté un método de identificación de IgA utilizando jacalina con la técnica de doble difusión en geles de agarosa y realice una purificación de IgA<sub>1</sub> a partir de un suero de un paciente con mieloma.

Para saber si la incubación de P. aeruginosa PA $\phi$ 1 con sIgA e IgA afectaba su arco inmunolectroforético incubé una colonia de PA $\phi$ 1 con IgA de saliva total e IgA purificada a partir de un suero de un paciente con mieloma. De este ensayo encontré que del arco original de la IgA se generó un arco adicional.

Luego analicé la cinética de fragmentación de IgA incubando esta inmunoglobulina con una colonia de PA $\phi$ 1 durante 3, 6, 12 y 24 h. Analicé las muestras en un gel de SDS-poliacrilamida y encontré que la banda de IgA (150 KDa) disminuyó progresivamente de intensidad hasta desaparecer a las 24 h de incubación, al contrario de una banda de 63 KDa que apareció a las 6 h y aumentó de intensidad.

Cuantifiqué la actividad de la proteasa extracelular de la cepa PA $\phi$ 1 cultivada en caldo nutritivo, mediante un sistema de proteólisis en placas de agar-caseína que básicamente consistió en agregar el medio usado por PA $\phi$ 1 a una suspensión de caseína mezclada en un gel de agar bacteriológico al 1.2%. Alrededor del pozo donde se colocó la enzima se formó un área redonda y clara con un diámetro proporcional a la concentración de la enzima aplicada. La actividad del medio usado por la cepa PA $\phi$ 1 fue equivalente a 540 mU de papaína/10  $\mu$ l. La actividad mínima que pudo detectar el ensayo estaba contenida en 0.370  $\mu$ l de medio usado. Al ensayar mediante IEF la mezcla de medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1 que había sido incubada con IgA por 24 h a 37°C encontré que la actividad proteolítica efectivamente se

encontraba en el medio de cultivo. Para enriquecer esta actividad precipité el medio usado por PAØ1 con sulfato de amonio y obtuve una pastilla (fracción P ) con una actividad específica de 1934 U<sub>780</sub>g (enriquecida 28 veces). Mediante análisis en SDS-PAGE encontré que esta fracción está constituida por 3 bandas principales de 68, 43 y 38 KDa.

## I. INTRODUCCION

La IgA juega un papel preponderante para prevenir la colonización de las superficies mucosas por microorganismos patógenos. En este medio, la IgA está sujeta a una variedad de proteasas tanto del huésped como de las derivadas por los microorganismos. Una clase de enzimas conocidas como proteasas de IgA<sub>1</sub> son elaboradas por estos para colonizar las superficies mucosas.

### A. Sistema inmune secretor

Los epitelios mucosos que recubren internamente a órganos como los pulmones, intestino y boca que están expuestos al medio ambiente, pueden ser colonizados o afectados por microorganismos y están sujetos a la penetración de sustancias extrañas como proteínas y toxinas. Estos tejidos mucosos han desarrollado mecanismos de protección para la prevención de la invasión microbiana o el daño químico.

El sistema inmune secretor (SIS) constituye la parte del sistema inmune especializada en la protección de las mucosas. Los tejidos más definidos que se asocian con la inmunidad secretoria son las placas de Peyer (tejido linfoide asociado al intestino; GALT), los nódulos bronquiales (tejido linfoide asociado a bronquios; BALT). En la inmunidad secretoria se incluyen también los diversos folículos o nódulos linfoides

que se encuentran en varios sitios de la cavidad oral como las glándulas salivales y los labios (tejido linfoide asociado a ductos; DALT). A partir de los tejidos mencionados, las células inmunocompetentes son transportadas a otras regiones donde no hay tejidos linfoides de importancia, como las glándulas lacrimales, la región nasofaríngea, el aparato génitourinario y las glándulas mamarias.

El componente principal de la defensa por anticuerpos en el SIS es la inmunoglobulina A (IgA) de tipo secretor o secretoria (sIgA). En segundo término se encuentran la inmunoglobulina G (IgG) y la inmunoglobulina M (IgM). Todas estas inmunoglobulinas son exportadas a los líquidos que bañan las mucosas, donde interactúan con los microorganismos o sustancias extrañas (ver Quezada, 1987).

## **B. Inmunoglobulina A**

### **1. Estructura**

La IgA está formada por dos cadenas "pesadas" de la llamada clase  $\alpha$ , entre las cuales se han identificado las subclases  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . La región constante de las cadenas pesadas, que contiene la porción que no interviene en la unión con los antígenos, es codificada por una familia de genes diferente para cada subclase. En la familia de genes que codifican la subclase 2, existe una delección que involucra alrededor de 20

aminoácidos, además, esta familia tiene dos grupos de alelos identificables por determinantes antigénicos que han sido llamados A2m(1) y A2m(2) (Heremans, 1974).

Cada monómero de IgA se forma mediante la unión de dos cadenas pesadas idénticas; esto es, dos cadenas  $\alpha 1$ , o dos cadenas  $\alpha 2$ . La unión se realiza mediante puentes disulfuro entre las parejas de las cadenas  $\alpha 1$  o entre las  $\alpha 2$  A2m(1), o por asociación no covalente entre las parejas de las  $\alpha 2$  A2m(2)

Igual que otras inmunoglobulinas, el monómero de IgA contiene dos cadenas "ligeras", kapa o lambda. Las tres formas moleculares principales de la IgA son el monómero, el dímero y la sIgA. El monómero tiene un peso aproximado de 160,000 Da y un coeficiente de sedimentación de 7S. El dímero de la IgA está formado por dos monómeros de la misma subclase, unidos por enlaces covalentes (puentes disulfuro) entre las regiones Fc (o fragmento cristalizante, que incluye los extremos carboxilo terminales de las cadenas pesadas) de cada monómero, a través de una proteína llamada cadena J ("joining peptide" en inglés) cuyo peso molecular es de alrededor de 20,000 Da. Tanto el monómero como el dímero son sintetizados y secretados por células plasmáticas productoras de IgA (Heremans, 1974).

La sIgA consiste de un dímero de IgA asociado a una proteína adicional que tiene un peso molecular de 75,000 Da y parece estar enrollada cubriendo las regiones Fc de la IgA dimerica, a la cual se une por interacciones no covalentes y

puentes disulfuro. Esta proteína recibe el nombre de componente secretor (CS), debido a que solamente ocurre en la sIgA pero no en el monómero ni en el dímero, aunque también existe en forma libre en las secreciones mucosas (Heremans, 1974).

## 2. Funciones de la IgA (ver Quezada, 1987)

a. Inhibición de la adhesión bacteriana. Hay muchas especies de patógenos adherentes, cuya actividad requiere de la interacción con las superficies epiteliales sobre las que ejercen su acción. Existen además algunos patógenos en los que la adhesión no es un requisito para la producción del daño, como en el caso de Vibrio cholerae, cuyo efecto principal sobre el epitelio intestinal es causado por la enterotoxina que produce, aunque la producción de anticuerpos contra el vibrión limita los efectos causados por la infección.

La protección de los epitelios mucosos a través del sistema inmune secretor, mediante anticuerpos dirigidos contra los patógenos adherentes, se lleva a cabo especialmente por inmunoglobulinas del tipo de la sIgA dirigidas contra las adhesinas, moléculas responsables de la adhesión bacteriana. Estos anticuerpos bloquean los sitios de unión de las adhesinas a las células epiteliales, evitando así la adhesión de los microorganismos y limitando por lo tanto su efecto dañino, ya que de este modo son más fácilmente eliminados por los sistemas de limpieza de los

epitelios mucosos, tales como el flujo de moco y el arrastre mecánico.

b. Neutralización viral. La mayoría de las infecciones virales tienen acceso al organismo a través de las mucosas. La sIgA dirigida contra los virus contribuye a aglutinar los viriones, con lo que limita su capacidad para asociarse e infectar a las células epiteliales.

c. Exclusión de antígenos solubles y particulados. Hay muchos materiales químicos y biológicos en el medio ambiente que pueden resultar nocivos, tanto para los epitelios como para el organismo en general. Entre estos compuestos se encuentran proteínas, toxinas, polvo, pólenes, sustancias químicas, etc., que provocan sus efectos nocivos al contacto con las mucosas o al ser absorbidos por las mismas. La sIgA limita tales efectos nocivos, formando complejos de muy alto peso molecular que son más fácilmente eliminables y cuya absorción es muy pobre.

### 3. Características biológicas y químicas de la sIgA

La sIgA dimérica tiene mayor capacidad de precipitación y aglutinación de antígenos que la IgA sérica monomérica. Se supone que esta propiedad se debe en gran parte a su tetravalencia, que le permite asociarse a mayor número de haptenos, formando complejos mayores que son más fácilmente precipitables. La potencia de aglutinación y precipitación de

la sIgA en ocasiones es cuantitativamente similar a la de la IgG (Heremans, 1974).

Otra característica de la mayor importancia es la resistencia de la sIgA a la degradación enzimática y química. Los puentes disulfuro resisten más la reducción que en su contraparte sérica, probablemente por estar menos expuestos, ya que las regiones Fc están protegidas por el CS.

Además, la sIgA es muy resistente a la proteólisis por tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína y líquido duodenal, a los cuales si es sensible la IgA sérica. De hecho, la sIgA puede actuar como un inhibidor no competitivo de las actividades de tripsina y quimotripsina.

### C. Proteasas de inmunoglobulinas

El sistema inmune secretor (SIS) parece encontrarse en equilibrio dinámico con los microorganismos que normalmente colonizan las mucosas. Este equilibrio es determinado por factores modulatorios de las condiciones microambientales tales como la dieta, la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos, los hábitos higiénicos del huésped y el estado de los mecanismos de protección. También depende de factores de los microorganismos como las toxinas, los mecanismos de adhesión, las bacteriocinas y las enzimas. Cuando el equilibrio se pierde a favor de los microorganismos, se ocasionan las enfermedades correspondientes.

Entre los mecanismos que los microorganismos utilizan

para desequilibrar al SIS se encuentran las enzimas capaces de hidrolizar a las inmunoglobulinas del huésped. Estas enzimas permiten evadir la respuesta inmune local por anticuerpos al eliminar los efectos de activación del complemento por la vía clásica, la opsonización y la aglutinación, que dependen de la estructura de regiones específicas de dichos anticuerpos.

Aunque desde hace tiempo se conoce la existencia de proteasas de inmunoglobulinas en los microorganismos patógenos, no se les había dado tanta importancia como factores de evasión de la inmunidad local (ver Quezada, 1987).

#### D. Proteasas específicas de IgA

Todas las proteasas de IgA que han sido examinadas con cierto detalle pueden describirse como endopeptidasas extracelulares sensibles a los quelantes de metales (Kilian y col., 1983).

Los microorganismos productores de proteasas de IgA son en general especies bacterianas patógenas que colonizan los epitelios mucosos como el oral, nasal, bronquial y urinario. Algunos ejemplos son Streptococcus sanguis, Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae y Ureaplasma urealyticum. En ocasiones la producción de la enzima correlaciona con la virulencia específica de las cepas (Kornfeld y Plaut, 1981).

Estas enzimas cortan, tanto IgA monomérica como secretoria, en la región de la bisagra de las cadenas pesadas, con lo cual se generan fragmentos F $\alpha$  y Fab $\alpha$

completos. El punto de corte de las cadenas  $\alpha 1$  generalmente se encuentra en la región correspondiente a la delección de aminoácidos de las cadenas  $\alpha 2$ , por lo que la ausencia de estas secuencias en las cadenas  $\alpha 2$  y su presencia en las cadenas  $\alpha 1$  determina la selectividad de la enzima por la  $IgA_1$ .

La mayoría de las proteasas de  $IgA$  reconocen regiones específicas que contienen las secuencias de aminoácidos prolina-serina y prolina-treonina que abundan en la bisagra de las cadenas  $\alpha 1$ , mientras que los sitios de corte de las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  A2m(1) por la proteasa de Clostridium sp. parecen encontrarse entre los residuos prolina-valina 221 y 222 respectivamente, presentes en ambas cadenas.

La mayoría de las proteasas de  $IgA$  son inhibidas por EDTA; algunas también son inhibidas por  $HgCl_2$ , yodacetamida y p-cloromercuribenzoato, pero no por pepstatina, fluoruro de metil-metil-sulfonilo (PMSF), inhibidor de tripsina, tosil-L-lisina, clorometil-cetona y otros inhibidores conocidos de serín-proteasas. Las evidencias anteriores parecen indicar que estas enzimas son generalmente metalo-proteasas que también dependen de sulfhidrilos para su actividad.

La principal función biológica de las proteasas de  $IgA$  parece ser la disminución de la eficacia de la respuesta inmune local por los anticuerpos de los epitelios mucosos. La alta frecuencia de producción de dichas enzimas por patógenos aislados de infecciones clínicas parece apoyar esta posibilidad.

Como cabría esperar, la producción de proteasas

específicas de IgA y la producción de proteasas que degraden a otras inmunoglobulinas no son mutuamente excluyentes y pueden ocurrir simultáneamente en los microorganismos patógenos. En tales casos la actividad sobre la IgA parece no ser específica, debido a la presencia simultánea de varias proteasas que actúan sobre las diferentes clases de inmunoglobulinas (ver Quezada, 1987).

## **E. Pseudomonas**

### **1. Características generales**

Las *Pseudomonas* son un extenso grupo de bacterias gram negativas de vida libre, ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos, que colonizan o son patógenos de plantas, animales o el hombre. De las especies conocidas, sólo un pequeño número se asocia con enfermedades, a menudo severas, en el hombre.

El género incluye bacilos entéricos aerobios estrictos (morfológicamente similares a las aeromonas y a los vibrios) que crecen bien en medios diferenciales entéricos. Su metabolismo no es fermentativo sino respiratorio, son oxidasa positivos y salvo raras excepciones su locomoción es por flagelación polar (Davis y col., 1973).

Las facultades metabólicas de estas bacterias les permiten jugar un papel relevante en el ciclo del nitrógeno y en la mineralización de la materia orgánica. Por otra parte, la participación de *Pseudomonas* en numerosas enfermedades del

hombre las ha vuelto importantes también en medicina (Davis y col., 1973).

## 2. Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es la especie tipo del género Pseudomonas y de la familia Pseudomonadaceae. Este organismo comúnmente acuático y terrestre reside en el tubo digestivo de sólo un 10% de los individuos sanos y esporádicamente se encuentra en áreas húmedas de la piel y en la saliva. Sus requerimientos nutricionales son simples (utiliza  $\text{NH}_4$  como fuente de nitrógeno) y puede metabolizar una gran variedad de fuentes de carbono. Crece rápidamente en medios estándar a temperaturas de hasta  $42^\circ\text{C}$ . La mayoría de las cepas producen piocianina y fluoresceína, que se difunden y dan color al medio que rodea a las colonias; sólo 10% de las cepas no producen pigmentos (Davis, 1973).

### a. Hábitat

P. aeruginosa puede desarrollarse casi en cualquier ambiente húmedo que contenga trazas de compuestos orgánicos como lágrimas, soluciones antisépticas, desinfectantes, equipos de anestesia y resucitación, fregaderos, tomas de agua, combustibles, e incluso agua destilada almacenada. Los productos farmacéuticos derivados de plantas como cremas de manos, ungüentos, supositorios, tabletas, pastas, emulsiones y jarabes, son fuentes comunes de P. aeruginosa; los cosméticos también pueden contenerlas. Han sido encontradas

en comestibles congelados, fresa, ciruela y otras frutas, tomate, zanahoria, cebolla, apio, rábano, lechuga, col, ensalada de pepino, pollo y carne congelados, huevos refrigerados, limonadas y leche. Así mismo, las pseudomonas pueden ser aisladas dentro de la flora normal del intestino, boca y piel de los animales y del hombre (Bergan, 1973).

#### b. Patogenicidad

*P. aeruginosa* prevalece por selección en ambientes de hospitales donde los antibióticos son ampliamente usados; causan entre 10 y 20% de las infecciones de los pacientes hospitalizados, principalmente los que sufren quemaduras, leucemia y fibrosis quística o han sido tratadas con drogas inmunosupresoras (ver Escobar, 1987).

En huéspedes susceptibles, *P. aeruginosa* puede causar infecciones en cualquier región del cuerpo, particularmente en heridas, tracto urinario y respiratorio y provocar además endocarditis, meningitis, neumonía, otitis, vaginitis y conjuntivitis. La colonización es inofensiva bajo circunstancias normales; las infecciones se presentan cuando los mecanismos de defensa locales o generales se reducen, lo cual refleja el oportunismo de esta especie bacteriana (Bergan, 1973).

#### F. Antecedentes directos del trabajo

La primera evidencia sobre la proteólisis de IgA la publicó Muller (1971) quien demostró cambios en la movilidad

electroforética de dicha inmunoglobulina, aunque no llegó a determinar el tipo de modificación química ocurrida en la molécula. En 1973 Metha y col. encontraron que una enzima bacteriana presente en las heces de humanos cortaba específicamente a la IgA en la región de la bisagra, produciendo fragmentos Fca y Faba completos. Sin embargo, la especie bacteriana productora de tal enzima no fue identificada entonces. El aspecto más importante de este descubrimiento fue que la enzima en cuestión generase fragmentos Fca íntegros, en contraste con la hidrólisis de la IgA por enzimas digestivas como tripsina y quimotripsina que causan una degradación progresiva de los fragmentos Fc, por lo cual se generan solamente péptidos de bajo peso molecular (ver Quezada, 1987).

Estudios subsecuentes realizados por Plaut, Cenco y Tomasi (1974) revelaron que una actividad enzimática similar a la descrita por Metha y col. (1973) podía encontrarse también en la saliva humana colectada de la cavidad oral (ver Kilian y col., 1983).

El origen microbiano de la enzima fecal fue sugerido nuevamente por Plaut y col. (1974), quienes no encontraron actividad de proteasa de IgA en muestras de líquido intestinal en humanos en ayunas, ni tampoco en líquido pancreático, bilis y saliva obtenida directamente de la glándula parótida. La actividad enzimática presente en la saliva colectada en la boca llevó a la búsqueda de microorganismos orofaríngeos capaces de producir proteasas de IgA, y el primero que se encontró con tales características

fue Streptococcus sanguis (Kornfeld, 1981).

Después se vió que la proteasa de IgA no afectaba a las inmunoglobulinas de las clases G, M y E, lo cual indicaba una alta especificidad de la enzima. Posteriormente se demostró que la enzima de S. sanguis, además de no afectar inmunoglobulinas de otras clases, fragmentaba IgA de la subclase 1 sin afectar a la subclase 2.

A partir de la detección de las proteasas de IgA en cepas de S. sanguis se han llevado a cabo numerosos estudios en bacterias, micoplasmas, hongos y virus, para ver si hay otros microorganismos que compartan esta capacidad. Estos estudios han revelado que las proteasas de IgA se presentan solamente en algunas especies bacterianas, pero no en micoplasmas, hongos y virus (Kilian y col., 1983).

El interés por las proteasas de IgA fue estimulado por el hallazgo de que las especies bacterianas que poseen tal actividad no están relacionadas taxonómicamente, pero sí están asociadas con ciertos tipos de enfermedades infecciosas como la meningitis, la enfermedad periodontal y la gonorrea (Kilian y col., 1983).

Doring y colaboradores (1981) demostraron que dos enzimas extracelulares de una cepa de P. aeruginosa atacan a las inmunoglobulinas. Una de las enzimas (elastasa) induce la hidrólisis de las cadenas pesadas de IgA e IgG. La otra enzima (proteasa alcalina) es menos activa, ya que solo actúa sobre la IgA, en condiciones de incubación que se prolongan por varios días (Kilian y col., 1983).

Según Kilian y col. (1983), no es clara la incidencia de la activación del corte de la IgA por cepas de P. aeruginosa, ya que ninguna de 15 cepas clínicas estudiadas por ellos tenían actividad de proteasa de IgA bajo condiciones estándar.

Sin embargo, Quezada (1987) y Quezada y col. (manuscrito enviado a publicación) al estudiar en nuestro laboratorio 11 cepas de P. aeruginosa procedentes de infecciones clínicas encontraron que siete produjeron claras modificaciones en el arco de la sIgA (en inmunolectroforesis) y fragmentación de IgA detectada en geles de poliacrilamida-SDS. Esta actividad proteolítica tuvo las características de una proteasa clásica de IgA (especificidad por  $IgA_1$ , generación de fragmentos  $Fc\alpha$  y  $Fab\alpha$ ).

## II. OBJETIVOS

### A. Ojetivo General

Caracterizar la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* (PA $\phi$ 1) sobre IgA<sub>1</sub>

### B. Objetivos particulares

1. Purificar IgA<sub>1</sub> de un suero de mieloma humano
2. Identificar y purificar la(s) proteasa(s) con actividad sobre IgA<sub>1</sub> producida(s) por la cepa PA $\phi$ 1.

### III. MATERIALES

#### A. Origen de los reactivos

De Sigma Chemical Company (St. Louis MO, EUA) obtuve agarosa tipo B, albúmina sérica bovina fracción V (BSA), persulfato de amonio, trizma base, Azul de Coomassie R-250, cisteína, fenil-metil sulfonil-fluoruro (PMSF), y papaína tipo IV. De J. T. Baker de México SA, obtuve (grado reactivo): Cloruro de calcio anhidro, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, ác. acético, alcohol isopropílico, sulfato de amonio, fosfato de potasio dibásico y monobásico, glicerol, etilendiaminotetracetato disódico (EDTA) y bicarbonato de sodio. De Pierce Chemical Company (Rockford, IL, EUA) obtuve azul de Coomassie G-250. De Canal Industrial Corporation (Rockville MD, EUA) obtuve 4 N'-tetrametiletilene-diamina (TEMED). N'N'-metilenacrilamida(bis), acrilamida y DEAE-c las obtuve de Eastman Kodak Co. (Rochester NY, EUA); ácido ortofosfórico, de Merck de México; Bacto Agar y caldo nutritivo, de Difco Laboratories (Detroit MI, EUA); dodecil sulfato de sodio (SDS) de BDH Chemical Ltd. (Poole, Inglaterra). De Bioxon de México obtuve agar bacteriológico y caldo de soya tripticaseína; de Mead Johnson, caseinato de calcio (Casec).

## B. Origen del material biológico

El suero humano normal (SH) lo donó Martín Muy Rivera. Fernando Navarro García, donó la saliva humana total (ST) liofilizada y Margarita Valadez Sánchez la IgG. La jacalina empleada proviene de semillas de *A. heterophylus* y nos fue proporcionada gentilmente por el Dr. K. Kobayashi, de la escuela de Medicina de Yamaguchi (Japón). Las inmunoglobulinas A humanas que empleé provenían de mielomas de la subclase IgA<sub>1</sub> kapa (car), e IgA<sub>2</sub> lambda (fel). Ambas nos las proporcionó el Dr. Jiri Mestecky, de la Universidad de Alabama en Birmingham (EUA). Los sueros de mielomas humanos me los proporcionó Roberto Quezada Calvillo y provienen de pacientes con mielomas de IgA. Dichos sueros los donó gentilmente al laboratorio el Dr. Pablo Rivera, del centro Médico "La Raza" del IMSS (México DF). La cepa PAø1 de *Pseudomonas aeruginosa* proviene de la colección de Sergio Vaca (ENEP Iztacala, UNAM). Los sueros de conejo anti-IgA (C80 y 88) fueron obtenidos por Fernando Navarro García en nuestro laboratorio.

## C. Composición y preparación de soluciones, reactivos y medios de cultivo

### 1. Preparación de los geles de agarosa

Solución A. CaCl<sub>2</sub> 0.5 M (100 ml)

Disolví 5.55 g de CaCl<sub>2</sub> y los aforé a 100 ml con agua

bidestilada. Filtré la solución con papel Whatman No. 1 y la almacené a temperatura ambiente.

Solución B. Trizma base 1 M (100 ml)

Disolví 12.11g de Trizma base y los aforé a 100 ml con agua bidestilada, autoclaveé la solución y la almacené a temperatura ambiente en frascos de vidrio estériles.

Solución C. Tris-HCl 15 mM pH 8.6 (20 ml)

Mezclé 300  $\mu$ l de la solución B con 18 ml de agua bidestilada. Después ajusté a pH 8.6 con HCl y aforé a 20 ml. La solución la preparé minutos antes de su uso.

Solución D. Tris-HCl 15 mM/CaCl<sub>2</sub> 18 mM pH 8.6 (20 ml)

Mezclé 720  $\mu$ l de la solución A, 300  $\mu$ l de la solución B y 18 ml de agua bidestilada. Después ajusté el pH a 8.6 con HCl 0.1 M y aforé a 20 ml. Esta solución la utilicé inmediatamente.

Agarosa al 1.5% en Tris HCl 15 mM pH 8.6. Agregué 180 mg de agarosa a 12 ml de la solución C. Fundí la mezcla en el horno de microondas a máxima intensidad en 3 o 4 periodos de irradiación de 10 seg cada uno, sin permitir la ebullición. Después agité con una varilla de vidrio para que la mezcla con agarosa fundida tuviera aspecto cristalino.

Agarosa al 1.5% en Tris-HCl 15 mM pH 8.6/CaCl<sub>2</sub>. A 180 mg de agarosa añadí 12 ml de la solución D siguiendo los mismos

pasos descritos para la preparación de agarosa al 1.5% en Tris-HCl 15 mM pH 8.6.

Azul de Coomassie al 0.5%. A una solución de etanol-ácido acético-agua, 45:10:45 ya filtrada con papel Whatman no 1 agregué azul de Coomassie G-250 al 0.5%.

## 2. Reactivos para la cuantificación de proteínas

### Reactivo de Bradford (500 ml)

En la campana extractora mezclé (en probeta graduada de 500 ml) 50 mg de Azul de Coomassie G-250, 25 ml de etanol absoluto y 50 ml de ácido ortofosfórico. Agité cuidadosamente la mezcla para disolver el colorante. Sin dejar de agitar, aforé a 500 ml con agua bidestilada. Introduje una barra magnética, resbalándola lentamente sobre la pared interna mientras la probeta se mantenía inclinada. Cubrí la probeta con Parafilm, mezclé el contenido por inversión y agité magnéticamente hasta disolver completamente el colorante. Filtré el reactivo a través de un embudo (con papel Whatman No. 1) colocado directamente en la boca del recipiente del despachador de repetición (Repipet Jr).

## 3. Amortiguadores y soluciones para PAGE-SDS

a. Soluciones para preparar los geles y las corridas electroforéticas

**Solución A. Acrilamida-Bis**

Pesé 30 g de acrilamida y 0.4 g de bisacrilamida usando cubrebocas. Los disolví con 70 ml de agua, aforé a 100 ml y filtré en papel Whatman No. 1. Guardé la solución en una botella lechera cubierta con papel de aluminio y la almacené a 4°C.

**Solución B. Tris-HCl 3 M pH 8.8-9.0**

Disolví 36.3 g de Trizma base con 30 ml de agua; agregué 5.3 ml de EDTA 0.2 M pH 8.0 y 10 ml de glicerol al 50%, ajusté el pH con HCl 5M (aprox. 8 ml), aforé a 100 ml con agua bidestilada, coloqué la solución en una botella lechera de polipropileno y la almacené a 4°C.

**Solución C. Tris-HCl 0.49 pH 8.6**

Disolví 5.98 g de Trizma base con 30 ml de agua bidestilada y añadí 4 ml de EDTA 0.2 M. Ajusté el pH con HCl 5 M (aprox. 6 ml) y aforé a 100 ml. Guardé la solución en una botella de polipropileno a 4°C.

**Solución D. SDS al 10%**

Disolví 10 g de SDS (pureza electroforética) con 70 ml de agua bidestilada y aforé a 100 ml cuidando de no hacer espuma. Guardé la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

**Solución E. TEMED**

Distribuí muestras de 0.1 ml en tubos Eppendorf de 0.5

ml. Los cerré perfectamente y los almacené a 4°C.

Solución F. Persulfato de amonio (PA) al 10%

Coloqué 0.01 g de PA en tubos Eppendorf de 1.5 ml que tapé y almacené en un desecador con sílica. Disolví cada muestra con 1 ml de agua bidestilada inmediatamente antes de usar la solución.

Solución G. Amortiguador de corrida 10X

Mezclé 30 g de Trizma base y 144 g de glicina con 100 ml de la solución D, 500 ml de agua bidestilada y 40 ml de EDTA 0.2 M pH 8.0. Ajusté el pH a 8.3 y aforé a 1000 ml. Guardé la solución en una botella de polipropileno a temperatura ambiente.

b. Soluciones para disolver las muestras y teñir los gels

Azul de bromofenol al 0.2%

Disolví 0.02 g de azul de bromofenol en 10 ml de agua bidestilada y guardé la solución a -20°C en un tubo Pyrex de 16 X 125 ml con tapón de rosca.

Amortiguador de muestras 2X

Mezclé 5 ml de la solución C, 2 ml de SDS al 10%, 2 ml de glicerol al 50%, 0.5 ml de azul de bromofenol al 0.2% y 0.9 ml de agua bidestilada. Distribuí muestras de 1 ml a tubos Eppendorf de 1.5 ml y las almacené

Amortiguador de muestras 2X

Mezclé 5 ml de la solución C, 2 ml de SDS al 10%, 2 ml de glicerol al 50%, 0.5 ml de azul de bromofenol al 0.2% y 0.9 ml de agua bidestilada. Distribuí muestras de 1 ml a tubos Eppendorf de 1.5 ml y las almacené a -20°C.

Colorante de Fairbanks

Mezclé 225 ml de alcohol isopropílico, 50 ml de ácido acético glacial y 25 g de azul brillante de Coomassie G-250 con 300 ml de agua y aforé a 500 ml con agua bidestilada. Filtré con papel Whatman No. 1 y guardé el colorante en una botella de polipropileno a temperatura ambiente.

Solución desteñidora rápida

Mezclé 50 ml de ácido acético glacial, 225 ml de alcohol isopropílico y aforé a 500 ml con agua. Guardé la solución en una botella de polipropileno con carbón activado a temperatura ambiente.

Acido acético al 7.5%

En la campana extractora hice la mezcla de 37.5 ml de ácido acético con 300 ml de agua y aforé a 500 ml. Guardé la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno que contenía 50 g de carbón activado.

c. Soluciones de uso general

Glicerol al 50%

Añadí 50 ml de glicerol a una probeta con 50 ml de agua. Almacené la solución en una botella lechera a temperatura ambiente.

EDTA 0.2 M pH 8.0

Disolví 7.4 g de EDTA en 70 ml de agua bidestilada, ajusté el pH a 8.0 con HCl 1 M y aforé a 100 ml. Guardé la solución en una botella lechera.

Agar al 1%

Añadí 1 g de agar a 70 ml de la solución B, fundí la mezcla en el horno de microondas y aforé a 100 ml con el mismo amortiguador. Distribuí muestras de 3 ml en tubos Pyrex con tapón de rosca y los almacené bien tapados a temperatura ambiente.

4. Soluciones para activación y equilibrio de la DEAE-celulosa

## a. Soluciones madre

Fosfato de potasio dibásico 1 M (200 ml)

Agregué 34.8 g de  $K_2HPO_4$  a 180 ml de agua bidestilada, agité la mezcla hasta disolverla y la aforé a 200 ml. Repartí alícuotas de 100 ml en botellas lecheras, que esterilicé al autoclave (15 lb/in<sup>2</sup>) durante 15 min y guardé tapadas a temperatura ambiente.

Fosfato de potasio monobásico 1 M (200 ml)

Agregué 27.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 180 ml de agua bidestilada, agité la mezcla hasta disolverla y la aforé a 200 ml. Repartí alícuotas de 100 ml en botellas lecheras, que esterilicé al autoclave (15 lb/in<sup>2</sup>) durante 15 min y guardé tapadas a temperatura ambiente.

b. Soluciones de trabajo

HCl 0.5 M (250 ml)

Añadí 10.1 ml de HCl concentrado (12.4 M) lentamente a 100 ml de agua bidestilada y luego aforé a 250 ml.

NaOH 0.5 M (250 ml)

Disolví 5 g de NaOH en un vaso de precipitados y aforé a 250 ml con agua bidestilada, en una probeta graduada.

5. Amortiguadores para probar el efecto del pH y la concentración de sal sobre la unión de la IgA a la DEAE-c

- a. Preparaciones de soluciones con diferente pH (ver Tabla 1)
- b. Preparación de soluciones con diferente concentración de sal (ver Tabla 2)

6. Amortiguadores y reactivos para la cromatografía en DEAE-c  
c (ver Tabla 3)

TABLA 1

Preparación de soluciones de PBS 10 mM  
NaCl 38 mM con diferentes pH

pH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M <sup>a</sup> (ml)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M <sup>a</sup> (ml)	NaCl (g)	H <sub>2</sub> O bidest (ml)
5.5	9.5	0.5	2.2	800
6.0	8.6	1.4	2.2	800
6.5	6.6	3.3	2.2	800
7.0	3.9	6.1	2.2	800
7.5	1.6	8.3	2.2	800
8.0	0.6	9.4	2.2	800

Ajusté todas las soluciones al pH deseado con HCl 1 M y las aforé a 1000 ml inmediatamente antes de usarlas

TABLA 2

Preparación de soluciones de PB 10 mM  
pH 6 con diferente concentración de sal

NaCl (mM)	KH PO <sub>4</sub> 1 <sup>2</sup> M <sup>4</sup> (ml)	K HPO <sub>4</sub> 1 <sup>1</sup> M <sup>4</sup> (ml)	NaCl 1 M (ml)	H O biñest (ml)
10	2.16	0.34	2.5	200
20	2.16	0.34	5.0	200
30	2.16	0.34	7.5	200
40	2.16	0.34	10.0	200

Ajusté las soluciones a pH 6.0 y las  
aforé a 250 ml inmediatamente antes de  
usarlas

Solución saturada de sulfato de amonio (50 ml)

A 50 ml de agua bidestilada añadí 50 g de sulfato de amonio y agité la mezcla magnéticamente hasta la disolución total.

7. PBS (100 ml).

Añadí 280  $\mu$ l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M y 720  $\mu$ l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 M estériles y luego 0.8 g de NaCl, a 80 ml de agua bidestilada. Ajusté el pH a 7.2 con HCl 1N y aforé a 100 ml.

8. Agar de soya-tripticaseína para el cultivo de Pseudomonas aeruginosa (150 ml)

Agregué 2.25 g de agar bacteriológico y 4.5 g de caldo de soya tripticaseína a 100 ml de agua bidestilada. Mezclé bien y aforé a 150 ml. Esterilicé 15 min a 15 lb/in<sup>2</sup> y en condiciones asépticas vacié inmediatamente en cuatro cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Guardé las cajas con las tapas hacia abajo a 4°C dentro de bolsas de polietileno.

9. Amortiguadores para inmunoelectroforesis (Preparé todas las soluciones inmediatamente antes de usarlas)

Tris-HCl 15 mM pH 8.0 (20 ml)

Añadí 300  $\mu$ l de Trizma base 1 M a 18 ml de agua bidestilada. Luego ajusté el pH con HCl 0.5 M y aforé a 20 ml.

TABLA 3

**Preparación de los eluyentes para la cromatografía en DEAE-c**

pH	NaCl		K HPO <sub>4</sub> 1 M <sup>a</sup> (ml)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M <sup>a</sup> (ml)
	(mM)	(g)		
6	-	-	0.14	0.86
7	38	0.22	0.91	0.39
8	50	0.29	0.94	0.06
8	100	0.58	0.94	0.06

Ajusté con HCl 1 M las soluciones al pH indicado y las aforé a 100 ml con agua inmediatamente antes de usarlas

Tris-HCl 15 mM pH 8.6 (2000 ml)

Agregué 30 ml de Trizma base 1 M a 1800 ml de agua bidestilada. Luego ajusté el pH con HCl 0.5 M y aforé a 2000 ml.

Tris-HCl 15 mM/CaCl<sub>2</sub> 18 mM pH 8.6 (2000 ml)

Mezclé 30 ml de Trizma base 1 M y 72 ml 18 mM de CaCl<sub>2</sub> con 1700 ml de agua bidestilada. Luego ajusté el pH con HCl 0.5 M y aforé a 2000 ml.

10. Soluciones y reactivos para ensayo de la actividad proteolítica de papaina y de la proteasa de P. aeruginosa (Preparé todas las soluciones y reactivos inmediatamente antes de usar)

Caseína al 10%

Disolví 1.5 g de caseinato de calcio (CASEC) en 15 ml de agua bidestilada.

Agar al 2.4%

Agregué 1.2 g de agar bacteriológico a 50 ml de agua bidestilada. Disolví la mezcla en el horno de microondas a intensidad máxima durante 10 seg con cinco periodos intermitentes de 2 seg.

Tris-HCl 50 mM pH 8.0

A 90 ml de agua bidestilada agregué 5 ml de Trizma base 1 M, ajusté el pH con HCl 0.5 M y aforé a 100 ml.

Mezcla de activadores 2X (Cisteína 10 mM-EDTA 4 mM)

Agregué 0.024 g de cisteína y 0.0297 g de EDTA-sal disódica a 18 ml de agua bidestilada, ajusté el pH a 8.0 con NaOH 0.5 M y aforé a 20 ml.

Papaína (2 mg/ml)

En un tubo Eppendorf de 500  $\mu$ l, agregué 1 mg de papaína a 500  $\mu$ l de agua bidestilada.

Papaína (4 mg/ml)

En un tubo Eppendorf de 500  $\mu$ l agregue 2 mg de papaína a 500  $\mu$ l de agua bidestilada

Mezcla para activación de papaína

Agregué 200  $\mu$ l de papaína (2 o 4 mg/ml) a 200  $\mu$ l de la mezcla de activadores 2X. La concentración final de esta mezcla fue: papaina 1 (o 2) mg/ml-cisteína 5 mM-EDTA 2 mM.

Caldo nutritivo (100 ml)

Mezclé 0.8 g de caldo nutritivo con 100 ml de agua bidestilada en 2 matraces Erlenmeyer de 125 ml con tapón de rosca. Esterilicé 15 min a 15 lb/in<sup>2</sup> y almacené a temperatura ambiente.

Fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) 100 mM

Agregué 0.035 g de PMSF a 2 ml de isopropanol. Repartí la mezcla en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml y las almacené a -20°C.

## IV. METODOS

### A. Obtención y preparación del material biológico

1. **Suero humano normal.** Lo obtuve de sangre venosa, la cual dejé coagular en tubos Falcon cónicos de 50 ml durante 30 min a 37°C. Luego desprendí el coágulo con un agitador de vidrio y centrifugué el tubo 15 min a 2000 X g en la centrífuga CRU-5000. El sobrenadante lo recuperé con pipetas Pasteur y lo almacené en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20°C hasta su uso.

2. **Saliva humana total.** La obtuve de donadores con la boca recién lavada y que no habían ingerido alimento al menos por dos horas. La salivación la induje por masticación de Parafilm. La saliva producida durante el primer minuto de estimulación la descarté mientras que la producida 15 min después la colecté en vasos de precipitados. La saliva colectada la almacené a -20°C hasta su uso.

3. **Jacalina.** Disolví 50 mg de jacalina en 500 µl de Tris-HCl 15 mM/CaCl<sub>2</sub> 18 mM pH 8.6 para tenerla a una concentración final aproximada a 100 mg/ml.

### B. Preparación de los geles de agarosa

#### 1. Recubrimiento de portaobjetos con agarosa

Una vez fundida la agarosa, la mantuve en un baño de agua

56°C para evitar su gelificación y con una pipeta serológica de 5 ml, previamente calentada con un mechero, tomé 2.8 ml de agarosa y la extendí cuidadosamente sobre portaobjetos perfectamente limpios y con un nivel de burbuja alineados horizontalmente. Almacené las placas a 4°C en una cámara húmeda hasta antes de su uso.

## 2. Perforación de los geles de agarosa

Construí plantillas de cartulina con la disposición de los pozos de la siguiente forma: En la parte central perforé un pozo de 3 mm de diámetro y alrededor de éste perforé 6 pozos dispuestos hexagonalmente con una separación de 6 mm entre ellos, utilizando un sacabocados conectado a una trampa de vacío.

## 3. Lavado de los geles de agarosa

Coloqué los portaobjetos con el gel sobre toallas desechables de papel y los comprimí con un objeto de aproximadamente 1 kg durante 15 min. Posteriormente los sumergí 12 h en 250 ml de una solución de NaCl 0.1 M y luego en agua bidestilada. Por último, comprimí los geles y los sequé durante 10 min a 60°C en un horno eléctrico (JM Ortiz).

## 4. Tinción de los geles de agarosa

Sumergí los geles secos en azul de Coomassie al 0.5% durante 15 min. Luego los enjuagué con agua bidestilada para eliminar el exceso de colorante y los sumergí en ácido acético al 7% por el tiempo necesario para eliminar el fondo azul.

### C. Precipitación con jacalina en geles de agarosa

De la solución de jacalina con 100 mg/ml hice seis diluciones dobles seriadas en el mismo amortiguador. Luego coloqué 10  $\mu$ l de cada dilución en cada uno de los seis pozos periféricos de dos geles de agarosa. En los pozos centrales coloqué 10  $\mu$ l de suero humano normal (SH) o saliva humana total. Finalmente coloqué los geles en una cámara húmeda y los incubé 18 h a temperatura ambiente.

Para analizar la precipitabilidad por jacalina usé 10  $\mu$ l de jacalina a 100 mg/ml en los pozos centrales de los geles. En los pozos periféricos coloqué 10  $\mu$ l de las siguientes muestras: SH, ST, IgA<sub>1</sub> monoclonal, IgA<sub>2</sub> monoclonal, y suero de mieloma.

### D. Determinación de proteínas con el método de Bradford

Hice primero una curva tipo usando BSA (1 mg/ml) como estándar. Hice luego diluciones seriadas al doble de la BSA en el amortiguador requerido, desde 1:2 hasta 1:8 y usé como blanco al mismo amortiguador.

#### Tratamiento de las muestras

Hice diluciones adecuadas de las muestras de proteínas con el amortiguador requerido (i.e. llevé el SHN a una dilución 1:200 y el suero de mieloma dializado y no dializado a diluciones 1:10 y 1:20).

Luego mezclé 40  $\mu$ l de cada muestra con 2 ml de reactivo de Bradford, y medí la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro utilizando celdillas semimicro de cuarzo de 1 cm de vía óptica. Determiné la concentración de proteínas de los problemas por interpolación en la curva estándar de BSA.

## E. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

### 1. Formación del gel separador (inferior)

Armé la cámara para formar el gel con una pareja de placas de vidrio y sellé los bordes laterales y el inferior aplicando agar fundido al 1% con una pipeta Pasteur. Marqué con un plumón indeleble el nivel que debería alcanzar el gel separador en las placas de vidrio. Después mezclé en un tubo de ensayo las soluciones anotadas en la Tabla 4 para formar los geles separadores con el volumen apropiado según el equipo de electroforesis usado. Antes de agregar TEMED (solución E) y persulfato de amonio (solución F), agité y desgasifiqué la mezcla al vacío por un minuto.

Con una pipeta de 10 ml añadí la mezcla cuidadosamente en el espacio contenido entre las placas de vidrio, evitando la formación de burbujas. Inmediatamente después vacié cuidadosamente agua por uno de los extremos de la cámara con una pipeta Pasteur, para bloquear el contacto del gel con el aire. Una vez que el gel polimerizó (10 minutos después) eliminé el agua por inversión de la cámara y lavé dos veces

el borde del gel separador con agua. Sequé el exceso de agua con papel, evitando tocar el gel.

## 2. Formación del gel concentrador (superior)

Mezclé en un tubo de ensayo las soluciones en el orden anotado en las columnas de la Tabla 4. Antes de agregar TEMED (solución E) y persulfato de amonio (solución F) agité y desgasifiqué en la línea de vacío por un minuto. Agité suavemente y coloqué inmediatamente la mezcla entre las placas de vidrio hasta llenar el espacio.

Coloqué el peine entre las placas, introduciéndolo en la mezcla un poco inclinado para desplazar hacia arriba las burbujas que pudieran quedar bajo el borde inferior de los dientes, donde se formaron las hendiduras del gel superior, procurando que los extremos del peine llegaran hasta 1 cm por arriba del gel separador. La polimerización también ocurrió en 10 min.

## 3. Preparación de las cámaras electroforéticas

Mientras se formaba el gel concentrador (superior), preparé el volumen apropiado de amortiguador de corrida 1X (30 ml para cámara Mini-Ephortec).

Marqué sobre una de las placas de vidrio el fondo de cada carril con un marcador indeleble y luego quité el peine sin deformar los carriles.

En la cámara de electroforesis colocada horizontalmente sobre la mesa de trabajo monté la junta de hule de silicón y

TABLA 4

## Formación de los geles de poliacrilamida-SDS

Gel	% de acril <sup>b</sup>	Soluciones añadidas (ml) <sup>a</sup>						
		A	B	C	D	H <sub>2</sub> O	E	F
separador	10.0	2.0	1.53	-	0.025	2.4	0.003	0.054
concentrador	5.25	0.35	-	0.26	0.20	1.35	0.001	0.010

<sup>a</sup>Contenido de cada solución : (A) acrilamida-bis al 30%, (B) Tris-HCl 3 M pH 8.8, (C) Tris-HCl 0.49 M pH 6.8, (D) SDS al 10%, (E) TEMED, (F) Persulfato de amonio al 10%

<sup>b</sup>Porcentaje de acrilamida en el gel

sujeté con las abrazaderas la placa de vidrio con el gel. Luego llené el tanque superior con el amortiguador de corrida 1X y verifiqué que no se fugara hacia el tanque inferior.

Con una jeringa de 5 ml con aguja 22, lavé tres veces cada una de las hendiduras para muestras con el amortiguador de corrida y eliminé las burbujas que estuvieran presentes. Luego agregué el amortiguador de corrida 1X al tanque inferior.

#### 4. Preparación de muestras

Diluí las muestras de proteínas con el amortiguador apropiado para obtener la concentración adecuada en los volúmenes que iba a analizar. Preparé cada vez diluciones de las muestras de proteínas hasta el momento en que los geles ya estuviesen montados y el amortiguador de corrida colocado en los compartimentos superior e inferior de la cámara.

Mezclé las muestras diluidas con un volumen igual de amortiguador de muestras 2X en tubos Eppendorf de 0.5 ml, que tapé perfectamente y luego los coloqué en un baño de agua hirviendo 3 min en un soporte circular de unicel.

Con una jeringa Hamilton de 25  $\mu$ l coloqué cada muestra en la hendidura correspondiente del gel superior. Enjuagué, con amortiguador de corrida la jeringa tres veces entre muestras.

#### 5. Corrida electroforética

Inicié la corrida de las muestras a voltaje constante (60 V) por 10 min. Una vez que las muestras habían penetrado al gel, aumenté el potencial a 120 V. El tiempo de corrida para la

cámara Mini-Ephortec fue de 2.5 h.

#### 6. Tinción de los geles

En un recipiente de plástico coloqué un volumen suficiente de colorante de Fairbanks para cubrir el gel, que dejé teñir toda la noche.

Después retiré el colorante, enjuagué el gel con agua corriente, lo sumergí en solución desteñidora rápida por 20-30 min y luego lo cambié a ácido acético al 7.5% por otros 20 min. Finalmente, eliminé el ácido acético con varios cambios de agua.

#### 7. Secado de los geles

Puse cada gel sobre una placa de vidrio y agregué con una pizeta un poco de agua en la superficie para evitar que el gel se secase.

Luego coloqué cuidadosamente una hoja de papel celofán Bio-Rad, de tamaño adecuado, sobre la superficie del gel. Una vez adherido el celofán al gel agregué bastante agua para evitar que el celofán se arrugara durante el secado del gel. Luego, por inversión de la placa de vidrio, eliminé el exceso de agua y separé cuidadosamente el gel.

Coloqué luego el papel celofán sobre la base del secador de geles (Gel Slab Dryer), con el gel hacia arriba. Cubrí el gel con la mica y con la cubierta de hule del secador. Puse hielo seco en la trampa intermedia del secador, que estaba conectada a una trampa de vacío (Felisa, Modelo 1400); verifiqué el nivel de aceite de la bomba, la encendí, abrí al

máximo el tornillo que regula la presión y encendí la campana extractora con la ventana cerrada en la que se encontraba la manguera escape de la bomba de vacío para eliminar el humo de ésta. Sellé el espacio del gel presionando ligeramente sobre toda la superficie el hule del secador para que se hiciera el vacío. Seleccioné el tiempo de secado en el aparato (30 min). Al terminar apagué la bomba, eliminé el hielo seco sobrante del recipiente de la trampa y lo sequé perfectamente.

#### 8. Regeneración de las soluciones con carbón activado

El ácido acético y la solución desteñidora rápida pueden volver a ser utilizadas después de regenerarse con carbón activado, que se agrega a los recipientes donde guardamos estas soluciones.

### F. Obtención de la fracción de inmunoglobulinas del suero de mieloma

#### 1. Precipitación con sulfato de amonio saturado al 50%

Para obtener la fracción de las inmunoglobulinas del suero de mieloma realicé una precipitación con sulfato de amonio. A 12 ml del suero total de mieloma añadí un volumen igual de sulfato de amonio saturado al 100% y dejé reposar la mezcla 24 h a 4°C en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml (Sorvall No. Cat. 03934). Luego centrifugué la mezcla en el rotor SS34 a 10,000 rpm (11,593 X g) por 10 min a temperatura ambiente. Descarté el

sobrenadante con una pipeta Pasteur y disolví la pastilla ( $\approx 1$  ml) con 2 ml de PB 10 mM pH 6.

## 2. Diálisis de la fracción precipitada

Coloqué la pastilla ya disuelta en una bolsa de diálisis Spectrapore de 6 mm de diámetro y la dialicé contra 150 ml de PB 10 mM pH 6 (4 veces, 4 h por cambio). Coloqué el dializado ( $\approx 2$  ml) en un vial de vidrio de 5 ml y lo guardé a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 3. Cuantificación de proteínas de la fracción precipitada

Para saber el contenido de la fracción precipitada, hice diluciones 1:20 y 1:25 de la muestra del precipitado dializado con PB 10 mM pH 6 y en ellas determiné las proteínas con el método de Bradford.

## G. Prueba de la unión de la fracción de inmunoglobulinas a la DEAE-c

### 1. Lavado, activación y equilibrio de la resina

Pesé 3 g de DEAE-c y los hidraté con 45 ml de agua bidestilada. Dejé reposar la mezcla en una probeta graduada y descarté por decantación el líquido sobrenadante. Luego mezclé la DEAE-c hidratada con 45 ml de HCl 0.5 M, dejé reposar la mezcla 30 min y descarté el sobrenadante por decantación. Lavé la resina tres veces en un embudo Buchner con algodón (a manera de filtro), primero con 150 ml de PB 10 mM pH 6, luego con 45 ml de NaOH

0.5 M y finalmente con 150 ml de PB 10 mM pH 6. Coloqué la resina en una probeta graduada y aforé a 45 ml con PB 10 mM pH 6. La resina activada y equilibrada quedó suspendida a 3 g/45 ml ( $\approx 67$  mg/ml) para determinar su capacidad de unir proteínas.

## 2. Condiciones de unión de la IgA a la DEAE-celulosa

### a. Efecto del pH

Para determinar el pH al cual la IgA del suero de mieloma se unía o no a la resina, activé aproximadamente 7 ml de DEAE-c y la equilibré a pH 7.0 (3 lavados con 10 ml de PBS 10 mM/NaCl 38 mM pH 7.0). Luego centrifugué la mezcla 2 min a 160 X g en la centrífuga CRU (cabezal 269) y descarté la mayor parte del sobrenadante por aspiración. Después coloqué 1 ml de la suspensión de DEAE-c en cada uno de 7 tubos Eppendorf de 1.5 ml, los centrifugué 1 min a 15,600 Xg en la centrífuga Eppendorf para empacar la resina, descarté el sobrenadante y equilibré la resina mediante 3 lavados con 1 ml de PBS de diferente pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5). En cada tubo igualé el volumen de PBS (1 ml) y añadí 50  $\mu$ l de la fracción de inmunoglobulinas obtenida a partir del suero de mieloma, mezclé bien e incubé 10 min agitando en el mezclador de alícuotas.

### b. Efecto de la concentración de NaCl

Coloqué 1 ml de resina activada, en cada uno de cuatro tubos Eppendorf de 1.5 ml. Empaqué la resina de cada tubo, la equilibré con PBS 10 mM pH 6.0 que contenía concentraciones

variables de NaCl (10, 20, 30 y 40 mM), mezclé bien, e incubé 20 min con agitación constante. Finalmente separé los sobrenadantes por centrifugación y en ellos determiné las proteínas.

### c. Efecto de la cantidad de proteína

En cinco tubos Eppendorf coloqué respectivamente 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ l de la suspensión de DEAE-c. A un tubo que no contenía DEAE-c agregué 60  $\mu$ l (820  $\mu$ g de proteínas) de la fracción del suero precipitada con sulfato de amonio y dializada, aforé a 1 ml con PB 10 mM pH 6 (dilución 1:16.67) y determiné la  $DO_{280}$  en una celdilla de cuarzo de 1 cm de vía óptica (1 u  $DO_{280}$  = 0.737 mg de proteínas/ml). A los tubos que contenían 20-100  $\mu$ l de la suspensión de DEAE-c agregué también 60  $\mu$ l de la fracción dializada (i.e. 820  $\mu$ g de proteínas) y dejé reposar 30 min a temperatura ambiente. Luego centrifugué los tubos a 15,600 X g por 6 min a temperatura ambiente, aspiré los sobrenadantes ("SN 1") y los puse en tubos Eppendorf limpios; repuse 1 ml de PB 10 mM pH 6 a los tubos que contenían cantidades variables de resina sedimentada, mezclé bien, y volví a centrifugar los tubos. Aspiré los sobrenadantes ("SN 2") de cada tubo, los reuní con los sobrenadantes correspondientes previos ("SN 1") y leí la  $DO_{280}$  de las mezclas, cuyo volumen total fue 2 ml.

## H. Purificación de la IgA del suero de mieloma

### 1. Preparación de la cromatografía en columna de DEAE-c

#### a. Empacado de la columna y equilibrio de la resina

Mezclé 5 ml de DEAE-c previamente hidratada, activada y equilibrada, con 5 ml de PB 10 mM pH 6 y coloqué la mezcla en una columna de vidrio Bio-Rad (0.7 cm de diámetro, 16 cm de largo) hasta una altura de 12 cm (i.e. 4 ml de lecho de DEAE-c). Conecté un tubo Tygon (0.3 cm de diámetro) en el extremo inferior de la columna. Para empacar la resina, conecté el tubo a la bomba peristáltica y dejé fluir 50 ml de PB 10 mM pH 6 por la parte superior de la columna, cuidando que la altura de la DEAE-c se conservara en 12 cm. Ya empacada la columna, dejé pasar el eluyente a 12 gotas/min (i.e.  $\approx 0.75$  ml/min) durante 1 h.

#### b. Dispositivo de la cromatografía

La disposición de los reservorios con amortiguadores, tubería, columna cromatográfica, bomba peristáltica, absorciómetro y colector de fracciones se muestra en la Fig.

1. Como reservorio de los amortiguadores para la elución utilicé botellas de polipropileno de 125 ml. Ajusté la bomba peristáltica en la posición 1, con el switch para la dirección hacia adelante. En el colector de fracciones coloqué 80 tubos Eppendorf de 1.5 ml sostenidos en la boca de tubos de ensayo de 5 ml. La DO fue registrada continuamente con un absorciómetro Uvicord

con filtro de 279 nm, acoplado a un registrador LKB cuyo papel corría a 20 mm/h.

## 2. Cromatografía en DEAE-c

### a. Aplicación de la muestra

Para descartar las partículas de las muestras, centrifugué la fracción dializada de inmunoglobulinas a 15,600 X g por 1 min a temperatura ambiente; luego con una pipeta Pasteur aspiré el sobrenadante y apliqué cuidadosamente 2 ml del mismo a la superficie de la columna de DEAE-c sin dejarla secar y cuidando que no escurriera por las paredes.

### b. Condiciones de la cromatografía

Una vez aplicada la muestra, conecté la parte superior de la columna con un tubo Tygon (cerrado con una pinza hemostática) y sumergí el extremo libre del tubo en un recipiente con PB 10 mM pH 6.0. Eluí a 12 gotas por minuto (i.e.  $\approx 80 \text{ ml/h/cm}^2$ ) y colecté fracciones de 16 gotas ( $\approx 1 \text{ ml}$ ). El volumen del regulador que mantuve sobre la superficie de la resina fue de 2 ml. Cambié de amortiguadores en el siguiente orden (número de fracciones de 1 ml entre paréntesis): PB 10 mM pH 6 (7 fracciones), PB 10 mM/NaCl 38 mM pH 7 (8 fracciones), PB 10 mM/NaCl 50 mM pH 8 (6 fracciones) y PB 10 mM/NaCl 100 mM pH 8 (7 fracciones).

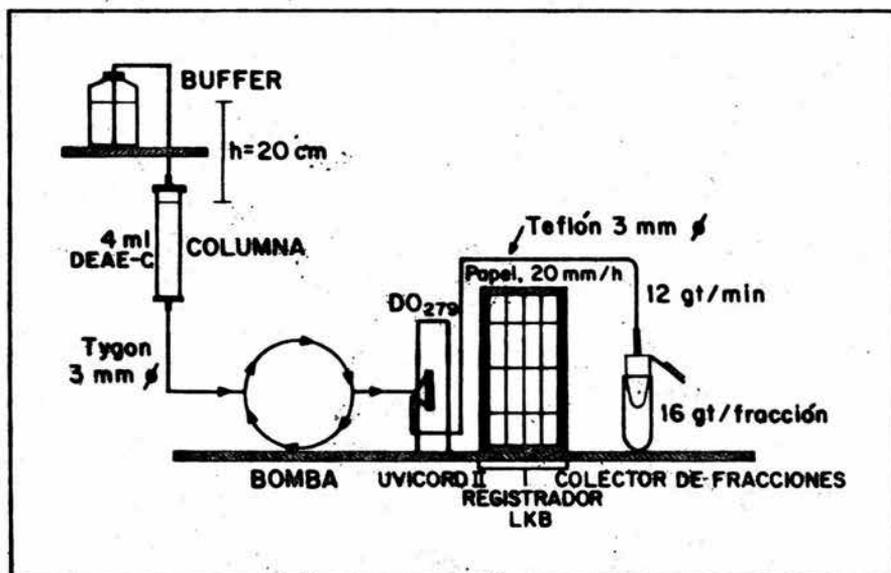


Fig. 1. Diagrama de la cromatografía en DEAE-c. El tapón de la parte superior de la columna de DEAE-c estaba conectado a un tubo cuyo extremo libre se encontraba sumergido en un recipiente con el amortiguador de elución correspondiente. La salida (extremo inferior) de la columna estaba conectada sucesivamente con la bomba peristáltica y el Uvicord II y descargaba en el colector de fracciones.

### c. Preservación de la resina

A cada 100 ml del amortiguador de elución añadí 1 ml de azida de sodio al 2% y equilibré la columna con el equivalente de tres volúmenes de lecho (140 ml). Guardé la columna sellada indefinidamente en el cuarto frío.

### 3. Análisis de las fracciones cromatográficas

#### a. Reunión, diálisis y concentración de las fracciones

Reuní las fracciones correspondientes a los picos obtenidos con cada amortiguador y luego las dialicé dos veces contra 150 ml de PB 10 mM pH 7.0 en tubos de 5/8 in de diámetro, durante 6 h por cambio. Luego aspiré con una pipeta Pasteur el dializado de cada tubo, lo coloqué en viales de vidrio con tapón de rosca (Wheaton 225288) y lo congelé por inmersión en hielo seco-acetona:alcohol (1:1). Cubrí la boca de los viales con Parafilm (al cual hice varias perforaciones con una aguja) y los coloqué dentro de vasos de liofilización Labconco (120 ml) con sus respectivos filtros. Inmediatamente después enchufé los vasos a la liofilizadora (Virtis, Modelo 1046 MRBA), para evitar que las muestras se descongelaran. Liofilicé las muestras durante 6 h. Al terminar, cerré el sistema de vacío de la liofilizadora, desenchufé los vasos lentamente y coloqué los tapones a los viales que contenían las muestras liofilizadas. Guardé las muestras secas a -20°C.

#### b. Inmunodifusión radial

Taré cuatro tubos Eppendorf de 1.5 ml en la balanza

analítica (peso promedio = 1.1 g), y coloqué en cada uno las proteínas de cada pico obtenido de la cromatografía para saber el peso seco de las proteínas liofilizadas.

Por otro lado, preparé un gel de agarosa al 1.5% en el que perforé pozos de 3 mm de diámetro en la parte central y seis alrededor, dispuestos regularmente. En el pozo central coloqué suero de conejo anti IgA (1 mg/ml) y en los periféricos muestras de 10  $\mu$ l (i.e. 20  $\mu$ g de proteínas) de los picos A, B, C y D, e incubé los geles en una cámara hermética y húmeda por 24 h a 37°C.

#### I. Cultivo de P. aeruginosa

En condiciones asépticas, con un asa de nicromel tomé una colonia de P. aeruginosa PA $\phi$ 1 que estrié en agar de soya tripticaseína e incubé a 37°C durante 18 h.

#### J. Concentración de los antisueros anti-IgA de mayor título

##### 1. Precipitación con sulfato de amonio

###### a. Obtención del precipitado

Mezclé 3 ml de los dos sueros de conejos inmunizados con sIgA (llamados C80 y C88) con 3 ml de sulfato de amonio saturado al 100% en botellas de polipropileno con tapón de rosca (50 ml), incubé las mezclas 24 h a 4°C, que luego centrifugué en el rotor SS34 a 10,000 rpm (11,953 X g) por 10 min a

temperatura ambiente. Descarté el sobrenadante con una pipeta Pasteur y añadí a cada pastilla 1 ml de PBS 10 mM pH 7.2.

#### b. Diálisis

Dialicé dos veces sucesivas (en un tubo Spectrapore de 6 mm de diámetro) la fracción precipitada y redisuelta contra 100 ml de PBS 10 mM pH 7.2 (4 h/cambio). Guardé los dializados a  $-20^{\circ}\text{C}$  en frascos de vidrio de 5 ml.

#### c. Cuantificación de proteínas

Cuantifiqué las proteínas con el método de Bradford.

### 2. Titulación de los antisueros concentrados

Realicé una inmunodifusión radial de sIgA contra las fracciones de los antisueros C80 y C88 que habían sido precipitados con sulfato de amonio y dializados. Perforé los geles de agarosa, diluí los antisueros en Tris-HCl 15 mM pH 8.6 (diluciones dobles seriadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) y coloqué en los pozos periféricos 10  $\mu\text{l}$  de cada dilución de la fracción precipitada y dializada de los sueros C80 o C88 y en los pozos centrales 10  $\mu\text{l}$  de sIgA de saliva total (2 mg/ml) diluida en PBS 10 mM pH 7.2. Incubé los geles a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante 18 h, observé las bandas de precipitación con iluminación indirecta y teñí los geles con azul de Coomassie.

## K. Efecto de la incubación de IgA<sub>1</sub> y sIgA con P. aeruginosa PA $\phi$ 1

### 1. Incubación

Coloqué una asada de una colonia de P. aeruginosa PA $\phi$ 1 (de aproximadamente 2 mm de diámetro y 18 a 20 h de crecimiento) en tubos Eppendorf de 500  $\mu$ l que contenían 50  $\mu$ l de IgA de saliva (3.2 mg/ml) o 50  $\mu$ l de IgA<sub>1</sub> de mieloma (4 mg/ml) diluida en Tris-HCl 15 mM pH 8.0; como controles negativos utilicé tubos con 50  $\mu$ l de IgA de saliva y 50  $\mu$ l de IgA de mieloma que incubé simultáneamente en ausencia de bacterias durante 24 o 50 h a 37°C.

### 2. Inmunoelectroforesis

#### a. Electroforesis

Después de 24 y 50 h de incubación, coloqué los tubos Eppendorf que contenían las mezclas de bacterias con sIgA o IgA<sub>1</sub> dentro de tubos Eppendorf de 1.5 ml (a manera de camisas) para obtener el sobrenadante.

En el centro de tres geles de agarosa al 1.5% en Tris-HCl 15 mM pH 8.6 y de otros tres geles en Tris-HCl 15 mM/CaCl<sub>2</sub> 18 mM pH 8.6 hice dos pozos de 3 mm de diámetro separados 9 mm entre sí. En el pozo superior de cada uno de los geles coloqué 10  $\mu$ l de IgA de saliva o IgA<sub>1</sub> no tratadas y en el inferior el sobrenadante de las mezclas de bacterias incubadas con sIgA o IgA<sub>1</sub>. En los compartimentos del aparato de electroforesis agregué 650 ml de Tris-HCl 15 mM pH 8.6 solo o suplementado con CaCl<sub>2</sub>.

18 mM, según el gel.

Conecté los geles al amortiguador mediante almohadillas de algodón (3 X 10 cm) cosidas con gasa y colocadas en cada extremo de los portaobjetos. Inicié la corrida con 25 V por 10 min y luego apliqué 100 V durante otros 50 min.

#### b. Incubación con antisueros

Al terminar la corrida hice un surco longitudinal en cada gel, que llené con 100  $\mu$ l de la fracción de inmunoglobulinas de conejo anti-IgA humana (suero C88). Puse los geles en cajas de Petri sobre papel húmedo y los incubé 24 h a 37° C.

#### c. Observación de los arcos de precipitación

Observé los arcos de precipitación con iluminación indirecta.

#### d. Tinción y secado de los geles

Teñí los geles con Azul de Coomassie R-250 al 0.5% en etanol-ácido acético-agua.

### L. Patrón electroforético de cantidades variables de IgA<sub>1</sub> incubada con P. aeruginosa

#### 1. Incubación

Coloqué una asada de una colonia de P. aeruginosa en un

tubo Eppendorf que contenía 50  $\mu$ l de IgA de mieloma (4 mg/ml) diluida en Tris-HCl 15 mM pH 8.0. Como controles negativos utilicé tubos con una colonia de *P. aeruginosa* o 50  $\mu$ l de IgA<sub>1</sub> que diluí en 50  $\mu$ l de Tris-HCl pH 8.0. Incubé las muestras 24 h a 37° C en la estufa Thelco. Finalmente almacené las muestras a -20° C antes de usarlas.

## 2. Análisis de las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Descongelé las muestras y las centrifugué a 15,600 X g durante 4 min a temperatura ambiente. Hice diluciones dobles seriadas 1:2, 1:4, 1:8 de la IgA<sub>1</sub> incubada con PA $\phi$ 1 (ver Tabla 5). Preparé las muestras para la corrida electroforética, y realicé la corrida. Al finalizar ésta, teñí el gel con colorante de Fairbanks.

## 3. Inmunolectroforesis

Después de la incubación, realicé una inmunolectroforesis como ya mencioné anteriormente. En el pozo superior de un gel de agarosa coloqué 10  $\mu$ l de IgA<sub>1</sub> (4 mg/ml) y en el inferior el sobrenadante de la mezclade bacterias incubadas con IgA e inicié la corrida electroforética con 25 V por 10 min y luego 100 V los 50 min restantes.

TABLA 5

Diluciones de IgA<sub>1</sub>

Dilución	$\mu$ l	Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF	Proteína (mg/ml)
Original	20	-	1	4
1:2	10	10	2	2
1:4	10	10	4	1
1:8	10	10	8	0.5

#### M. Cinética de la fragmentación de la IgA<sub>1</sub> por la incubación con P. aeruginosa

Como en experimentos anteriores, en cuatro tubos Eppendorf que contenían 50  $\mu$ l de IgA<sub>1</sub> de mieloma (4 mg/ml) coloqué una colonia de P. aeruginosa e incubé durante 3, 6, 12 y 24 h en la incubadora Thelco a 37°C; como controles negativos utilicé tubos con una colonia de P. aeruginosa o IgA diluídas en 50  $\mu$ l de Tris-HCl 15 mM pH 8.0 que incubé simultáneamente con los que contenían las mezclas de IgA<sub>1</sub> con bacterias durante 24 h. Almacené las muestras a -20°C antes de usarlas y finalmente las analicé en un gel de poliacrilamida-SDS.

Una vez teñido y secado el gel, estudié el patrón electroforético y obtuve el peso molecular de cada una de las bandas observadas.

#### N. Actividad de la proteasa extracelular principal de P. aeruginosa

##### 1. Ensayo de la actividad proteolítica de la papaína

##### a. Prueba de concentraciones variables de agar y caseína para el ensayo proteolítico en placa

Preparé agar al 2.4% con caseína 10%, y realicé las mezclas en tubos de ensayo en el orden anotado en la tablas 6 y 7. Inmediatamente después vacié 5 ml de cada mezcla en cajas de Petri de 60 mm, dejé solidificar el

TABLA 6

Prueba de concentraciones variables de agar para ensayo proteolítico en placa

Caja	Concn de agar (%)	Adiciones por caja	
		Agar al 2.4% <sup>a</sup> (ml)	H O (ml)
1	0.6	1.5	4.5
2	0.8	2.0	4.0
3	1.0	2.5	3.5
4	1.2	3.0	3.0

<sup>a</sup>Fundido

TABLA 7

**Prueba de diferentes concentraciones de caseína para ensayo proteolítico en placas de agar<sup>a</sup>**

caja	Concn caseína %	Adiciones por caja		
		Agar al 2.4% (ml)	Caseína al 10% (ml)	H O (ml)
1	0.16	0.1	2.9	3
2	0.5	0.3	2.7	3
3	1.0	0.6	2.4	3
4	1.5	0.9	2.1	3

<sup>a</sup>Concentración final: 1.2%

agar, probé la consistencia del medio con un sacabocados conectado al vacío y observé la turbiedad del agar dada por la caseína.

b. Preparación de placas con agar al 1.2%-caseína al 1%

Disolví 0.5 g de Casec en 5 ml de Tris-HCl 15 mM pH 8.0 o en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (Caseína al 10%). Por separado, en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, disolví 0.6 g de agar bacteriológico en 45 ml del mismo amortiguador. Fundí la mezcla en el horno de microondas a máxima intensidad con periodos intermitentes de 3 seg; inmediatamente después agregué la caseína disuelta al agar ya fundido y vacié 5 ml de la mezcla en cada una de 10 cajas de Petri de 60 mm. Guardé las cajas a 4°C no más de una semana.

c. Ensayo proteolítico

Puse a incubar 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml que contenían 200  $\mu$ l de las mezclas de reacción (papaína a 2 o 4 mg/ml con cisteína 5 mM-EDTA 2 mM) durante 1 h en un baño a 36°C. Luego realicé diluciones dobles seriadas de las mezclas por duplicado (Tablas 8 y 9).

En cada una de las cajas de agar-caseína de 60 mm hice cinco pozos de 3 o 4 mm con un sacabocados conectado al vacío. Coloqué 10  $\mu$ l de cada una de las diluciones de papaína activada (4 mg/ml) a pozos de 3 mm de diámetro y 20  $\mu$ l de las diluciones de papaína (2 mg/ml) a pozos de 4 mm. Finalmente, incubé las cajas a 37°C durante 20 h en la incubadora Thelco.

TABLA 8

Diluciones de papaína activada para el ensayo proteolítico en placas de agar

Pozo	Adiciones		H O ( $\mu\text{l}$ )	PDF <sup>b</sup>	Papaína ( $\mu\text{g}$ )
	Papaína activada $\mu\text{l}$	(diln)			
1, 1'	100	(1:1) <sup>a</sup>	-	1	20
2, 2'	50	(1:1)	50	2	10
4, 4'	50	(1:2)	50	4	5
8, 8'	50	(1:4)	50	8	2.5
16, 16'	50	(1:8)	50	16	1.25

<sup>a</sup>1 mg/ml

<sup>b</sup>Factor de dilución final

TABLA 9

Diluciones de papaína activada para un ensayo proteolítico en placas de agar

Pozo	Adiciones		H O ( $\mu$ l)	FDF <sup>b</sup>	Papaína ( $\mu$ l)
	Papaína activada $\mu$ l	(diln)			
1, 1'	50	(1:1)	-	1	20
2, 2'	25	(1:1)	25	2	10
4, 4'	25	(1:2)	25	4	5
8, 8'	25	(1:4)	25	8	2.5
16, 16'	25	(1:8)	25	16	1.25

<sup>a</sup>2 mg/ml en la solución original

<sup>b</sup>Factor de dilución final

d. Observación y medida de los halos

Medí el diámetro de los halos de hidrólisis sobre la cara externa de las bases de las cajas con agar-caseína iluminados a través de luz indirectamente con una regla de Mancini.

2. Actividad de la proteasa de P. aeruginosa

a. Cultivo de P. aeruginosa

En condiciones asépticas, coloqué una asada de un cultivo de P. aeruginosa en agar inclinado en dos matraces Erlenmeyer con 50 ml de caldo nutritivo estéril. Dejé crecer las bacterias toda la noche a 30°C en un baño New-Brunswick con agitación constante.

b. Separación de bacterias y medios de cultivo

Coloqué el cultivo de P. aeruginosa en tubos para el rotor SS-34 y centrifugué a 11, 953 X g durante 10 min a temperatura amb. Decanté el sobrenadante y coloqué muestras de 3 ml en tubos Falcon de 5 ml. El paquete bacteriano lo resuspendí en 1 ml de Tris-HCl 15 mM pH 8.0 y coloqué muestras de 500 µl en tubos Eppendorf. Almacené las muestras a -20°C.

c. Ensayo proteolítico

Preincubé cajas de agar-caseína previamente preparadas durante 1 h a 37° C (en la incubadora Thelco) con las tapas hacia abajo. Luego hice 12 pozos de 3 mm de diámetro a dos de éstas y por último realicé diluciones

TABLA 10

Diluciones del medio de cultivo usado por *P. aeruginosa* (PA $\phi$ 1) para ensayo proteolítico en placas de agar

Pozo	Adiciones		Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF <sup>a</sup>	Diám <sup>b</sup> (mm)
	Medio usado $\mu$ l	(diln)			
1,1'	60	(1:1)	0	1	11.5
3,3'	20	(1:1)	40	3	9
9,9'	20	(1:3)	40	9	6
27,27'	20	(1:9)	40	27	4
81,81	20	(1:27)	40	81	-

<sup>a</sup>Factor de dilución final

<sup>b</sup>Diámetro del halo de proteólisis

dobles seriadas por duplicado del sobrenadante obtenido del medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1 (Tabla 10) y del paquete bacteriano y coloqué 10  $\mu$ l de cada una de las diluciones a los pozos. Incubé las cajas a 37°C durante 20 h. Al terminar el ensayo medí el diámetro de los halos de hidrólisis con una regla de Mancini.

## 0. Obtención de la proteasa de IgA

### 1. Actividad proteolítica del medio de cultivo usado por P. aeruginosa sobre IgA<sub>1</sub>

Detecté la actividad de corte de la IgA<sub>1</sub> ocurrida durante la incubación con el medio de cultivo usado por P. aeruginosa mediante inmunolectroforesis. En el pozo superior del gel de agarosa coloqué 10  $\mu$ l de IgA<sub>1</sub> de mieloma (2 mg/ml) y en el pozo inferior, una mezcla de IgA<sub>1</sub> incubada (24 h a 37°C) con el medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1.

### 2. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio del medio de cultivo usado

A siete tubos Eppendorf añadí 10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 mg de sulfato de amonio, luego agregué a cada tubo 100  $\mu$ l de medio de cultivo usado y centrifugado (Tabla 11). Disolví todas las mezclas e incubé a 4°C durante toda la noche.

Centrifugué los tubos que contenían la mezclas a 15, 600 X g durante 4 min a temperatura amb. Preincubé 2 cajas de

TABLA 11

Precipitación con sulfato de amonio de la actividad proteolítica del medio usado por *P. aeruginosa*

Tubo	Medio usado ( $\mu$ l)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mg) <sup>a</sup>	Diám <sup>a</sup> (mm)
1	100	-	10.1
2	100	10	11.4
3	100	20	9.6
4	100	30	9.0
5	100	40	-
6	100	50	-
7	100	60	-
8	100	70	-

<sup>a</sup>Diámetro del halo de proteólisis

agar caseína por 1 h a 37°C e hice ocho pozos de 3 mm en cada una. Por duplicado, coloqué 10 µl del sobrenadante del medio de cultivo tratado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio a cada pozo. Incubé las cajas a 37° C durante 20 h y al terminar medí el diámetro de los halos de hidrólisis.

### 3. Obtención de la fracción (P<sub>30-40</sub>) enriquecida en actividad proteolítica

#### a. Enriquecimiento de la actividad proteolítica principal

A 90 ml de medio de cultivo fresco usado por *P. aeruginosa* añadí 27 g de sulfato de amonio (Tabla 12). Incubé la mezcla en tubos Falcon a 4°C durante toda la noche, y luego la centrifugué en el rotor SS-34 a 26, 895 X g durante 20 min a 4° C. Decanté el sobrenadante (S<sub>30</sub>) y diluí la pastilla (P<sub>30</sub>) en 100 µl de Tris-HCl 15 mM pH 8.6. Guardé la fracción P<sub>30</sub> en un tubo Eppendorf de 500 µl y 5 ml del sobrenadante (S<sub>30</sub>) en dos tubos Falcon de 5 ml a -20° C. Al resto (100 ml) le agregué 13 g de sulfato de amonio e incubé a 4°C durante toda la noche. Volví a centrifugar la mezcla, obtuve las fracciones S<sub>30-40</sub> y P<sub>30-40</sub> y repetí los mismos pasos realizados para obtener las fracciones anteriores.

#### b. Lisis del paquete bacteriano

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml coloqué 500 µl de la pastilla resuspendida en Tris-HCl 15 mM pH 8.6 y agregué 500 µl de regulador de muestras 2X (RM 2X). Tomé la

TABLA 12

Precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  del medio de cultivo usado por *P. aeruginosa* PA01

Tubo	Medio usado (ml)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
		Adiciones (g)	Concn (g/100 ml)
1	90	27	30
2	100	+13	40

mezcla bacterias-RM 2X con una jeringa con aguja de 20 X 32 mm y luego la cambié por una de 25 X 16 mm. Pasé con fuerza la mezcla a través de la aguja, repetí la operación varias veces hasta que ésta perdió su viscosidad y la sujeté 3 min a ebullición. Almacené a  $-20^{\circ}\text{C}$  el lisado hasta antes de usarlo.

#### c. Análisis de las fracciones y las bacterias lisadas

Determiné las proteínas de las fracciones obtenidas de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio y del medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1 (Tabla 24). Luego analicé las mismas en un gel de poliacrilamida-SDS, calculé los pesos moleculares de las bandas presentes y finalmente realicé un ensayo proteolítico en el cual utilicé diluciones dobles seriadas del medio de cultivo usado (MCU), de las fracciones P<sub>30</sub>, S<sub>30</sub>, P<sub>30-40</sub> y S<sub>30-40</sub> como indico en las tablas 25, 26, 27 28 y 29.

#### 4. Tratamiento con PMSF de lisado de P. aeruginosa

Resuspendí en 5 ml de Tris-HCl 15 mM pH 8.6 la pastilla bacteriana obtenida de un cultivo de P. aeruginosa de 100 ml. En cinco tubos Eppendorf de 500  $\mu\text{l}$  coloqué 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de bacterias, centrifugué a 15,600 X g y descarté el sobrenadante. Por separado realicé diluciones de PMSF 100 mM (1:10, 1:20, 1:40 y 1:80) en el mismo amortiguador y luego agregué RM 2X (Tabla 13). Finalmente agregué 100  $\mu\text{l}$  de RM 2X al tubo control y 100  $\mu\text{l}$  de PMSF diluido y suplementado con RM 2X a los tubos que contenían las muestras

TABLA 13

Prueba de diferentes diluciones de PMSF 100 mM para determinar su efecto como inhibidor de la proteasa de *P. aeruginosa* PAØ1 en geles de poliacrilamida-SDS

Tubo	PMSF		Tris-HCl 15 mM pH 8		FD <sup>a</sup>	RM 2X <sup>b</sup> ( $\mu$ l)	FDF <sup>c</sup>	Concn final (mM)
	Dilución	$\mu$ l	$\mu$ l	( $\mu$ l)				
1	1:1	30	120	5	75	10	10	
2	1:5	75	75	10	75	20	5	
3	1:10	75	75	20	75	40	2.5	
4	1:20	75	75	40	75	80	1.75	
5	1:40	75	75	80	75	160	0.62	

<sup>a</sup>Factor de dilución

<sup>b</sup>Regulador de muestras 2X

<sup>c</sup>Factor de dilución final

problema.

5. Efecto de cantidades variables de la fracción P<sub>30-40</sub> y del tiempo de incubación sobre la fragmentación de IgA<sub>1</sub>

Incubé simultáneamente a 37°C durante 24 h, a una mezcla con 50 µl de IgA<sub>1</sub> (8 mg/ml) con 50 µl de la fracción P<sub>30-40</sub>, y a 50 µl de IgA<sub>1</sub> (4 mg/ml) diluida en Tris-HCl 15 mM pH 8.0. En el pozo superior de un gel de agarosa coloqué 10 µl de la IgA<sub>1</sub> (a 4 mg/ml) y en el inferior 10 µl de la mezcla de IgA<sub>1</sub> incubada con P<sub>30-40</sub> y realicé una inmunolectroforesis.

Por separado, en cinco tubos Eppendorf de 500 µl coloqué 5 µl de IgA (8 mg/ml) con 5 µl de diluciones de la fracción P<sub>30-40</sub> (Tabla 14); como control utilicé IgA (4 mg/ml) diluida en Tris-HCl 15 mM pH 8.0. Incubé las mezclas 1 h a 37°C, y finalmente, las analicé en un gel de poliacrilamida-SDS.

TABLA 14

Diluciones de la fracción P<sub>30-40</sub> para determinar su efecto sobre la fragmentación de IgA

Tubo	Fracción P <sub>30-40</sub>		Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF <sup>a</sup>
	Dilución	$\mu$ l		
1	1:1	12	-	1
2	1:1	6	6	2
3	1:2	6	6	4
4	1:4	6	6	8

<sup>a</sup>Factor de dilución final

## IV. RESULTADOS

### A. Montaje del método de precipitación con jacalina

La jacalina es una lectina de las semillas de *A. heterophyllus* (Kobayashi y cols., 1985) y *A. integrifolia* (Bunn-Moreno y Campos-Neto, 1981) que precipita tanto a la IgA del suero como a la IgA secretoria (Roque Barreira y Campos Neto, 1985).

La jacalina reconoce y se une a residuos de D-galactosa y precipita exclusivamente a la IgA<sub>1</sub> porque solamente esta subclase de IgA contiene (en la región de la bisagra) cinco residuos de serina a los que se unen covalentemente 1-D-N-acetilgalactosamina (Baezinger y Kornfeld, 1974; Kobayashi y cols., 1985).

Como requería purificar la IgA<sub>1</sub> de suero de mieloma para emplearla como sustrato en este trabajo, resolví montar un método de identificación de la IgA<sub>1</sub> utilizando jacalina con la técnica de doble difusión en geles de agarosa (Kobayashi y cols., 1985).

#### 1. Experimento preliminar

Inicialmente supuse que la concentración apropiada de proteínas séricas y de jacalina debería de ser de 10 mg/ml (Kobayashi y cols., 1985), de manera que la relación jacalina/proteínas séricas fuese aproximadamente 1:1. Al contrario de lo que esperaba, en este experimento preliminar

no hubo precipitación del suero humano normal.

Pensé que tal vez la falla del método residía en que la concentración de jacalina era insuficiente, porque Roque-Barreira y Campos Neto (1985) en el primer trabajo en el que caracterizaron la especificidad de la jacalina sobre  $IgA_1$ , encontraron que la lectina funcionaba óptimamente a una relación 8:1 (con respecto a las proteínas totales del suero) para efectuar la precipitación de la  $IgA_1$  en solución.

Por esta razón decidí aumentar la concentración de jacalina diez veces (a 100 mg/ml), para tener una relación aproximada de jacalina/proteínas séricas de 10:1. Monté entonces un sistema de ensayo similar al anterior, donde a los pozos periféricos agregué jacalina (concentración inicial de 100 mg/ml) en diluciones dobles seriadas. En el pozo central de los geles coloqué suero humano normal (SH) o saliva total (ST).

## 2. Concentración mínima de jacalina

Con la nueva concentración de jacalina sí obtuve bandas de precipitación con las muestras de SH y ST hasta la dilución 1:4 de jacalina (i.e. 25 mg/ml) (Fig. 2).

Con ST observé una sola banda de precipitación bien definida, pero con SH observé dos bandas paralelas de precipitación y una mancha difusa cercana al pozo, por lo que inferí que además de la  $IgA_1$  en el suero humano hay otros componentes menores que también reaccionan con la jacalina.

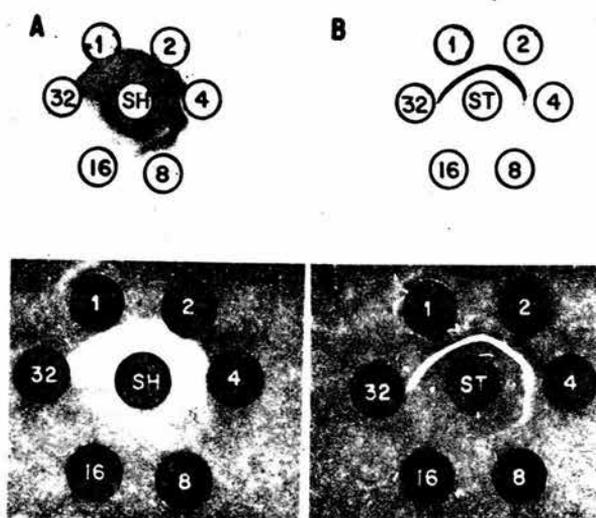


Fig 2. Precipitación del suero humano normal (SH) y saliva total (ST) con jacalina en placas de agarosa. Las concentraciones de jacalina y de proteínas de las muestras las anoté entre paréntesis. En los pozos centrales de A y C coloqué 10  $\mu$ l de SH (70 mg/ml). En los pozos centrales de B y D coloqué 10  $\mu$ l de ST (5.5 mg/ml). En los pozos periféricos coloqué 10  $\mu$ l de jacalina (100 mg/ml) en diluciones 1:1 (pozo 1), 1:2 (pozo 2), 1:4 (pozo 4), 1:8 (pozo 8), 1:16 (pozo 16) y 1:32 (pozo 32). A representa lo mismo que C y B lo mismo que D sólo que los geles A y B fueron secados y teñidos mientras que los geles C y D fueron observados con iluminación indirecta.

El método adecuado para obtener un buen precipitado de IgA<sub>1</sub>, requirió que la concentración de la lectina fuese de 100 mg/ml.

### 3. Precipitación de diversas muestras con jacalina

Una vez obtenidos los datos descritos, realicé otro experimento similar. En los pozos periféricos de los geles coloqué muestras de IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub> monoclonales puras y además SH, ST y suero de mieloma. Tal como lo esperaba, hubo bandas de precipitación con todas las muestras excepto con la de IgA<sub>2</sub> (Fig. 3).

Así ratifiqué el hallazgo de que la jacalina precipita IgA<sub>1</sub> pero no IgA<sub>2</sub> (Kobayashi y cols., 1985) y además encontré que el suero de mieloma probado parecía contener IgA<sub>1</sub>, porque dió la reacción positiva con jacalina.

### 4. Precipitación "espontánea" del suero de mieloma

En el experimento anterior me llamó la atención la formación de un anillo difuso de precipitación que apareció alrededor de las muestras de suero de mieloma a los 30 min de haberlas colocado. Por ello realicé luego varios experimentos adicionales para determinar la causa de dicha precipitación no debida a la jacalina.

Primero intenté ver si el anillo de precipitación "espontáneo" del suero de mieloma en geles de agarosa ocurría en ausencia de calcio y encontré que en geles preparados sin calcio no ocurrió el artefacto (Fig. 4).

A

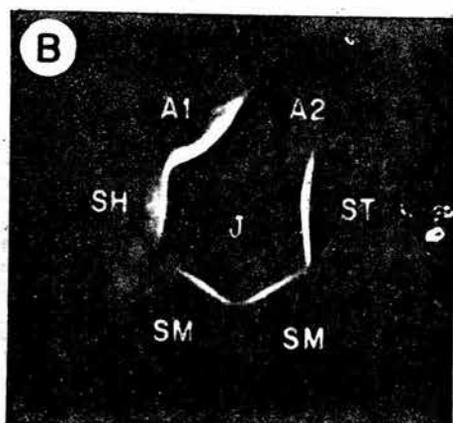
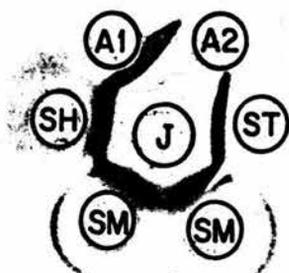


Fig 3. Precipitación de diversas muestras con jacalina (J). En los pozos centrales de A y B coloqué 10  $\mu$ l de jacalina (100 mg/ml). En los pozos periféricos coloqué 10  $\mu$ l de inmunoglobulina A (A1), de inmunoglobulina A (A2), de suero de mieloma (SM) y de suero humano normal (SH).

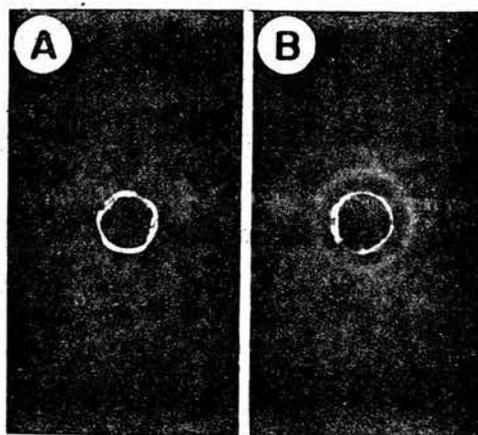


Fig 4. Precipitación "espontánea" del suero de mieloma. En los pozos de A y B coloqué 10  $\mu$ l de suero de mieloma (3.5 mg/ml). El gel B contenía  $\text{CaCl}_2$  18 mM; el gel A fue preparado en ausencia de calcio.

Analice luego si la precipitación de  $IgA_1$  con jacalina en geles de agarosa también ocurría en ausencia de calcio, para ver si en estas condiciones era posible eliminar el artefacto del suero de mieloma. Para ello hice un experimento de precipitación de las diversas muestras con jacalina, en geles preparados con y sin calcio. Como no hubo precipitación por jacalina en ausencia de calcio, deduje que la precipitación de  $IgA_1$  con jacalina depende de este catión.

#### 5. Efecto de la diálisis sobre la precipitación espontánea del suero de mieloma

Para tratar de eliminar por completo el calcio originalmente presente en el suero de mieloma, dialicé éste contra NaCl 0.15 M. Dentro de la bolsa de diálisis se formó un precipitado opalescente que luego separé por centrifugación. El anillo de la precipitación espontánea que ocurría en los geles de agarosa con el suero ya no se presentó al usar el sobrenadante del suero dializado y suplementado con  $CaCl_2$  18 mM, aunque en estas condiciones sí ocurrió la precipitación con jacalina (Fig 5).

Así concluí que el precipitado de la diálisis que eliminé por centrifugación parecía contener el material que causaba el artefacto.

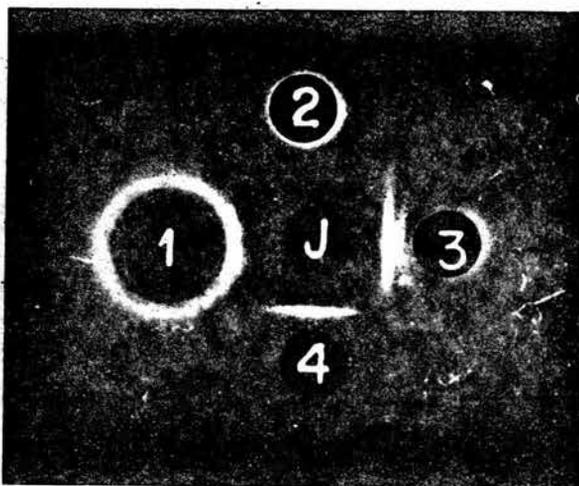


Fig 5. Precipitación por jacalina del suero de mieloma no dializado, del sobrenadante y precipitado del suero de mieloma dializado y del suero humano normal, en placas de agarosa con  $\text{CaCl}_2$  18 mM. Coloqué muestras de  $10 \mu\text{l}$  de jacalina ( $100 \text{ mg/ml}$ ) en el pozo central, de suero de mieloma en el pozo 1, del precipitado de suero de mieloma dializado en el pozo 2, del suero humano normal en el pozo 3, y de sobrenadante del suero de mieloma dializado en el pozo 4.

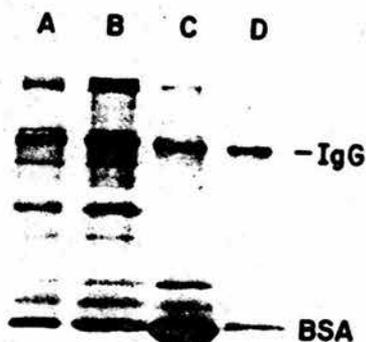
## B. Proteínas presentes en el precipitado y en el sobrenadante del suero de mieloma dializado

Las concentraciones de proteínas en el sobrenadante del suero de mieloma dializado y en el suero no dializado fueron similares y sus patrones electroforéticos fueron idénticos (Fig 6). En el carril del gel donde coloqué la muestra del precipitado no apareció ninguna banda de proteínas. Estas evidencias indican que el precipitado del suero dializado no era de naturaleza proteínica. Por lo tanto, la precipitación provocada por la diálisis contra NaCl 0.15 M no afectó significativamente la composición proteínica del suero de mieloma y permitió eliminar el componente que provocaba el artefacto que se formaba en los geles de agarosa con  $\text{CaCl}_2$  18 mM.

## C. Determinación de la capacidad de la DEAE-c para unir a la fracción de inmunoglobulinas del suero de mieloma

### 1. Contenido y patrón electroforético de las proteínas del suero

Para conocer el contenido proteínico del suero de mieloma que utilicé como fuente de IgA, llevé a cabo una cuantificación de proteínas y una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (ver Fig. 6).



**Fig 6. Patrones electroforéticos en poliacrilamida-SDS del suero humano normal, del suero de mieloma y del sobrenadante del suero de mieloma dializado.** En el carril A coloqué 20  $\mu$ l (21  $\mu$ g) de sobrenadante de suero de mieloma dializado, 20  $\mu$ l (21  $\mu$ g) de suero de mieloma no dializado, en el carril B, 20  $\mu$ l (21  $\mu$ g) de suero humano normal, en el carril C y 20  $\mu$ l de una mezcla con IgG (2  $\mu$ g) y BSA (2  $\mu$ g) en el carril D.

## 2. Obtención de la fracción de inmunoglobulinas del suero de mieloma

Desde el siglo pasado se han utilizado sales minerales para la precipitación y fraccionamiento de las proteínas. Denis (1859) fue el primero en sugerir que las proteínas podían precipitarse con  $MgSO_4$  y Hammersten y Méhu (1878) fueron los primeros en investigar el efecto precipitante del sulfato de amonio (ver Heide y Schwick, 1978).

Ehrlich y Brieger (1893) fueron los primeros en describir la precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio y en obtener los anticuerpos de la leche de cabras inmunizadas contra el tétanos, utilizando concentraciones del 27 al 30% de la sal (ver Heide y Schwick, 1978).

El sulfato de amonio tiene la ventaja de que en soluciones saturadas el riesgo de desnaturalización es bajo y de que casi nunca es necesario realizar la precipitación a baja temperatura y ajustar a un pH exacto (Heide y Schwick, 1978).

### a. Precipitación de la IgA con sulfato de amonio

La inmunoglobulina A monoclonal puede obtenerse en cantidades apreciables a partir del plasma o suero de pacientes con mielomas productores de IgA. La fracción de inmunoglobulinas generalmente se obtiene primero del suero por precipitación con  $(NH_4)_2SO_4$  saturado del 40 al 50%, y de esta fracción se purifica luego la IgA (Mestecky y Kilian, 1985).

Para obtener la fracción de las inmunoglobulinas del suero de mieloma de IgA, precipité 12 ml de la muestra (que

contenía 42.6 mg de proteínas totales) con un volumen igual de sulfato de amonio saturado al 100%. La fracción precipitada contenía el 33% (14 mg) de la proteína total (Tabla 21).

### 3. Condiciones de unión de la IgA

#### a. Efecto del pH

Analiqué primero el efecto del pH sobre la unión a la DEAE-c de la fracción de inmunoglobulinas obtenida a partir del suero de mieloma, añadiendo 12.6  $\mu$ g de proteína a una mezcla de DEAE-c con PBS 10 mM/NaCl ajustado a diferentes pH (5.5-8.5). Así encontré que a pH 5.5 y 6.0 se unió a la resina el 100% de la proteína añadida, mientras que a pH 8.5 sólo se unió el 50% (Fig 7 y Tabla 15).

La unión de la IgA a la resina, por lo tanto, dependió del pH; fue completa a valores bajos de pH (5.5 y 6) y menor a valores altos (8.5). Decidí por ello utilizar en experimentos posteriores pH 6.0, para tener la certeza de que inicialmente toda la proteína estuviese unida a la resina.

#### b. Efecto de la cantidad de proteínas de la fracción de inmunoglobulinas sobre la unión a la DEAE-c

##### Ensayo preliminar

Analiqué cómo se unía la IgA a la DEAE-c en función de la concentración de proteína añadida y en función de la sal

TABLA 15

Efecto del pH del eluyente sobre la capacidad de unión de  $IgA_1$  por DEAE-c

pH	Proteína unida	
	$\mu g$	%
5.5	12.6	(100)
6.0	12.6	100
6.5	11.2	89
7.0	10.2	80
7.5	9.3	73
8.0	8.2	65
8.5	6.7	50

Mezclas de 1 ml de DEAE-celulosa activada y equilibrada y 50  $\mu l$  de PBS 10 mM/NaCl (12.6  $\mu g$  de  $IgA_1$ )

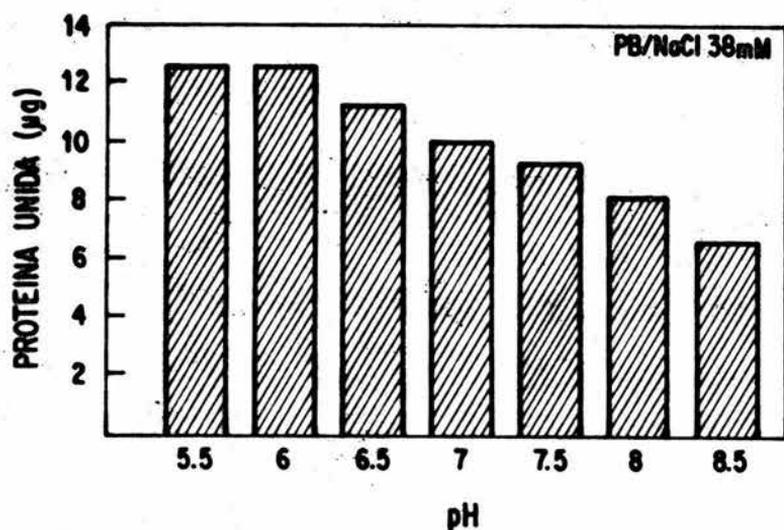


Fig 7. Efecto del pH sobre la unión de la IgA a la DEAE-c. Añadí 12.6 µg de la fracción de inmunoglobulinas obtenida de un suero de mieloma, a un tubo de ensayo de 5 ml que contenía DEAE-c (1 ml) y PBS 10 mM/NaCl 38 mM ajustado a los pH indicados en la tabla 1. Mezclé bien, incubé las mezclas 25 min a temperatura ambiente y luego determiné la cantidad de proteína que se unió a la resina (Tabla 15).

TABLA 16

Efecto de la cantidad de IgA sobre su unión a DEAE-c  
eluida con PB 10 mM pH 6 y PBS 10 mM pH 6 NaCl 38 mM

Proteína añadida <sup>a</sup> ( $\mu$ g)	Proteína unida ( $\mu$ g)		% Proteína unida	
	En PB	En PBS 38 mM	En PB	En PBS 38 mM
6.3	6.3	4.5	100	72
3.1	3.1	2.3	100	75
1.6	1.4	1.3	89	85
0.8	0.7	0.6	82	72
0.4	0.3	0.3	75	75

<sup>a</sup>En 25  $\mu$ l

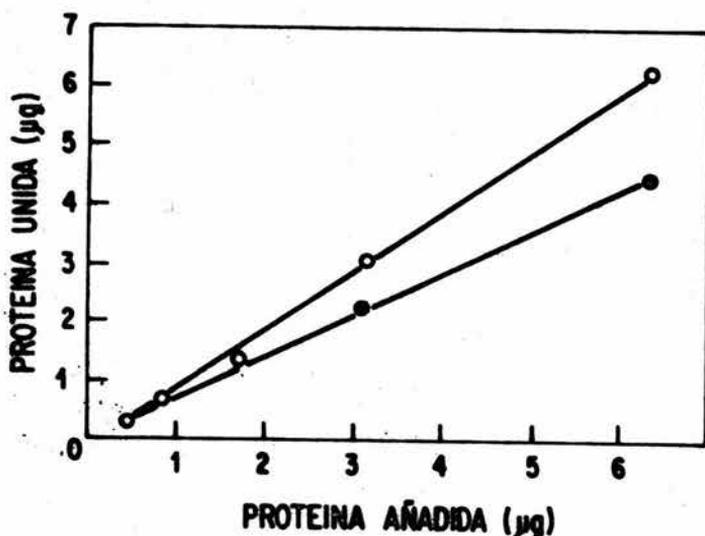


Fig 8. Efecto de la cantidad de IgA sobre su unión a DEAE-c. Añadí 25  $\mu$ l (que contenían respectivamente 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6  $\mu$ g) de la fracción de inmunoglobulinas obtenida a partir del suero de mieloma, a tubos de ensayo que contenían 1 ml de DEAE-c mezclada con 1 ml de PB 10 mM pH 6.0 (círculos vacíos), o con 1 ml de PBS 10 mM/NaCl 38 mM pH 6.0 (círculos llenos). Mezclé bien, incubé 25 min a temperatura ambiente, centrifugué las mezclas y cuantifiqué la proteína del sobrenadante para determinar la cantidad unida a cada ml de resina (Tabla 16).

añadida al amortiguador (Fig 8). La unión de la IgA fue directamente proporcional a la cantidad de proteína añadida (de 0.4 a 6.3  $\mu\text{g}$  por ml de resina) y ligeramente mayor (13%) en el medio sin sal añadida que en el medio con NaCl 38 mM (Tabla 16).

#### c. Efecto de la concentración de NaCl

Como la presencia de NaCl 38 mM disminuyó ligeramente la unión de la proteína por la DEAE-c, decidí analizar el efecto de la concentración de sal sobre la afinidad de la proteína, para determinar las condiciones bajo las cuales eluiría selectivamente la IgA que deseaba purificar. Por ello utilicé PBS (pH 6.0) con diferentes concentraciones de NaCl (10-40 mM) y una cantidad fija de proteína de la IgA obtenida en una cromatografía preliminar. Encontré que al aumentar la concentración de sal fue menor la cantidad de proteína unida, pero que solamente el 8% de la proteína dejó de unirse con la más alta concentración de sal probada, que fue NaCl 40 mM (Fig 9, Tabla 17).

#### d. Unión de la fracción de inmunoglobulinas a la DEAE-c

Para determinar la capacidad de la DEAE-c para unir proteínas de la fracción de las inmunoglobulinas, añadí 60  $\mu\text{l}$  (820  $\mu\text{g}$  de proteínas) del precipitado obtenido con sulfato de amonio a volúmenes variables (20-100  $\mu\text{l}$ ) de DEAE-c hidratada, activada y equilibrada en PB 10 mM pH 6. Encontré que la proteína no se unió totalmente a la resina.

TABLA 17

Unión de la IgA<sup>a</sup> a  
DEAE-c en función de la  
concentración de NaCl

NaCl (mM)	Proteína unida	
	μg	%
10	6.3	(100)
20	6.3	100
30	6.0	96
40	5.8	92

<sup>a</sup>6.3 μg de IgA<sub>1</sub> en  
25 μl

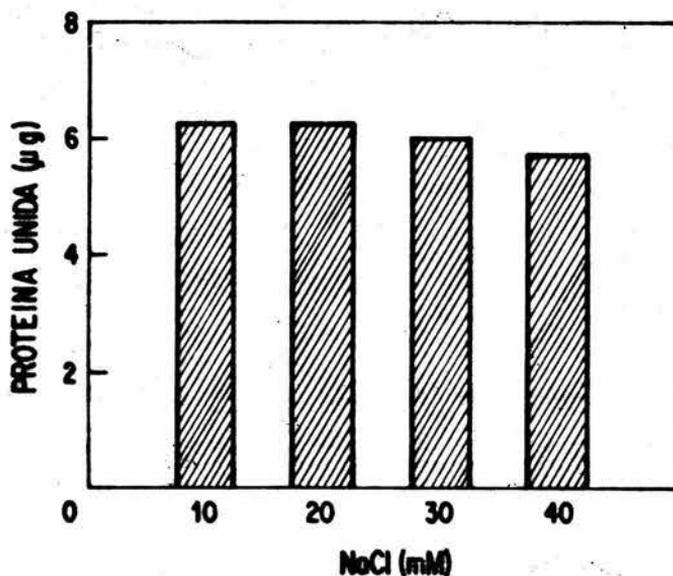


Fig 9. Unión de la IgA a DEAE-c en función de la concentración de NaCl. Añadí 6.3 µg de la fracción de inmunoglobulinas obtenida a partir del suero de mieloma, a tubos de ensayo que contenían 1 ml de DEAE-c y 1 ml de PBS 10 mM suplementado con NaCl a las concentraciones indicadas (Tabla 17).

TABLA 18

Unión de proteínas de la fracción de inmunoglobulinas de un suero de mieloma de IgA a volúmenes variables de DEAE-c equilibrada con PB 10 mM pH 6

DEAE-c ( $\mu\text{g}$ )	Proteína unida <sup>a</sup>	
	$\mu\text{g}$	%
20	347	42.3
40	500	61.0
60	554	67.6
80	636	78.0
100	671	82.0

<sup>a</sup>En todos los casos agregué 820  $\mu\text{g}$  de proteínas (100%) de la fracción precipitada con sulfato de amonio al 50% y dializada contra PB 10 mM pH 6.0

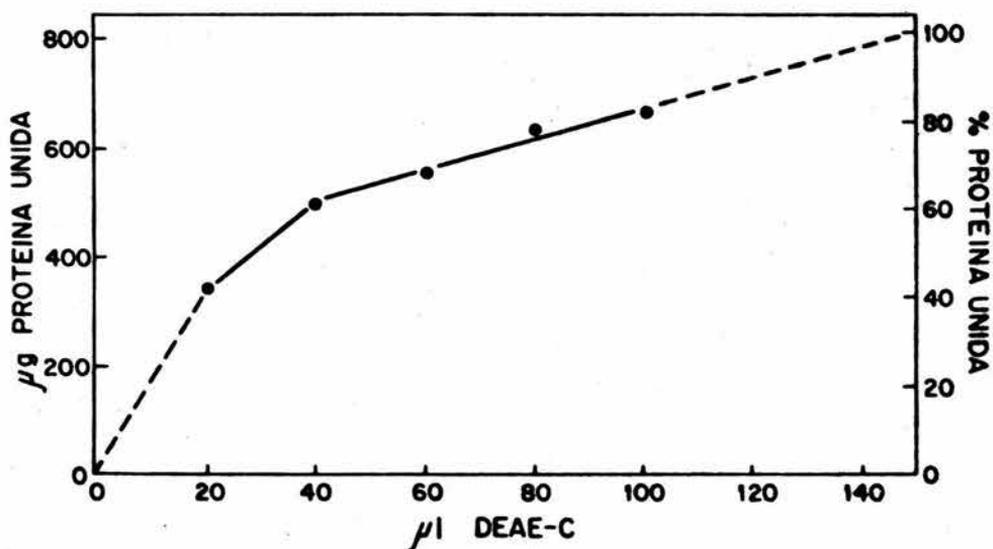


Fig 10. Unión de la IgA a volúmenes variables de DEAE-c. En tubos Eppendorf de 1.5 ml coloqué volúmenes variables de una suspensión de DEAE-c que había sido previamente activada y equilibrada en PB 10 mM pH 6. A cada tubo añadí 60  $\mu\text{l}$  (820  $\mu\text{g}$  de proteínas) de la fracción del suero de mieloma precipitada con sulfato de amonio saturado al 50% y dializada contra PB 10 mM pH 6, que incubé 30 min a temperatura ambiente para que se adsorbiera a la resina (Tabla 18).

Veinte  $\mu$ l de DEAE-c unieron el 42.3% (347  $\mu$ g), mientras que 100  $\mu$ l unieron el 82% (672  $\mu$ g) de la proteína añadida (Fig. 10, Tabla 18).

#### D. Purificación de la IgA<sub>1</sub> de mieloma

La cromatografía de intercambio iónico separa las proteínas de una mezcla por sus diferencias de carga. Aprovecha la unión electrostática de las proteínas a la resina suspendida en un regulador y empacada dentro de una columna; la elución es efectuada cambiando el pH del regulador que pasa a través de la columna y que afecta la carga de las proteínas, o incrementando la molaridad del regulador con sales que compitan con las proteínas por los grupos cargados en la resina. Cuando el suero se aplica a una columna de DEAE-c bajo condiciones adecuadas, la mayor parte de sus proteínas se adsorben a la resina.

La cromatografía en celulosa fue introducida por Petersen y Sober en 1956. Esta técnica, junto con métodos como la electroforesis zonal y el fraccionamiento con sales son herramientas básicas para el aislamiento de proteínas (Fahey y Terry, 1978).

##### 1. Cromatografía en DEAE-c

Para purificar la IgA a partir de la fracción del suero de mieloma precipitada con sulfato de amonio al 50%, adsorbí las proteínas de esta fracción a una columna de 4 ml de DEAE-c equilibrada con PB 10 mM pH 6 y eluí con un

gradiente discontinuo formado sucesivamente por PB 10 mM pH 6, PB 10 mM/NaCl 38 mM pH 7, PB 10 mM/NaCl 50 mM pH 8 y PB 10 mM/NaCl 100 mM pH 8.

Así obtuve con cada amortiguador las fracciones A, B, C y D, de las cuales tuvo mayor contenido de proteínas (11.47 mg) la B, que eluyó con PB 10 mM/NaCl 38 mM pH 7 (Tabla 19, Fig. 11).

## 2. Detección de IgA en los picos cromatográficos

Para saber en cuál pico cromatográfico se encontraba la IgA, analicé muestras de cada uno mediante inmunodifusión radial contra suero de conejo anti IgA (1 mg/ml) y encontré que sólo los picos A, B y D dieron arcos de precipitación (ver Fig. 12).

## 3. Análisis de proteínas de cada pico

Luego hice una electroforesis analítica en un gel de poliacrilamida-SDS con las muestras de los picos. El pico A dió sólo una banda ( $R_f = 0.175$ ). En el pico B encontré una banda principal con  $R_f = 0.156$ , ligeramente menor al de la banda del pico A, y otra banda más tenue ( $R_f = 0.190$ ). En el pico D encontré una banda principal muy tenue, con el mismo  $R_f$  (0.156) que el de la banda principal del pico B (ver Fig. 13).

Por las evidencias anteriores concluí que la  $IgA_1$  eluía principalmente en el pico B, que tuvo el mayor

TABLA 19

Purificación de la IgA<sub>1</sub> de un suero de mieloma de IgA humano

Pico	Eluyente <sup>a</sup>	Fracciones	Vol (ml)	Peso seco <sup>b</sup> (mg)
A	PB pH 6	6-12	7	7.65
B	PB/NaCl 38 mM pH 7	30-37	8	11.47
C	PB/NaCl 50 mM pH 8	52-57	6	I <sup>c</sup>
D	PB/NaCl 100 mM pH 8	68-74	7	8.22

<sup>a</sup>PB, amortiguador de fosfatos 10 mM

<sup>b</sup>Las fracciones de cada pico fueron reunidas y dializadas con PB 10 mM pH 7. Cada pico fue liofilizado para obtener la proteína seca. Las sales del amortiguador tenían un peso despreciable

<sup>c</sup>Contenido de proteínas insuficiente para poder ser pesado

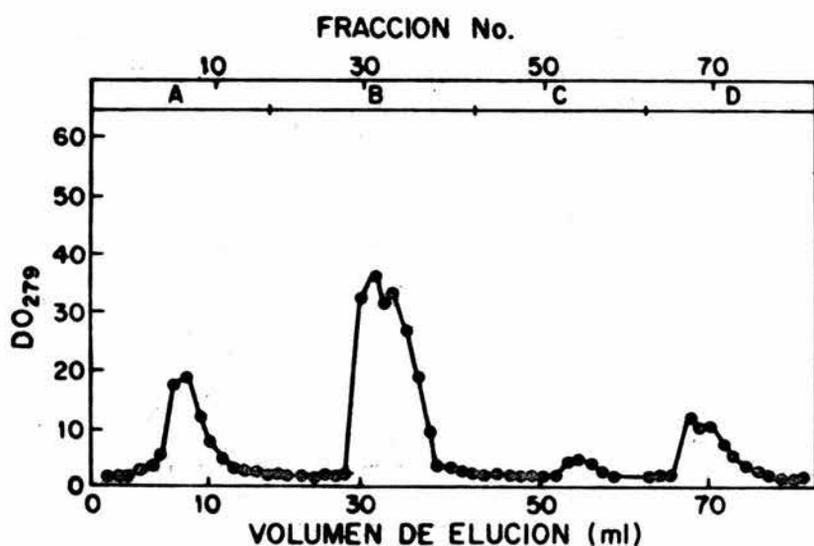


Fig 11. Perfil cromatográfico del suero de mieloma eluido en DRAE-c con un gradiente discontinuo. Las letras representan las fracciones obtenidas con los amortiguadores utilizados sucesivamente para la elución: (A) PB 10 mM pH 6, (B) PB 10 mM/NaCl 38 mM pH 7, (C) PB 10 mM/NaCl 50 mM pH 8 y (D) PB 10 mM/NaCl 100 mM pH 8. Apliqué a la columna, cuyo lecho era de 4 ml, 2 ml (14 mg) de la fracción del suero de mieloma precipitada con sulfato de amonio saturado al 50%. La elución se efectuó a 12 gotas/min y las fracciones fueron de 16 gotas ( $\approx$  1 ml). Recuperé 11.4 mg de proteína (peso seco) en el pico B después de la cromatografía (Tabla 19).

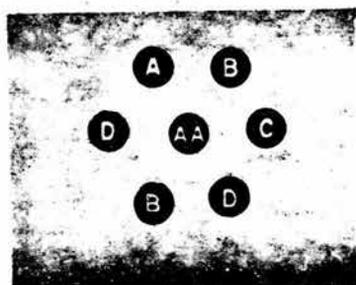


Fig 12. Localización de la IgA mediante inmunodifusión radial de las fracciones cromatográficas del suero de mieloma. En el pozo central coloqué el antisuero AA (10  $\mu$ l del suero de conejo anti-IgA humana). En los pozos periféricos coloqué muestras de 10  $\mu$ l de los picos A, B, C y D obtenidos en la cromatografía del suero de mieloma en DEAE-c (ver Fig 11). Nótese los arcos de precipitación con muestras de A, B y D, la reacción de identidad de A con B y las reacciones de no-identidad de A con D y de B con D.



Fig 13. Patrones electroforéticos de las fracciones del suero de mieloma obtenidos mediante cromatografía en DEAE-c. En los carriles correspondientes (identificados con letras mayúsculas) coloqué las siguientes muestras de 20  $\mu$ l: (D) 10  $\mu$ g de proteínas del pico D, (B) 10  $\mu$ g de proteínas del pico B, (A) 10  $\mu$ g de proteínas del pico A, (M) 10  $\mu$ g de proteínas del suero de mieloma, (N) 21  $\mu$ g de proteínas del suero humano normal, y (BSA) 2  $\mu$ g de seroalbúmina bovina.

contenido proteínico, como era de esperar para una proteína proveniente del suero de un paciente con mieloma (Robbins y Angell, 1971).

Por otro lado, de los 14 mg de proteínas presentes en el precipitado del suero de mieloma (determinados con el método de Bradford) 11.48 mg de peso seco (i.e. el 82%) estaban presentes en el pico B. Por lo tanto, el rendimiento de la IgA del suero de mieloma obtenida mediante cromatografía en DEAE-c fue de 26.9% (Tabla 20).

#### E. Efecto de la incubación con *P. aeruginosa* PAø1 sobre el patrón inmunolectroforético de la sIgA y de la IgA<sub>1</sub>

La inmunolectroforesis (IEF) es un proceso por el cual las proteínas son primero separadas por electroforesis en agarosa y luego puestas a reaccionar por difusión contra un antisuero particular polivalente o monoespecífico. La IEF fue introducida en 1953 por Grabar y Williams y luego modificada por Scheidegger en 1955.

Con inmunolectroforesis es posible separar y distinguir hasta 30 componentes diferentes, porque cada anticuerpo precipitado se une con el antígeno correspondiente para producir un arco independiente de precipitación específica en el gel. Por lo tanto, los constituyentes antigénicos pueden ser definidos por sus movilidades electroforéticas así como por sus reacciones específicas con el anticuerpo.

TABLA 20

Rendimiento de la IgA obtenida a partir de un mieloma humano por cromatografía en DEAE-c

Fracción	Volumen (ml)	Proteínas		
		mg/ml	mg totales	Recuperación
Suero total	12	3.55	42.6 <sup>a</sup>	(100%)
P50 <sup>b</sup>	2	7.0	14.0 <sup>a</sup>	32.8%
DEAE-c	8	1.4	11.4 <sup>c</sup>	26.9%

<sup>a</sup>Calculados con el método colorimétrico de Bradford

<sup>b</sup>Precipitado con sulfato de amonio saturado al 50%

<sup>c</sup>Peso seco

## 1. Ensayos preliminares

a. Selección de los antisueros anti-IgA de mayor título  
Para conocer la localización, forma e intensidad de los arcos de inmunoprecipitación de sIgA y IgA<sub>1</sub>, probé tres sueros de conejo anti-IgA humana producidos previamente en el laboratorio (RQC86, C80 y C88).

No hubo arcos de precipitación visibles con el suero RQC86; con los sueros anti-IgA C80 y C88 aparecieron arcos de precipitación muy tenues con sIgA (tanto con iluminación indirecta como después de teñir con azul de Coomassie) y no se observaron diferencias en los arcos de sIgA incubadas con *P. aeruginosa* PAϕ1.

De lo anterior concluí que el antisuero RQC86 no tenía títulos detectables de anticuerpos y que solamente los antisueros C80 y C88 parecían ser útiles para el ensayo de la actividad de proteasa de IgA de *P. aeruginosa* mediante inmunolectroforesis.

b. Concentración de las inmunoglobulinas de los antisueros C80 y C88

Para concentrar la fracción de inmunoglobulinas de los antisueros seleccionados precipité con sulfato de amonio saturado al 50% muestras de 3 ml de los sueros C80 y C88. Después de precipitar una vez con sulfato de amonio, de 41.4 mg totales de proteína del suero C80 obtuve 16.6 mg de proteínas (38.6%) y de 48 mg totales del suero C88 obtuve 18.69 mg de proteínas (38.9%).

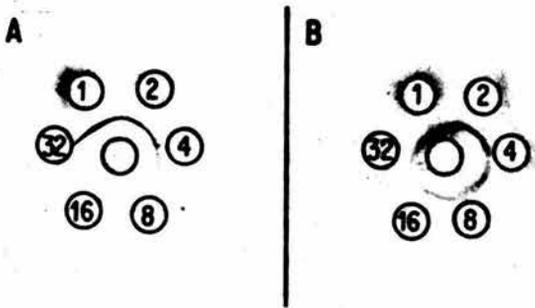


Fig 14. Titulación de las fracciones de inmunoglobulinas de los antiseros C80 y C88 concentradas y dializadas. En los pozos centrales de A y B coloqué 10  $\mu$ l de IgA purificada de saliva (3.2 mg/ml) y en los pozos periféricos diluciones dobles seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) del antisuero C88 en A, y C80 en B.

Por otra parte, titulé las fracciones de inmunoglobulinas C80 y C88 por precipitación con sulfato de amonio y dializadas, mediante inmunodifusión contra sIgA y obtuve arcos de precipitación intensos con ambas; el título de la fracción C80 fue 8 y el de la C88 fue 16 (Fig. 14).

Concluí entonces que el antisuero C88 precipitado y dializado parecía el más adecuado para intentar detectar cambios en la movilidad electroforética de sIgA e IgA<sub>1</sub> tratadas con *P. aeruginosa*.

c. Efecto del calcio sobre el aspecto y nitidez de los arcos de inmunoprecipitación de sIgA e IgA<sub>1</sub>

Para saber si la presencia del calcio modificaba el aspecto y la nitidez de los arcos de inmunoprecipitación de la sIgA tratada con *P. aeruginosa*, realicé una inmunoelectroforesis en geles de agarosa suplementados o no con CaCl<sub>2</sub> 18 mM.

Observé que en presencia de CaCl<sub>2</sub> 18 mM, los arcos de la sIgA se definieron claramente y los geles no se deformaron al realizar la corrida. En geles no suplementados con CaCl<sub>2</sub> los arcos fueron intensos pero se produjeron manchas difusas alrededor del pozo (Fig. 15).

Los arcos de la IgA<sub>1</sub> fueron igualmente intensos en geles no suplementados y suplementados con calcio, pero en estos últimos se formó una mancha triangular con base en el pozo y eje mayor paralelo al surco de unos 10 a 15 mm de

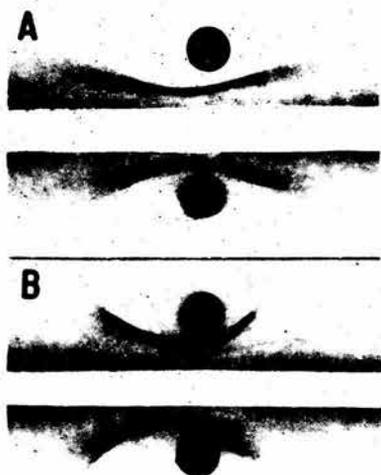


Fig 15. Inmunolectroforesis de sIgA incubada con *P. aeruginosa*. En los pozos superiores de ambos geles (A y B) coloqué 10  $\mu$ l de sIgA (3.2 mg/ml) de saliva humana no tratada y en los pozos inferiores coloqué 10  $\mu$ l de sIgA que había sido incubada a 37°C durante 24 h con una colonia de *P. aeruginosa*. En el carril central coloqué 100  $\mu$ l de suero C88 (18.7 mg de proteínas/ml) concentrado y dializado. La agarosa del gel B (inferior) fue adicionada con CaCl 18 mM. El cátodo se encontraba hacia el lado derecho y el ánodo hacia el izquierdo. Las fotografías fueron tomadas de los geles secados y teñidos con Azul de Coomassie R-250.

largo, cuyo vértice estaba orientado al otro lado de los arcos.

Con estas evidencias concluí que la intensidad de los arcos de la sIgA e IgA<sub>1</sub> era igual con o sin calcio adicional, pero con calcio se producía un artefacto.

## 2. Inmunolectroforesis de sIgA e IgA<sub>1</sub> incubadas con P. aeruginosa (PAø1)

Incubé a la IgA de saliva total y a la IgA<sub>1</sub> de mieloma con P. aeruginosa PAø1 durante 24 y 50 h y luego realicé un ensayo de IEF para saber si el tratamiento había modificado los arcos de inmunoprecipitación. La movilidad electroforética de la IgA<sub>1</sub> de mieloma sí fue modificada por la incubación con P. aeruginosa PAø1 durante 24 y 50 h, mientras que la de la IgA de saliva incubada 24 h no lo fue (Fig. 15). Del arco original de la IgA<sub>1</sub> (de 15 mm de largo) se generó un arco adicional de 20 mm de largo unido al original por su extremo derecho y separado unos 5 mm en su extremo izquierdo (Fig. 16).

Por lo tanto, la incubación con P. aeruginosa PAø1 afectó la movilidad electroforética de IgA<sub>1</sub> pero no la de IgA de saliva total.

## F. Patrón electroforético de cantidades variables de IgA incubada con P. aeruginosa (PAø1)

Para saber con qué concentración de IgA<sub>1</sub> se obtenía el mejor

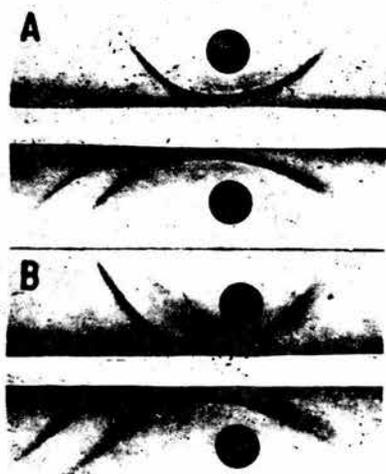


Fig 16. Inmunolectroforesis de IgA<sub>1</sub> de suero de mieloma humano incubada con *P. aeruginosa*. En los pozos superiores de los geles A y B coloqué 10  $\mu$ l de IgA (4 mg/ml) no tratada, y en los pozos inferiores una mezcla de 10  $\mu$ l de IgA que fue incubada durante 24 h (A) y 50 h (B) con una colonia de *P. aeruginosa*. En el carril central coloqué 100  $\mu$ l de suero C88 (18.7 mg de proteínas/ml) concentrado y dializado. El cátodo se encontraba hacia el lado derecho y el ánodo hacia el izquierdo. Las fotografías fueron tomadas de los geles secados y teñidos con azul de Coomassie R-250.

patrón electroforético en los geles de poliacrilamida, realicé diluciones dobles seriadas de  $IgA_1$  y las incubé con una colonia de *P. aeruginosa* durante 24 h a 37° C. Al llevar a cabo el análisis electroforético, encontré que en los carriles con muestras que inicialmente contenían 10, 5, 2.5 y 1.25  $\mu$ g de  $IgA_1$  incubada con PA $\phi$ 1 hubo una banda adicional de peso molecular similar al de la albúmina y que las bandas de  $IgA_1$  fueron muy tenues con concentraciones menores de 10  $\mu$ g.

Hice un análisis inmunolectroforético de la  $IgA_1$  incubada con PA $\phi$ 1 durante 24 h a 37° C y encontré dos arcos claramente definidos de 20 mm de largo.

De lo anterior concluí que la banda adicional en el gel de poliacrilamida es tal vez una proteína que resulta de la incubación de la  $IgA_1$  con las bacterias de la cepa PA $\phi$ 1, que la mejor resolución de las bandas de  $IgA_1$  se logra con 10  $\mu$ g de muestra, y que el efecto de corte de  $IgA_1$  producido por la incubación con *P. aeruginosa* es reproducible.

#### G. Cinética de la fragmentación de la $IgA_1$ por la incubación con *P. aeruginosa*

Para saber cómo se modificaba el patrón electroforético de la  $IgA$  por la incubación con *P. aeruginosa* a través del tiempo y si este patrón era compatible con la posibilidad de que el corte se realizara en la bisagra, llevé a cabo una cinética mediante la incubación de  $IgA_1$  con PA $\phi$ 1 durante 3, 6, 12 y 24 h.

A lo largo de la cinética observé, además de la banda de

IgA<sub>1</sub>, cuatro bandas principales con pesos moleculares aparentes de 120, 115, 110 y 63 kDa. Las bandas de 150 (IgA) y 63 kDa fueron las más intensas y duraderas. A las 3 h de incubación aparecieron bandas de 120 y 63 kDa, a las 6 h apareció la banda de 115 kDa, a las 12 h una banda adicional de 110 kDa y finalmente, a las 24 h desapareció la banda de 150 kDa (Tabla 21, Fig. 17).

También, noté que la banda de IgA (150 kDa) disminuyó de intensidad hasta desaparecer a las 24 h de incubación, al contrario de una banda de 63 kDa que apareció a las 6 h y aumentó en intensidad a lo largo de la cinética.

Estas evidencias sugieren que el corte de la IgA parece ocurrir en la región de la bisagra.

#### H. Actividad de la proteasa extracelular principal de P. aeruginosa

Para cuantificar la actividad proteolítica de la proteasa extracelular de P. aeruginosa monté un sistema similar al utilizado por Habermann y Hardt (1972) y Safarik (1988) que consistía en agregar enzimas con actividad proteolítica a suspensiones de proteínas como las de yema de huevo y caseína mezcladas en geles de agar-agar o agarosa. Alrededor del pozo donde se coloca la enzima se forma un área redonda y clara cuyo diámetro es proporcional al logaritmo de la concentración de la enzima aplicada. Este parámetro puede ser

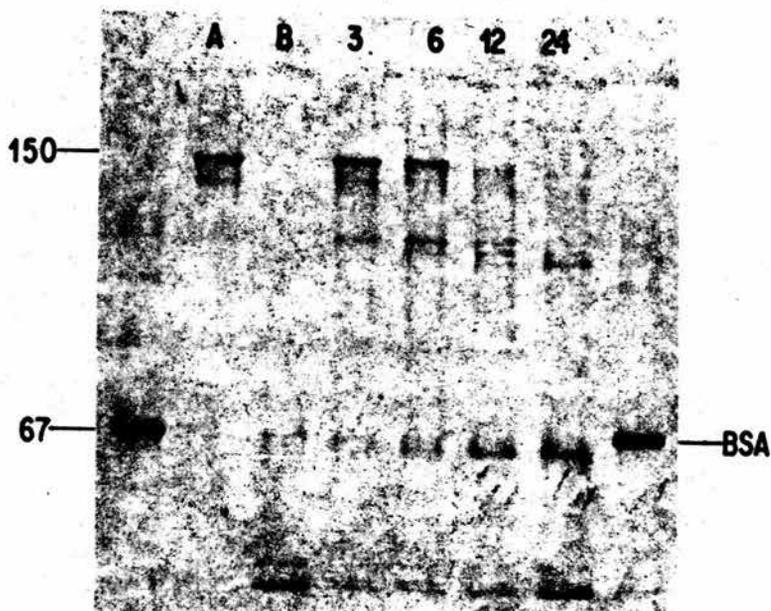


Fig 17. Patrón electroforético de IgA incubada con *P. aeruginosa* PAφ1. Llevé a cabo una cinética de fragmentación mediante la incubación de IgA con PAφ1 durante 3, 6, 12 y 24 h. En los carriles correspondientes coloqué las siguientes muestras de 20  $\mu$ l: (A) 10  $\mu$ g de IgA; (B) el sobrenadante de una colonia de PAφ1 de 2 mm de diám.<sup>1</sup> que había sido incubada en Tris-HCl 15 mM pH 8 durante 24 h; (3) 10  $\mu$ g de de IgA, que había sido incubada durante 3 h con PAφ1, (6) durante<sup>1</sup>6 h, (12) durante 12 h y (24) durante 24 h. En el primer y último carril coloqué 2  $\mu$ g de seroalbúmina bovina (BSA).

TABLA 21

Cinética de degradación de IgA incubada con una colònia de *P. aeruginosa* PA01

Tiempo (h)	Mr (kDa) <sup>a</sup>				
	150	120	115	110	63
0	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	+
6	+	+	+	-	+
12	+	+	+	+	+
24	-	-	+	+	+

<sup>a</sup>Pesos moleculares aparentes en PAGE-SDS

+, Banda presente

-, Banda ausente

usado para cuantificar y medir la actividad de enzimas proteolíticas como fosfolipasas y proteasas.

### 1. Ensayo de la actividad proteolítica de papaína

#### a. Efecto de concentraciones variables de agar y caseína

Para saber cuál concentración de agar era necesaria para dar consistencia suficiente al agar para la adecuada formación de pozos y cuál concentración de caseína era necesaria para que el medio tuviera la turbiedad suficiente para distinguir claramente los halos de proteólisis, probé diferentes concentraciones de agar bacteriológico (1.2, 1, 0.8, y 0.6%) e hice pozos con sacabocados de 3 mm. Luego agregué al medio diferentes concentraciones de caseína (0.16, 0.5, 1, y 1.5%) y elegí la combinación de concentraciones agar/caseína adecuada para el ensayo proteolítico con papaína.

Encontré que el agar al 0.6, 0.8, y 1.0% no fue suficientemente consistente ya que se despedazó al utilizar el sacabocados. Por otra parte, con caseína al 0.16 y 0.5% el medio no fue suficientemente turbio para observar halos nítidos de hidrólisis, en tanto que con concentraciones mayores de caseína el medio fue excesivamente espeso. Concluí que la concentración adecuada de agar para dar consistencia al medio era de 1.2 % ya que no se deformaba al perforar los pozos y que la concentración final de caseína al 1% enturbiaba suficientemente el medio para poder observar con claridad los halos de proteólisis.

#### b. Condiciones finales del ensayo

Decidí montar el ensayo proteolítico en agar utilizando una proteasa conocida como la papaína, para definir las condiciones que utilizaría para el ensayo proteolítico de la proteasa principal de *P. aeruginosa* y poder comparar su actividad con respecto a la de la papaína.

Para saber con qué concentración de papaína empezaban a aparecer los halos de proteólisis, si el área de los halos era proporcional a la cantidad de papaína añadida y si el diámetro de los pozos y el volumen de las muestras influían sobre el área de los halos, activé papaína tipo IV con cisteína 5 mM y EDTA-2 mM y probé el efecto de diluciones dobles seriadas de la papaína activada. Coloqué 10 y 20  $\mu$ l de cada dilución en pozos de 3 o 4 mm (cajas de 60 mm con 5 ml de agar 1.2%-caseína 1% pH 8.0), incubé a 36°C durante 20 h y medí el diámetro de los halos.

Aparecieron halos de proteólisis con 2.5  $\mu$ g de papaína en pozos de 4 mm y con 1.25  $\mu$ g de papaína en pozos de 3 mm. El área de los halos aumentó proporcionalmente con la cantidad de papaína añadida hasta llegar al máximo (35.26mm) con 20  $\mu$ g de papaína (Fig. 18 y 19).

La graficación de las inversas de la concentración de papaína y del área neta de los halos dió una recta ( $r^2=0.993$  para pozos de 4 mm;  $r^2=0.996$  para pozos de 3 mm). La relación lineal en la graficación se perdió con muestras de más de 10  $\mu$ g de papaína (Fig. 20). También obtuve que las áreas netas de los halos de hidrólisis producidos fueron

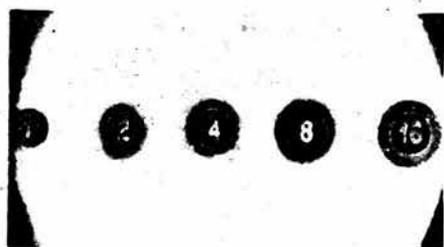


Fig 18. Ensayo proteolítico de diferentes concentraciones de papaína en placas de agar/caseína. En cinco pozos de 3 mm de diámetro (cajas de 60 mm con 5 ml de agar 1.2%-caseína 1% pH 8.0) coloqué 10  $\mu$ l de papaína activada y diluída e incubé durante 20 h a 36°C: en (1) 20  $\mu$ g (dil. 1:1); en (2) 10  $\mu$ g (dil. 1:2); en (4) 5  $\mu$ g (dil 1:4); en (8) 2.5  $\mu$ g (dil 1:8) y en (16) 1.25  $\mu$ g (dil 1:16)(Tablas 9 y 10).

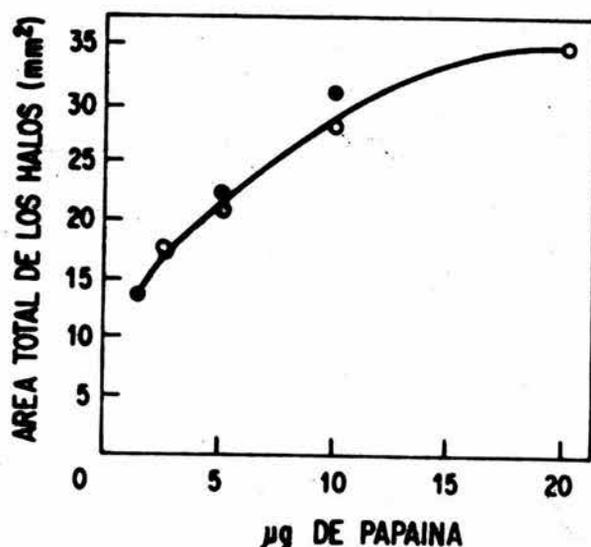


Fig 19. Efecto de la cantidad de papaína sobre la hidrólisis de caseína. En cinco pozos de 3 o 4 mm de diámetro (cajas de 60 mm con 5 ml de agar 1.2%-caseína 1% pH 8.0) coloqué 10 o 20  $\mu$ l de papaína activada y equilibrada e incubé durante 20 h a 36°C. Con una regla de Mancini medí el diámetro de los halos de hidrólisis y calculé el área. Los círculos llenos corresponden a los datos obtenidos de trabajar con pozos de 3 mm y los círculos vacíos a los de 4 mm. Aparecieron halos de proteólisis con 2.5  $\mu$ g de papaína en pozos de 4 mm y con 1.25  $\mu$ g de papaína en pozos de 3 mm. El área de los halos aumentó proporcionalmente con la cantidad de papaína añadida hasta llegar al máximo (35.26 mm).

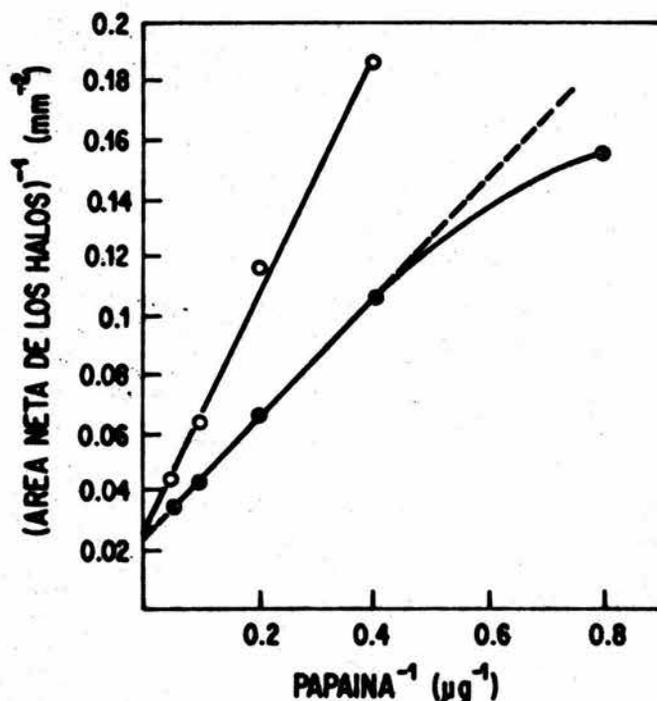


Fig 20. Gráfica de las inversas de la concentración de papaína y del área neta de los halos de hidrólisis. La graficación de las inversas de la concentración y del área neta de los halos dió una recta ( $r^2 = 0.993$  para pozos de 4 mm;  $r^2 = 0.996$  para pozos de 3 mm). Los círculos llenos corresponden a los datos obtenidos de trabajar con pozos de 3 mm y los círculos vacíos a los de 4 mm. La relación lineal de la graficación se perdió con muestras de más de  $10 \mu\text{g}$  de papaína. Las áreas netas de los halos de hidrólisis producidos fueron mayores en pozos de 3 mm que de 4 mm (de  $4.2$  a  $8.4 \text{ mm}^2$ )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

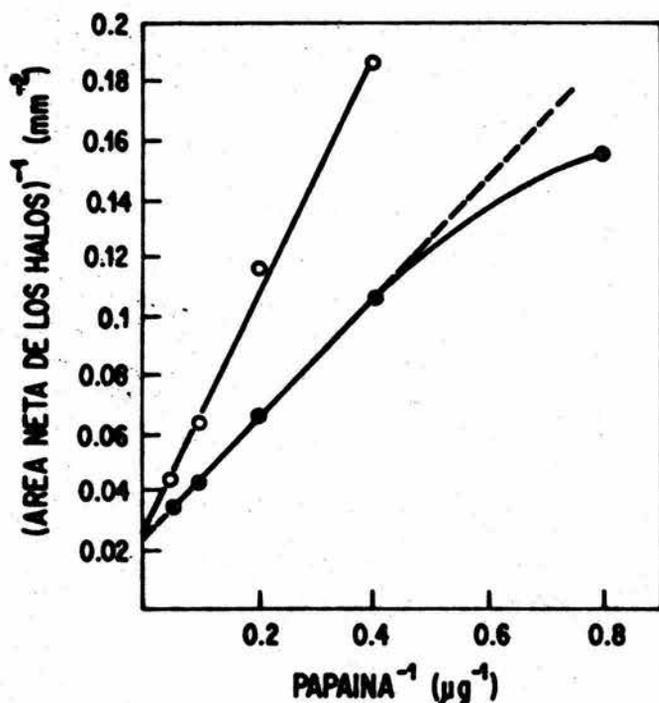


Fig 20. Gráfica de las inversas de la concentración de papaína y del área neta de los halos de hidrólisis. La graficación de las inversas de la concentración y del área neta de los halos dió una recta ( $r^2 = 0.993$  para pozos de 4 mm;  $r^2 = 0.996$  para pozos de 3 mm). Los círculos llenos corresponden a los datos obtenidos de trabajar con pozos de 3 mm y los círculos vacíos a los de 4 mm. La relación lineal de la graficación se perdió con muestras de más de  $10 \mu\text{g}$  de papaína. Las áreas netas de los halos de hidrólisis producidos fueron mayores en pozos de 3 mm que de 4 mm (de  $4.2$  a  $8.4 \text{ mm}^2$ )

TABLA 22

Actividad proteolítica de papaína en agar/caseína con pozos de 3 mm (A = 7.06 mm<sup>2</sup>)

Papaína añadida (μg)	Diámetro del halo (mm)	Area del halo (mm <sup>2</sup> )	
		Total	Neta
1.25	4.1	13.46	6.39
2.5	4.6	16.61	9.55
5	5.3	22.06	14.99
10	6.3	31.17	24.10
20	6.7	35.25	28.18

mayores en pozos de 3 mm que de 4 mm (de 4.2 a 8.4 mm<sup>2</sup>).

De lo anterior concluí que el ensayo proteolítico en agar/ caseína es muy sensible ya que los halos aparecieron con 1.25 µg de papaína en pozos de 3 mm. El diámetro de los pozos y el volumen de las muestras influyen sobre el área de los halos, ya que hubo mayor proteólisis con muestras de 10 µl de papaína en pozos de 3 mm (Tabla 22). Así mismo, concluí que las condiciones finales del ensayo de proteólisis serían: agar 1.2%-caseína 1% con Tris-HCl 15 mM pH 8.0, en cajas de 60 mm con pozos de 3 mm, muestras de 10 µl, e incubación durante 20 h a 37°C.

Finalmente, con los datos anteriores obtuve una tabla (ver Tabla 23) que muestra la relación de los valores (absolutos e inversos) entre los diámetros (y por lo tanto áreas de los halos de proteólisis y las cantidades de caseína hidrolizada) con la cantidad de papaína (masa y unidades de actividad proteolítica) que utilicé para medir la actividad de la proteasa principal de *P. aeruginosa* PAØ1 respecto a la de la papaína.

## 2. Actividad de la proteasa de P. aeruginosa

Para detectar la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* en el ensayo con agar/caseína cultivé PAØ1 en caldo nutritivo, incubé toda la noche a 30°C en agitación constante, centrifugué el cultivo (11,953 X g por 20 min) y realicé ensayos de diluciones del medio de cultivo usado y de la pastilla bacteriana en cajas de agar/caseína que incubé 20 h

TABLA 23

Relación de los valores (absolutos e inversos) de los diámetros y áreas de los halos de proteólisis y las cantidades de caseína hidrolizada con la cantidad de papaína (en masa y unidades de actividad)

Diámetro del halo (mm)	Area del halo		Caseína hidrolizada <sup>a</sup> (μg)	Papaína <sup>b</sup>		
	mm <sup>2</sup>	mm <sup>-2</sup>		μg	μg <sup>-1</sup>	mU <sup>c</sup>
4.6	9.52	0.105	169.02	2.05	0.49	25
4.7	10.29	0.097	181.93	2.22	0.45	27
4.8	11.04	0.91	195.19	2.38	0.42	29
4.9	11.80	0.085	208.62	2.55	0.39	31
5.0	12.57	0.080	222.24	2.72	0.37	33
5.1	13.37	0.075	236.38	2.92	0.34	36
5.2	14.18	0.071	250.70	3.09	0.32	38
5.3	15.00	0.067	265.20	3.29	0.30	40
5.4	15.84	0.063	280.05	3.52	0.28	43
5.5	16.69	0.060	295.08	3.71	0.27	46
5.6	17.57	0.057	310.64	3.92	0.25	48
5.7	18.46	0.054	326.37	4.16	0.24	51
5.8	19.36	0.052	342.28	4.34	0.23	53
5.9	20.28	0.049	358.88	4.63	0.22	57
6.0	21.21	0.047	374.99	4.85	0.21	60
6.1	22.16	0.045	391.79	5.08	0.20	62
6.2	23.13	0.043	408.94	5.35	0.19	66
6.3	24.11	0.041	426.26	5.65	0.18	69
6.4	25.11	0.040	443.94	5.81	0.17	71
6.5	26.12	0.038	461.80	6.16	0.16	76
6.6	27.15	0.037	480.01	6.35	0.16	78
6.7	28.20	0.035	498.58	6.77	0.15	83

<sup>a</sup>El agar contiene 17.68 μg de caseína/mm<sup>2</sup>

<sup>b</sup>Obtenida a partir de la ecuación de la recta (área neta)<sup>-1</sup> = 0.205(μg enzima)<sup>-1</sup> + 0.023

<sup>c</sup>Actividad específica = 12.3 U/μg papaína

a 37°C.

La actividad de proteasa de PA $\phi$ 1 sí pudo detectarse con el ensayo de agar/caseína, ya que aparecieron halos de proteólisis tanto con el medio de cultivo usado como con el paquete bacteriano. Al estudiar la relación entre el diámetro de los halos de proteólisis de caseína y la cantidad de pastilla bacteriana o medio usado añadidos a los pozos, encontré que los halos de proteólisis generados por la pastilla de PA $\phi$ 1 aparecieron hasta la dilución 1:16 y los formados por el medio de cultivo usado fresco y refrigerado, hasta la dilución 1:27.

Concluí que la actividad proteolítica es mucho mayor en el medio de cultivo que en las bacterias, que ésta actividad es equivalente a 540 mU de papaína/10  $\mu$ l (Tabla 23) y resiste a la congelación-descongelación. La cantidad mínima de actividad proteolítica que se puede detectar con el ensayo está contenida en 0.370  $\mu$ l de medio usado (i.e. 10  $\mu$ l de la dilución 1:27).

## I. Enriquecimiento de la proteasa de IgA

### 1. Actividad proteolítica sobre IgA del medio de cultivo usado por P. aeruginosa

Realicé una inmunolectroforesis con una muestra de la mezcla de medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1 que fue incubada con IgA<sub>1</sub> de mieloma (2 mg/ml) por 24 h a 37°C para ver si la actividad de proteasa de IgA se encontraba en el medio de cultivo usado

por P. aeruginosa.

El arco de precipitación original de IgA incubada con medio de cultivo de PA $\phi$ 1 se transformó en dos arcos claramente definidos como los ya descritos anteriormente, lo cual significaba que la actividad de proteasa de IgA de P. aeruginosa era exportada al medio de cultivo.

## 2. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio del medio de cultivo usado

A 100  $\mu$ l de medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1 adicioné diferentes concentraciones de sulfato de amonio (10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 g por 100 ml de medio usado) (Tabla 11), incubé las mezclas por 24 h a 4°C, las centrifugué y realicé ensayos de los sobrenadantes en cajas de agar/caseína para saber con qué concentración de sulfato de amonio se podía hacer el corte del medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1 para precipitar la actividad proteolítica principal.

En el medio usado por PA $\phi$ 1 y tratado con 10, 20 y 30 g de sulfato de amonio por 100 ml, la actividad de proteasa se mantuvo en el sobrenadante mientras que con 40, 50, 60 y 70 g de sulfato de amonio por 100 ml de medio de cultivo usado, precipitó totalmente la actividad de proteasa (Fig. 21).

Concluí que el medio usado por PA $\phi$ 1 podía suplementarse primero con 30 g de sulfato de amonio por 100 ml para eliminar proteínas no deseadas y luego llevarlo a 40 g con sulfato de amonio por 100 ml de medio para precipitar la proteasa principal.

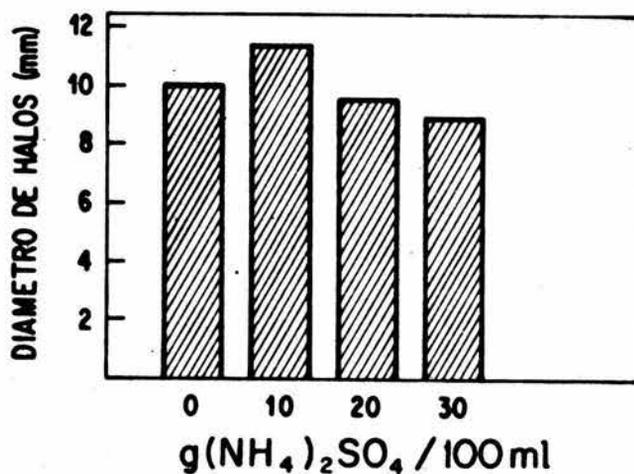


Fig 21. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio del medio de cultivo usado. A 7 tubos Eppendorf que contenían 100  $\mu$ l de medio de cultivo usado y centrifugado añadí 10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 mg de sulfato de amonio e incubé a 4°C durante toda la noche. Coloqué 10  $\mu$ l del medio de cultivo centrifugado y tratado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio a 5 pozos de una placa de agar 1.2%-caseína 1%, incubé a 37°C durante 24 h y medí el diámetro de los halos de hidrólisis. Con 40, 50, 60 y 70 g de sulfato de amonio por 100 ml de medio de cultivo usado desapareció totalmente la actividad de proteasa.

### 3. Obtención de la fracción (P<sub>30-40</sub>) enriquecida en actividad proteolítica

#### a. Enriquecimiento de la actividad proteolítica principal

Para saber si podía obtenerse una fracción enriquecida con la actividad proteolítica principal, añadí 27 g de sulfato de amonio a 100 ml del caldo nutritivo usado por PA $\phi$ 1, incubé la mezcla durante 24 h a 4°C y la centrifugué a 26,895 X g por 20 min para obtener la pastilla (P<sub>30</sub>) y el sobrenadante (S<sub>30</sub>). Añadí luego 13 g de sulfato de amonio al sobrenadante (i.e. 40 g por 100 ml); incubé la mezcla 24 h más a 4°C, la centrifugué y obtuve la pastilla (P<sub>30-40</sub>) y el sobrenadante (S<sub>30-40</sub>) (Tabla 12). Finalmente, realicé el ensayo proteolítico en agar/caseína de cada una de las fracciones obtenidas.

El mayor halo de proteólisis lo encontré en el pozo que contenía una muestra de la fracción P<sub>30-40</sub> por lo que concluí que la actividad proteolítica principal exportada al medio usado por PA $\phi$ 1 se encuentra principalmente en la fracción que precipita en el corte de 30 a 40 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de medio usado.

#### b. Patrón electroforético de lisados de *P. aeruginosa*

De un cultivo fresco de *P. aeruginosa* obtuve el paquete bacteriano y lisé las bacterias con regulador de muestras para electroforesis (sin BME), sin o con PMSF (Tabla 13) y luego analicé los lisados en geles de poliacrilamida-SDS.

En el análisis de las proteínas totales de los lisados de bacterias de *P. aeruginosa* encontré que en el carril con

el lisado no tratado con PMSF, hubo 4 bandas intensas (con Rf 0.90, 0.86, 0.84 y 0.77) además de muchas bandas tenues. En los carriles con muestras de lisados tratados con PMSF encontré el mismo patrón. El frente fue intenso, pero igual en todos los carriles.

Con las evidencias anteriores concluí que la actividad proteolítica no se inhibe por PMSF, lo cual concuerda con los datos de Quezada (1987), por lo que la adición de éste inhibidor es innecesaria para obtener los patrones electroforéticos de proteínas totales de PA $\phi$ 1.

#### c. Actividad proteolítica, rendimiento de la fracción P<sub>30-40</sub> y proteínas principales

Para saber si podían identificarse las proteínas principales de cada una de las fracciones (precipitados y sobrenadantes) obtenidas con sulfato de amonio al 30 y 40% del medio de cultivo usado por *P. aeruginosa* PA $\phi$ 1, analicé en un gel de poliacrilamida-SDS muestras de un lisado de bacterias y de las fracciones S<sub>30</sub>, P<sub>30</sub>, S<sub>30-40</sub> y P<sub>30-40</sub> y encontré que la fracción P<sub>30</sub> estaba constituida por siete bandas (una principal y seis tenues) con pesos moleculares aparentes de 77, 69, 68, 58, 55, 53 y 43 kDa y que la fracción P<sub>30-40</sub> estaba constituida por cinco bandas de proteínas (tres principales y dos tenues) con pesos moleculares aparentes de 77, 69, 68, 43 y 38 kDa. La banda principal de la fracción P<sub>30</sub> fue la de 69 kDa y las principales en la fracción P<sub>30-40</sub> fueron las de 68, 43 y 38 kDa (ver Fig. 22).

Luego del análisis en PAGE-SDS determiné las proteínas y

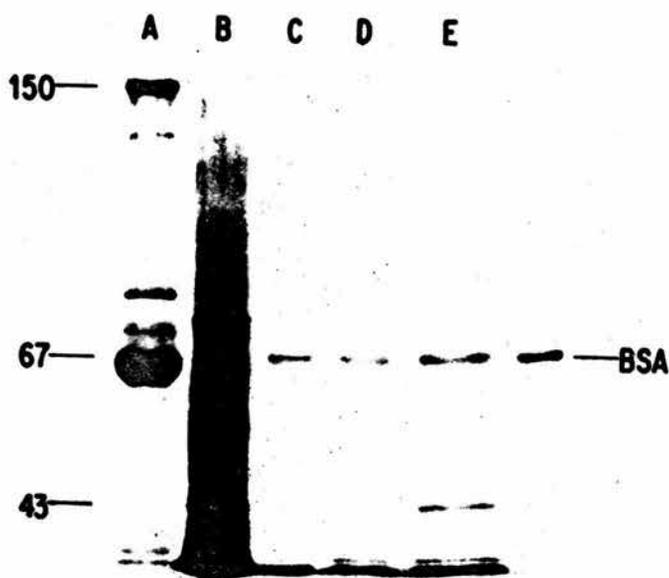


Fig 22. Patrón electroforético de la fracción P<sub>30-40</sub>. En los carriles correspondientes de un gel de poliacrilamida-SDS (identificados con letras mayúsculas) coloqué las siguientes muestras de 20  $\mu$ l: (A) suero humano normal (20  $\mu$ g); (B) un lisado de una colonia de *P. aeruginosa* (PA $\phi$ 1); (C) pastilla obtenida del medio usado por PA $\phi$ 1 con sulfato de amonio al 30% (fracción P<sub>30-40</sub>); (D) pastilla obtenida del medio usado por PA $\phi$ 1 con sulfato de amonio al 40% (fracción P<sub>30-40</sub>) (3  $\mu$ g); (E) fracción P<sub>30-40</sub> (6  $\mu$ g) y (BSA) Albúmina sérica bovina (2  $\mu$ g). Los números del lado izquierdo corresponden a los pesos moleculares de los marcadores (kDa).

TABLA 24

Contenido de proteínas en las fracciones obtenidas del medio usado por *P. aeruginosa* PAφ1 mediante precipitación con sulfato de amonio

Tubo	Adición de muestras diluidas			Reactivo de Bradford (ml)	DO <sub>595</sub>	Concn (μg/ml)	
	Contenido	FDF <sup>a</sup>	μl			Muestra diluida	Muestra original
1,1'	BSA <sup>a</sup>	8.3	40	2.0	0.213	124.11	1000
2,2'	MCU <sup>b</sup>	1	40	2.0	0.053	-	-
3,3'	P <sup>30</sup> <sup>c</sup>	1	40	2.0	0.176	83	83
4,4'	P <sup>30-40</sup> <sup>d</sup>	1	40	2.0	0.439	374.66	374.66

<sup>a</sup>Albúmina sérica bovina

<sup>b</sup>Medio de cultivo usado por PAφ1

<sup>c</sup>Pastilla obtenida con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 30%

<sup>d</sup>Pastilla obtenida con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 40%

<sup>e</sup>Factor de dilución final

TABLA 25

Relación entre la cantidad de medio usado por *P. aeruginosa* PAØ1 y la proteólisis de caseína

Pozos	MCU <sup>a</sup>		Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF <sup>b</sup>	Diám (mm)	Actividad proteolítica <sup>c</sup> (mU/10 $\mu$ l)
	De diln	$\mu$ l				
1, 1'	1:1	60	-	1	9.0	-
3, 3'	1:1	20	40	3	6.1	180
9, 9'	1:3	20	40	9	-	-
27, 27'	1:9	20	40	27	-	-

<sup>a</sup>Medio de cultivo usado por *P. aeruginosa*

<sup>b</sup>Factor de dilución final

<sup>c</sup>Calculada a partir de los valores de la Tabla 23

TABLA 26

Relación entre la cantidad de la fracción sobrenadante ( $S_{30}$ ) tratada con sulfato de amonio al 30% y la proteólisis<sup>3</sup> de caseína

Pozos	$S_{30}$ <sup>a</sup>		Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF <sup>b</sup>	Diám (mm)	Actividad proteolítica <sup>c</sup> (mU/10 $\mu$ l)
	De diln	$\mu$ l				
1,1'	1:1	50	-	1	7.9	-
2,2'	1:1	25	25	2	6.9	-
4,4'	1:2	25	25	4	5.7	234
8,8'	1:4	25	25	8	5.0	234
16,16'	1:8	25	25	16	-	-
32,32'	1:16	25	25	32	-	-

<sup>a</sup>Añadí 10  $\mu$ l de la fracción sobrenadante ( $S_{30}$ ) tratada con sulfato de amonio a cada pozo

<sup>b</sup>Factor de dilución final

<sup>c</sup>Calculada a partir de los valores de la tabla 23

TABLA 27

Relación entre la cantidad de la fracción P<sub>30</sub> tratada con sulfato de amonio al 30% y la proteólisis de caseína

Pozos	P <sub>30</sub> <sup>a</sup>		Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF <sup>b</sup>	Diám (mm)	Actividad proteolítica <sup>c</sup> (mU/10 $\mu$ l)
	De diln	$\mu$ l				
1,1'	1:1	60	-	1	13	-
3,3'	1:1	20	40	3	10.6	-
9,9'	1:3	20	40	9	7.9	-
10,10'	1:1	6	54	10	5	330
15,15'	1:1	4	56	15	4	-
20,20'	1:10	30	30	20	-	-
27,27'	1:9	20	40	27	-	-

<sup>a</sup>Añadí 10  $\mu$ l de la fracción P<sub>30</sub> a cada pozo

<sup>b</sup>Factor de dilución final

<sup>c</sup>Calculada a partir de los valores de la Tabla 23

TABLA 28

Relación entre la cantidad de la fracción (P<sub>30-40</sub>) tratada con sulfato de amonio al 40% y la proteólisis de caseína

Pozos	P <sub>30-40</sub> <sup>a</sup> De diln	$\mu$ l	Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF <sup>b</sup>	Diám (mm)	Actividad proteolítica <sup>c</sup> (mU/10 $\mu$ l)
1, 1'	1:1	60	-	1	-	-
2, 2'	1:1	20	40	3	-	-
3, 3'	1:1	10	35	4.5	-	-
4, 4'	1:3	20	40	9	-	-
5, 5'	1:4.5	20	40	13.5	-	-
6, 6'	1:9	20	40	27	8	-
7, 7'	1:13.5	20	40	40.5	8	-
8, 8	1:27	20	40	81	6	4860
9, 9	1:40.5	20	40	121	5.5	5589
10, 10	1:121	20	40	364	-	-

<sup>a</sup>Añadí 10  $\mu$ l de la fracción P<sub>30-40</sub> a cada pozo

<sup>b</sup>Factor de dilución final

<sup>c</sup>Calculada a partir de los valores de la Tabla 23

TABLA 29

Relación entre la cantidad de la fracción sobrenadante (S<sub>30-40</sub>) tratada con sulfato de amonio al 40% y la proteólisis de caseína

Pozos	S <sub>30-40</sub> <sup>a</sup>		Tris-HCl 15 mM pH 8 ( $\mu$ l)	FDF <sup>b</sup>	Diám (mm)	Actividad proteolítica <sup>c</sup> (mU/10 $\mu$ l)
	De diln	$\mu$ l				
1,1'	1:1	50	-	1	-	-
2,2	1:1	25	25	2	-	-
4,4'	1:2	25	25	4	-	-
8,8'	1:4	25	25	8	-	-
16,16'	1:8	25	25	16	-	-
32,32'	1:16	25	25	32	-	-

<sup>a</sup>Añadí 10  $\mu$ l de la fracción sobrenadante S<sub>30-40</sub> a cada pozo

<sup>b</sup>Factor de dilución final

<sup>c</sup>Calculada a partir de los valores de la Tabla 23

TABLA 30

Actividad proteolítica y contenido de proteínas en el medio de cultivo usado por *P. aeruginosa* PAø1 y en las fracciones S<sub>30</sub>, P<sub>30</sub>, S<sub>30-40</sub>, P<sub>30-40</sub> tratadas con sulfato de amonio

Fracción	Proteínas (mg/ml)	Vol (ml)	Actividad proteolítica		Recuperación %	Actividad específica (U/mg)
			(U/ml) <sup>a</sup>	Total <sup>b</sup>		
MCU <sup>c</sup>	I <sup>d</sup>	90	18.6	1674	(100)	-
S <sub>30</sub>	I	100	23.4	2340	140	-
P <sub>30</sub>	I	2	33	66	3.9	-
S <sub>30</sub> <sup>e</sup>	I	106	0	0	0.0	-
P <sub>30-40</sub> <sup>f</sup>	0.35	2	522.4	1044	62.4	1934

<sup>a</sup>mU/μl = U/ml

<sup>b</sup>Actividad total = (U/ml) por ml de la fracción (volumen)

<sup>c</sup>Medio de cultivo usado por PAø1

<sup>d</sup>Contenido insuficiente para poder ser determinado con el método de Bradford

<sup>e</sup>Sobrenadante obtenido del medio usado con sulfato de amonio al 30%

<sup>f</sup>Pastilla obtenida del medio usado con sulfato de amonio al 30%

<sup>g</sup>Sobrenadante obtenido del medio usado con sulfato de amonio al 40%

<sup>h</sup>Pastilla obtenida del medio usado con sulfato de amonio al 40%

ensayé la actividad proteolítica en agar/caseína para conocer la actividad proteolítica de cada fracción (Tablas 24, 25, 26, 27, 28 y 29). Encontré en el medio de cultivo usado (volumen total =90 ml) 18.6 u/ml, en  $S_{30}$  23.4 u/ml, en  $P_{30}$  33 u/ml, en  $P_{30-40}$  522.45 u/ml y en  $S_{30-40}$  ninguna actividad detectable (Tabla 30).

Concluí que las proteínas principales de las fracciones  $P_{30}$  y  $P_{30-40}$  sí pueden identificarse y caracterizarse, que la actividad proteolítica precipita totalmente en la fracción  $P_{30-40}$  y que se obtienen casi 0.75 mg de proteínas (con 1044 unidades de actividad proteolítica) en la fracción  $P_{30-40}$  por cada 90 ml de medio usado (i.e. 1160 unidades/mg de proteína).

#### 4. Efecto de cantidades variables de la fracción $P_{30-40}$ y del tiempo de incubación sobre la fragmentación de $IgA_1$

Ensayé la actividad proteolítica de la fracción  $P_{30-40}$  sobre  $IgA_1$  mediante inmunolectroforesis y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para saber si el patrón electroforético de la  $IgA_1$  era modificado por la fracción enriquecida.

Luego del análisis en PAGE-SDS de muestras de  $IgA$  incubadas con la fracción  $P_{30-40}$  encontré en todos los tiempos de incubación, sólo dos bandas de 68 y 47 kDa; a las 6 y 12 h de incubación apareció una banda de 65 kDa. En ningún caso observé la banda original de 150 kDa ( $IgA_1$ ).

Mediante el análisis por inmunolectroforesis encontré que el arco de inmunoprecipitación de  $IgA$  desapareció totalmente.

Concluí de este experimento que la actividad proteolítica principal exportada al medio usado por *P. aeruginosa* (PA $\phi$ 1) se encuentra en la fracción que precipita en el corte de sulfato de amonio que va del 30 al 40% y que la proteasa principal capaz de degradar a la caseína probablemente es la misma que corta a la IgA<sub>1</sub>.

Ya que en el experimento anterior no observé la banda original de IgA<sub>1</sub> a ningún tiempo a lo largo de la cinética, decidí llevar a cabo un ensayo con menor cantidad de P<sub>30-40</sub> y tiempos de incubación más cortos. Incubé diluciones dobles seriadas de la fracción P<sub>30-40</sub> con IgA<sub>1</sub> (8 mg/ml) durante 1 h a 37°C y encontré que en ninguna de las mezclas se observó claramente la banda de IgA (desapareció con la dilución 1:2). En las muestras con diluciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 de P<sub>30-40</sub> además de la banda de IgA<sub>1</sub>, aparecieron cuatro bandas principales de 68, 65, 44 y 37 kDa. La intensidad de la banda original de IgA fue mayor entre menor fue la cantidad de P<sub>30-40</sub> mientras que la intensidad de las bandas de 68, 65, 44 y 37 kDa aumentó proporcionalmente al aumentar la cantidad de P<sub>30-40</sub> en las mezclas (Fig. 23).

Concluí que la cantidad de la fracción P<sub>30-40</sub> era aún excesiva porque fragmentaba completamente a la IgA aun cuando la fracción hubiese sido diluída 8 veces. Probablemente la banda de 65 kDa corresponda al producto de corte de la IgA en la región de la bisagra mientras que las bandas de 68, 44 y 37 kDa correspondan a las proteínas presentes en la fracción P<sub>30-40</sub>.

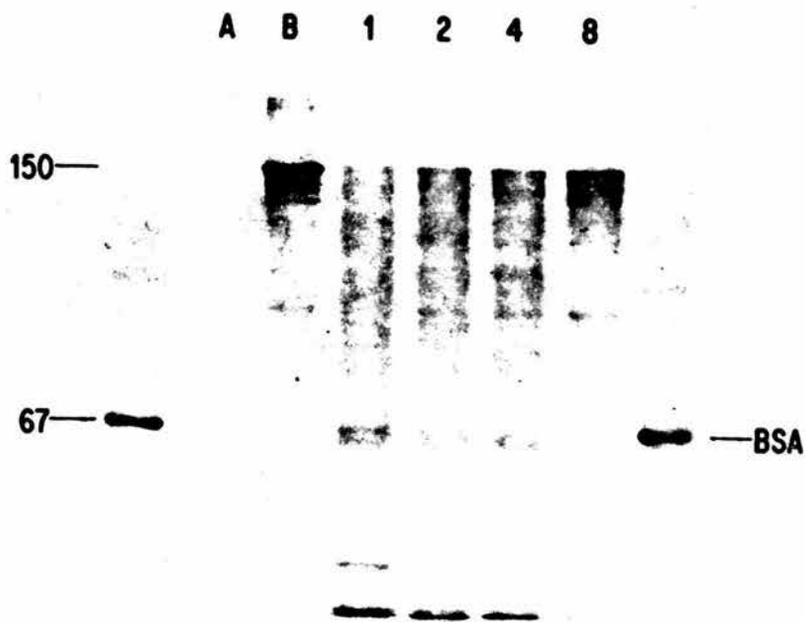


Fig 23. Patrón electroforético de la IgA incubada con la fracción P<sup>30-40</sup>. Incubé diluciones dobles seriadas de la fracción P<sup>30-40</sup> con IgA (8 mg/ml) durante 1 h a 37°C. En los carriles correspondientes (identificados con números y letras entre paréntesis) coloqué las siguientes muestras de 20  $\mu$ l: (A) medio de cultivo usado por PA $\phi$ 1 (200  $\mu$ g); (B) IgA (10  $\mu$ g); (1) IgA incubada con la fracción P no diluida (6  $\mu$ g), (2) IgA-P dilución 1:2 (3  $\mu$ g), (4) IgA-P dilución 1:4 (1.5  $\mu$ g), (8) IgA-P dilución 1:8 (0.75  $\mu$ g) y (BSA) albúmina sérica bovina (2  $\mu$ g). Los números del lado izquierdo corresponden a los pesos moleculares de los marcadores (kDa).

Por todas las evidencias anteriores concluí que 1) la incubación con una colonia de *P. aeruginosa* (PA $\phi$ 1) afecta la movilidad electroforética de IgA<sub>1</sub> pero no la de IgA de saliva total; 2) el corte de la IgA<sub>1</sub> por la proteasa parece ocurrir en la región de la bisagra; 3) La actividad proteolítica es mucho mayor en el medio de cultivo bacteriano que en las bacterias (esta actividad equivale a 540 mU de papaína/10  $\mu$ l y resiste la congelación-descongelación); 4) El arco de precipitación original de IgA incubada con medio de cultivo de PA $\phi$ 1 se transforma en dos arcos claramente definidos, lo que significa que la actividad de proteasa de IgA<sub>1</sub> es exportada al medio de cultivo; 5) la actividad proteolítica principal exportada al medio usado por PA $\phi$ 1 precipita en el corte de 30 a 40 gr de sulfato de amonio por cada 100 ml de medio usado (P<sub>30-40</sub>); 6) de la fracción P<sub>30-40</sub> se obtienen 0.75 mg de proteína (1044 unidades de actividad proteolítica) por cada 90 ml de medio de cultivo usado (i.e. 1160 U/mg de proteína); 7) la fracción P<sub>30-40</sub> contiene a la proteasa principal que degrada a la IgA<sub>1</sub>; 8) la actividad proteolítica no se inhibe por PMSF y puede identificarse y caracterizarse en geles de poliacrilamida-SDS.

## VI. DISCUSION

### A. Montaje del método de precipitación con jacalina

Roque-Barreira y Campos Neto (1985) describieron una lectina denominada jacalina capaz de precipitar tanto a la IgA del suero como a la IgA secretoria. Baezinger y Kornfeld (1974) y Kobayashi y col (1985) encontraron que la jacalina se une exclusivamente a la IgA<sub>1</sub>.

Kobayashi y Kondoh (1986) presentaron evidencias de que la jacalina puede distinguir entre IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Por otro lado Gregory y col. (1987) desarrollaron una técnica de separación rápida de IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub> utilizando cromatografía de afinidad con jacalina.

Como yo requería purificar IgA para usarla como sustrato en este trabajo, traté de montar un método de identificación de IgA<sub>1</sub> con jacalina. Bajo mis condiciones de trabajo, ratifiqué el hallazgo de que la jacalina precipita a la IgA<sub>1</sub> pero no a la IgA<sub>2</sub>. Sin embargo, Aucuturier y col. (1988) demostraron que la jacalina puede unirse a IgA<sub>2</sub>.

Finalmente encontré que el método de precipitación de IgA<sub>1</sub> con jacalina presenta las siguientes desventajas:

1. No es muy confiable ya que los resultados de diferentes grupos de investigación son contradictorios

respecto a su especificidad.

2. No es costeable ya que el método adecuado para la identificación de  $IgA_1$  requiere una concentración de lectina muy elevada (100 mg/ml).

Por lo tanto, decidí utilizar sueros de conejo anti-IgA obtenidos anteriormente en el laboratorio para la detección de la  $IgA_1$ .

### B. Purificación de $IgA_1$

Purifiqué la  $IgA_1$  a partir de un suero de mieloma humano para lo cual utilicé la técnica de Mestecky y Kilian (1985) que se basa en cromatografía en DEAE-c y la técnica de Fahey (1967)

Para purificar la  $IgA_1$  realicé una precipitación del suero de mieloma, con sulfato de amonio al 50%, adsorbí las proteínas de la pastilla obtenida por centrifugación a una columna de DEAE-c equilibrada con PB 10 mM pH 6 y eluí sucesivamente con PB 10 mM pH 6, PB 10 mM/NaCl 38 mM pH 7, PB 10 mM/NaCl 50 mM pH 8 y PB 10 mM/NaCl 100 mM pH 8. Con éste método, de los 14 mg de proteínas presentes en la fracción de inmunoglobulinas, 11.48 mg (82%) corresponden a  $IgA_1$ . Así, el rendimiento de la  $IgA$  del suero de mieloma obtenida fue de 27% (Tabla 20).

El rendimiento de  $IgA$  obtenido por este método de purificación fue mayor que el reportado por Mestecky y Kilian (1986).

### C. Caracterización de la principal proteasa extracelular de P. aeruginosa PA $\phi$ 1

#### 1. Efecto de la incubación de P. aeruginosa con IgA<sub>1</sub>

Kilian y col. (1983) demostraron que dos enzimas extracelulares de una cepa de P. aeruginosa atacan a las inmunoglobulinas. La elastasa induce la hidrólisis de las cadenas pesadas de IgA e IgG; la otra proteasa descrita por ellos es menos activa y sólo actúa sobre IgA<sub>1</sub> si la incubación se prolonga varios días. Ellos mismos dicen que la incidencia del corte de la IgA por P. aeruginosa no es clara ya que ninguna de las 15 cepas que estudiaron tenían actividad de proteasa. Quezada (1987) encontró que de 11 cepas clínicas 6 mexicanas y PA $\phi$ 1 produjeron modificaciones en el patrón inmunolectroforético de sIgA.

En contraste con lo mencionado por Kilian y col. (1983) encontré que la movilidad electroforética de IgA<sub>1</sub> sí fue modificada por incubación con una colonia de PA $\phi$ 1 durante 24 o 50 h, mientras que la de IgA de saliva no lo fue. Los resultados de mi trabajo muestran una clara incidencia de corte de IgA<sub>1</sub> por P. aeruginosa.

Frandsen y col. (1987) y Kilian y col. encontraron que las proteasas de distintos microorganismos (Bacterioides y Campocytophaga Haemophilus influenzae, Streptococcus sanguis, S. pneumoniae y Neisseria meningitidis) producen patrones de corte de IgA<sub>1</sub> diferentes. Estas diferencias se producen por cambios en la movilidad del fragmento Fc. El patrón de corte de IgA<sub>1</sub> producido por P. aeruginosa fue

completamente diferente a los obtenidos por Frandsen y col (1987) y Kilian y col. (1980). Lo anterior sugiere que el corte de  $IgA_1$  se lleva a cabo de distinta manera por diferentes microorganismos.

En el presente estudio, demostré que la movilidad electroforética de sIgA no es cortada por la(s) proteasa(s) lo cual corresponde con lo encontrado por Kilian y col. (1980) que mencionan que la sIgA es más resistente al corte por las proteasas de IgA que la IgA del suero. La explicación puede ser que una considerable porción de sIgA pertenece a la subclase  $IgA_2$  que es resistente al corte. Así mismo, tal vez la asociación de la IgA con el componente secretor hace que la molécula de sIgA sea menos susceptible al ataque por enzimas proteolíticas.

Que algunos investigadores no hayan encontrado actividad proteolítica en cepas de *P. aeruginosa* puede ser debido a que no tomaron en cuenta los factores que influyen en la producción de proteasas extracelulares por este microorganismo. Mc Kellar y col. (1982) y Jensen y col (1980) mencionan que *P. aeruginosa* requiere de ciertos requerimientos nutricionales para la producción de proteasas. Por otro lado, Janda y col. (1980) encontraron que hay una correlación entre la actividad proteolítica de *P. aeruginosa* y el sitio de donde se toma la muestra en un paciente para aislar y cultivar al microorganismo. El que no haya proteasas puede significar que se trataba de una

colonización y no de una verdadera infección.

Hasta aquí, las fallas de mi trabajo residen en que no determiné en el patrón inmunolectroforético, el fragmento Fc y el fragmento Fab. Así mismo no puedo hablar de especificidad, ya que estoy utilizando colonias completas de PA $\phi$ 1 que pueden secretar o presentar una mezcla compleja de proteínas con diversas actividades. Lo único que puedo concluir es que la cepa PA $\phi$ 1 tiene actividad proteolítica para IgA<sub>1</sub>.

## 2. Fragmentación de IgA<sub>1</sub> por P. aeruginosa (PA $\phi$ 1)

Al analizar el patrón electroforético de la IgA<sub>1</sub> incubada con una colonia de PA $\phi$ 1 a través del tiempo, encontré dos bandas intensas de 150 (IgA<sub>1</sub>) y 63 KDa, y otras tres bandas menos intensas de 115, 110 y 63 KDa. La banda de IgA<sub>1</sub> (150 KDa) disminuyó de intensidad con el tiempo en tanto que la de 63 KDa apareció a las 6 h y aumentó de intensidad con el transcurso del tiempo. Kilian y col. (1979) al describir los productos de corte de la IgA por Haemophilus y S. pneumonie encontraron que sus preparaciones enzimáticas causaron un corte completo de IgA a las 3 h de incubación y que los productos del corte fueron dos fragmentos con pesos moleculares de 65 y 54 KDa. Así mismo encontraron que el fragmento de 65 KDa correspondió al fragmento Fab.

Ya que mis resultados concuerdan con los obtenidos por Kilian y col. (1979), existe la posibilidad de que la actividad proteolítica principal de P. aeruginosa tenga su

efecto sobre la región de la bisagra de la molécula de  $IgA_1$ , promoviendo la formación de fragmentos Fab y Fc. Estos resultados también concuerdan con los de Robertson y col. (1983) quienes al mezclar  $IgA$  con la proteasa de U. urealyticum encontraron bandas de 110, 115 y 50 KDa y que con el curso del tiempo, la banda de 50 KDa se incrementó mientras que la banda original disminuía. La explicación que doy a la presencia de las bandas de 115 y 110 KDa que encontré en este trabajo es que tal vez sean productos intermediarios del corte por la enzima.

Los resultados obtenidos hasta aquí son similares a los encontrados con microorganismos diferentes a P. aeruginosa. Por lo tanto, no debe haber duda de que PA $\phi$ 1 evidentemente tiene una actividad de proteasa de  $IgA_1$ . Aún estoy hablando de colonias enteras y no había en este momento una fracción purificada de la proteasa de  $IgA_1$  de P. aeruginosa.

### 3. Actividad de la proteasa de P. aeruginosa

Era necesario saber primeramente si la actividad proteolítica era exportada o si formaba parte de la superficie de la bacteria. Para contestar esta pregunta realicé un ensayo de proteólisis en agar.

Tomando en cuenta el antecedente de que la mayoría de las cepas microbianas producen diferentes proteasas con pH óptimos y puntos isoeléctricos diferentes pero todas capaces de degradar caseína (Sokol y col. 1979), monté un ensayo similar al de Safarik (1988), Habermann y Hardt (1972)

y Sokol (1979) que utiliza caseína en geles de agarosa contenidos en cajas de petri.

Realicé un ensayo preliminar con papaína, proteasa conocida y bien caracterizada, y comparé su actividad con la del medio usado por PA $\phi$ 1. Este método resultó ser bastante sensible. El área de los halos aumentó proporcionalmente con la cantidad de papaína añadida (Fig. 18). Decidí utilizar las inversas de la concentración de proteína y el área neta de los halos porque al graficarlas obtuve una línea recta (Fig. 20). De este experimento pude saber cual fue la zona de linealidad en la que el área de los halos fue directamente proporcional a la papaína añadida. Obtuve la ecuación de la recta (área neta =  $0.205(\mu\text{g enzima})^{-1} + 0.023$ ). La zona de linealidad correspondió a los halos con diámetros entre 4.6 y 6.7 mm. Del análisis de esta gráfica obtuve los datos de la Tabla 23.

Para realizar el ensayo proteolítico con PA $\phi$ 1 realicé un cultivo en caldo nutritivo, el cual centrifugué para separar el paquete bacteriano del medio usado. Al estudiar la relación entre el diámetro de los halos de proteólisis producidos por el medio de cultivo sin bacterias y los producidos por el paquete de bacterias añadido a los pozos, encontré que la actividad proteolítica era mayor en el medio de cultivo.

Hasta este punto pude determinar que la actividad proteolítica de PA $\phi$ 1 era exportada al medio de cultivo. Es importante señalar que para obtener el sobrenadante con actividad proteolítica, las bacterias se dejaron crecer

durante un periodo de 18-20 h que corresponde al periodo de crecimiento logarítmico. Respecto a este punto, Jensen y col. (1980) encontraron que las proteasas extracelulares de *P. aeruginosa* se observaban primero en el medio de cultivo durante el periodo logarítmico (18 h) y no pudo detectarse en el paquete de bacterias en ningun estado de desarrollo. Simpson y col. (1988) encontraron más del 96% de la actividad de proteasas de *N. gonorrhoeae* en la fracción extracelular y solo escasa actividad proteolítica en la membrana y el periplasma. El pH óptimo del ensayo fue 8.0, lo cual concuerda con lo encontrado por Wretlind y Wadström (1977).

El método de proteólisis en agar es sensible, además de que un número muy grande de muestras puede ser aplicado y comparado al mismo tiempo; pero también tiene algunas limitaciones: la difusión de las proteasas debido a diferencias estructurales puede afectar el diámetro de los halos de proteólisis. Por lo tanto no es posible hacer una comparación exacta entre diferentes proteínas con diferentes propiedades de difusión (Habermann y Hardt, 1972).

#### 4. Obtención de la fracción proteolítica enriquecida

Ya que en el ensayo proteolítico en placa solo pude determinar que había actividad de caseinasa, realicé una inmunolectroforesis de medio de cultivo de PA $\phi$ 1 que había sido incubado con IgA<sub>1</sub> por 24 h a 37° C para saber si la actividad de IgA<sub>1</sub> se encontraba en el medio de cultivo usado

por PA $\phi$ 1. De esta manera encontré el mismo patrón de corte.

Con estas evidencias concluí que la proteasa de IgA<sub>1</sub> se exportaba al medio de cultivo y que podría ser la misma que degradaba a la caseína. Para enriquecer la actividad de corte de IgA<sub>1</sub> realicé precipitaciones con sulfato de amonio y obtuve que las proteínas responsables de la proteólisis precipitaron totalmente con una concentración de sulfato de amonio de 40 g/100 ml de medio de cultivo usado ya que no hubo proteólisis de caseína cuando una muestra del sobrenadante obtenido por la precipitación se colocó en una caja de agar-caseína. El método que utilicé resultó parecido a los de Fujimura y Nakamura (1987) y Elliot y col (1986).

Fujimura y Nakamura (1987) estudiando las proteasas de B. gingivalis encontraron una banda de 34 KDa. Mortensen y Kilian (1984) encontraron dos picos de actividad sobre IgA<sub>1</sub> en H. influenzae HK295 debidos a proteínas de 74 y 34 KDa; la proteinasa más activa fue la de 34 KDa. Jensen y col. (1980) encontraron dos proteasas con pesos moleculares de 35 y 52 KDa.

Los resultados que obtuve en este trabajo son similares a los de otros investigadores, tanto para P. aeruginosa como para otros microorganismos, ya que con muestras de la fracción P<sub>30-40</sub> analizadas en PAGE-SDS obtuve 3 bandas principales de 68, 43 y 38 KDa. La banda de 38 KDa es de tamaño similar a la de 34 KDa encontrada por

Jensen y col. (1980) y Fujimura y Nakamura (1987). Al comparar la actividad proteolítica de esta fracción con la del medio de cultivo original en placas de agar caseína obtuve que esta se enriqueció 28 veces y que la recuperación fue del 62% (Tabla 30).

Al ensayar la actividad proteolítica de la fracción que llamé  $P_{30-40}$  sobre  $IgA_1$  mediante inmunolectroforesis encontré que el arco original de inmunoprecipitación desapareció totalmente. Encontré que al incubar diluciones de la fracción  $P_{30-40}$  con  $IgA_1$  aparecieron 4 bandas principales de 68, 65 44 y 37 KDa. Ya que la banda de 65 KDa no se encontraba originalmente en la fracción  $P_{30-40}$ , tal vez sea producto del corte de la  $IgA_1$ . Esta mezcla enriquecida ( $P_{30-40}$  ya no se comporta como la muestra original ya que la digestión de la  $IgA_1$  fue excesivamente rápida y no fue posible la detección de los fragmentos Fc y Fab mediante inmunolectroforesis lo cual tal vez se debe al efecto de la concentración de las proteasas.

#### D. PERSPECTIVAS

La importancia de este trabajo es que la proteasa de  $IgA$  ha sido descrita como un factor importante en la colonización y por lo tanto en la infección por *P. aeruginosa*. La cuantificación de la actividad proteolítica probablemente nos de alguna información acerca de la virulencia de la cepa PAϕ1.

El siguiente paso que se tiene que dar para continuar este trabajo es separar las proteínas presentes en la fracción P<sub>30-40</sub>. Este es un punto clave ya que permitiría despejar por completo las dudas acerca de la presencia de la proteasa de IgA<sub>1</sub> en la cepa PAØ1 de *P. aeruginosa* así como completar su caracterización bioquímica. Trabajos adicionales pueden consistir en la caracterización del efecto de diferentes inhibidores y cationes divalentes como Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>.

Brown y Leak (1989) describieron un inmunoensayo para la detección de la actividad proteolítica de IgA que consiste de una placa que contiene agar con colonias bacterianas que luego son recubiertas de agarosa mezclada con IgA. Finalmente una membrana de nitrocelulosa cubierta con BSA acoplada con anticuerpos anticadenas ligeras (L) se coloca sobre la agarosa. Las áreas en donde el corte se ha llevado a cabo pueden revelarse con un anticuerpo anticadenas ligeras acoplado a biotina/avidina fosfatasa alcalina.

El uso de esta técnica para detectar la actividad proteolítica junto con alguna de las técnicas hasta aquí descritas podrían ser de mucha utilidad en un trabajo posterior para aclarar la presencia de la proteasa de IgA<sub>1</sub> en la cepa PAØ1 de *P. aeruginosa* y en cualquier otra.

## VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales de este trabajo son :

1. La actividad proteolítica de colonias de *P. aeruginosa* no afecta a la IgA de saliva total pero sí a la IgA<sub>1</sub> de mieloma.
2. El corte de la IgA<sub>1</sub> parece ocurrir en la región de la bisagra.
3. La actividad proteolítica de IgA<sub>1</sub> de *P. aeruginosa* es exportada al medio de cultivo y tiene una actividad de 540 mU de papaína/10 µl y es resistente a los procesos de congelación-descongelación.
4. La actividad proteolítica principal que es exportada al medio de cultivo por PAØ1 se encuentra en la fracción que precipita en el corte de 30-40 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de medio de cultivo usado.
5. La actividad proteolítico no es inhibible por PMSF.
6. La actividad proteolítica que precipita totalmente en la fracción P<sub>30-40</sub> se enriquece 28 veces con respecto a su

actividad inicial y tiene una actividad específica de 1934 U/mg.

7. La proteasa principal capaz de degradar a la caseína probablemente es la misma que corta a la IgA<sub>1</sub>.

## VIII. REFERENCIAS

- Axelsen NH, Krull J, Weeke B. A Manual of quantitative immunoelectrophoresis; Methods and applications Scandinavian Journal of Immunology 2 (Suppl 1), 1973
- Aucouturier P, Duarte F, Mihaesco E, Pineau N, Preud'homme. Jacalin, the human IgA and IgD precipitating lectin, also binds IgA<sub>2</sub> of both allotypes. J Immunol Meth 113:185-191, 1988.
- Baezinger J, Kornfel S. Structure of the carbohydrate units of IgA<sub>1</sub>. J Biol Chem 249:7270-7281, 1974
- Bergan T. Human and animal pathogenic members of the genus *Pseudomonas*. En: The Prokariotes, Nueva York: Springer Verlag 1981:(1):666-675
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254, 1976
- Brown TA, Leak I. A solid-phase immunoassay for detection of IgA protease activity on agar plates. J Immunol Meth 123:241-247, 1989
- Bunn-Moreno M, Campos Neto A. Lectin(s) extracted from seeds of *Arthocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distincts human T and B cell functions. J Immunol 127:427-429, 1981
- Davis BD, Dulbecco R, Eissen HN, Ginsberg HS, Wood WB, McCarty M. The nonfermenters. En: Microbiology. Nueva York: Harper and Row 1973:783-784
- Escobar Herrera J. Estudio de la contribución de plásmidos y bacteriófagos de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* a su patogenicidad. México, D. F.: Unidad de Morfología y Función, ENEP-Iztacala UNAM. 1987, págs. 2-8 y 14-16. Tesis de licenciatura
- Fahey JL, Terry EW. Ion exchange chromatography and gel filtration. En: Weir DM ed. Handbook of Experimental Immunology. Oxford: Blackwell 1978:8.1-8.7
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF. Electrophoretic analysis of human erythrocytes membrane. Biochemistry 10:2606-2627, 1971
- Frandsen EVG, Reinholdt J, Kilian M. Enzymatic and antigenic characterization of Immunoglobulin A<sub>1</sub>

proteases from Bacteroides and Capnocytophaga spp. Infection and Immunity 55(1): 631-638, 1986

Heide K, Schwick HG. Salt fractionation of immunoglobulins. En: Weir DM ed. Handbook of Experimental Immunology, Oxford: Backwell 1978:7.1-7.11

Heremans JF. Immunoglobulin A. En: Sela M ed. The Antigens vol II. Nueva York: Academic Press 1974:365-522

Janda JM, Atang-nomo S, Bottone EJ, Desmond E. Correlation of proteolytic activity of Pseudomonas aeruginosa with site of isolation. J Clin Microbiol 12:626-628, 1980

Jensen S, Pecycz I, Campbell J. Nutritional factors controlling exocellular protease production by Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 144:844-847, 1980

Jensen SE, Phillippe L, Tseng T, Stenke GW, Campbell JN. Purification and characterization of exocellular proteases produced by a clinical isolate and laboratory strain of Pseudomonas aeruginosa. Can J Microbiol 26:77-86, 1980

Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher RE. Pathogenic species of the genus Haemophilus and Streptococcus pneumoniae produce immunoglobulin A1 protease. Infect Immunity 26:143-149, 1979

Kilian M, Mestecky J, Kulhavy R, Tomana M, Butler WT. IgA proteases from Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, and Streptococcus sanguis: comparative immunochemical studies. J Immunol 124:2596-2600, 1980.

Kilian M, Thomsen B, Petersen TE, Bleeg HS. Occurrence and nature of bacterial IgA proteases. Ann NY Acad Sci 409:612-624, 1983

Kondoh H, Kobayashi K, Hagiwara K, Kajii T. Jacalin a jackfruit lectin precipitates IgA but not IgA subclass on gel diffusion reaction. J Immunol Methods 88:171-173, 1986

Kornfeld SJ, Plaut AG. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. Rev Infect Dis 3:521-534, 1981

McKellar RC. Factors influencing the production of extracellular proteinase by Pseudomonas fluorescens. J Appl Bacteriol 53:305-316, 1982

Mehta SK, Plaut AG, Calvanico NJ, Tomasi TB. Human immunoglobulin A: Production of an Fc fragment by an enteric microbial proteolytic enzyme. J Immunol 111:1274-1276, 1973

Mestecky, J y Kilian, M. Immunoglobulin A (IgA) Meth Enzymol 116:37-75, 1985

Milazzo FH, Delisle GJ. Immunoglobulin A protease in gram-negative bacteria isolated from human urinary tract infections. Infect Immun 43:11-13, 1984

Plaut AG. The IgA proteases of pathogenic bacteria. Ann Rev Microbiol 37:603-622, 1983

Quezada Calvillo R. Proteólisis de inmunoglobulinas por trofozoítos de Entamoeba histolytica. México, DF: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 1987, Tesis de maestría. (Biología Celular), págs. 27-37

Robbins SL, Angell M. 1971. Basic Pathology. Saunders, p 162

Roque-Barreira MC, Campos Neto A. Jacalin: An IgA-binding lectin. J Immunol 134:1740-1743, 1985

Stanley JC, Iglewsky BH. Production of alkaline protease by Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 12:131-133, 1980

Sokol PA, Ohman DE, Iglewsky BH. A more sensitive assay for detection of protease production by Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 9:538-540, 1979

Wang, A. Goodman, J y Fudenberg, H. N-terminal residues of heavy chains of human IgA myeloma proteins. J Immunol 103(5):1149-1151, 1969

Wikström MB, Dahlén G, Kaijser B Nygren H. Degradation of human immunoglobulins by proteases from Streptococcus pneumoniae obtained from various human sources. Infect Immunity 44:33-37, 1984

Wretling B, Wadström T. Purification and properties of a protease with elastase activity from Pseudomonas aeruginosa. J Gen Microbiol 103:319-327, 1977