

48
24.



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**IDENTIFICACION DE LA ENZIMA ENOLASA EN CEPAS
DE CANDIDA ALBICANS AISLADAS A PARTIR
DE HUMANOS Y ANIMALES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
P R E S E N T A :
RICARDO MONTES DE OCA TORRES

ASESORES DE TESIS:

- M. EN C. ENRIQUE SALAS TELLEZ
- Q. F. B. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA
- Q. F. B. ALMA LUCILA NUÑEZ DEL ARCO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

SUPERIORES DE ESTUDIOS
CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTO DE APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

El presente es
un documento de
carácter profesional.

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
Identificación de la enzima enolasa en cepas de Candida albicans aisladas a partir de humanos y animales.

que presenta el pasante: Ricardo Montes de Oca Torres.
con número de cuenta: 9256344-3 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 1 de Julio de 1997

PRESIDENTE DR. Ricardo Santiago Díaz.

VOCAL Q.F.I. Andrea Becerril Omsaya.

SECRETARIO M. en C. Enrique Salas Téllez.

PRIMER SUPLENTE P.B. Susana P. Miranda Castro

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Tonatiuh A. Cruz Sánchez

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo así como el camino emprendido para lograrlo a mis grandes educadores. Todo lo que haga y escriba jamás será comparado con ese gran esfuerzo diario, constante y ejemplar realizado para apoyarme. Con todo mi corazón para ustedes: mis padres...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores Enrique y Caro por su apoyo y oportunidad de trabajar en Micología.

En especial a ti que no necesito decir tu nombre. Gracias por permitir entrar y formar parte de ti. Gracias por ser mi amiga y compañera.

Agradezco a mis compañeros por su apoyo y aliento recibido.

Agradezco al M.C. Andrés Romero Rojas por su apoyo y acertados comentarios en la elaboración experimental de este trabajo.

Finalmente a mi querida FES-C...

INDICE.

TITULO	PAGINAS
Abreviaturas.	1
Resumen.	2
I. Introducción.	3
II. Justificación.	10
III. Hipótesis.	11
IV. Objetivo general.	12
Objetivos particulares.	13
V. Cuadro metodológico	14
Material y métodos.	15
1. Obtención de muestras clínicas.	15
2. Aislamiento e identificación de <i>Candida albicans</i> .	15
3. Obtención de un extracto crudo a partir de células de <i>Candida albicans</i> en su forma levaduriforme.	18
4. Electroforesis de los extractos crudos de <i>Candida albicans</i> .	20
5. Producción de sueros hiperinmunes.	24
6. Comprobación de la presencia de la proteína antigénica de 48 kD mediante Inmunotransferencia.	26
VI. Resultados.	29
1. Obtención de muestras clínicas.	29
2. Aislamiento e identificación de <i>Candida albicans</i> .	29
3. Obtención de los extractos crudos de <i>Candida albicans</i> .	30
4. Electroforesis de los extractos de <i>Candida albicans</i> .	30
5. Comprobación de la presencia de la proteína antigénica de 48 kD mediante Inmunotransferencia.	33
VII. Discusión.	36
VIII. Conclusiones.	38
Anexo 1.	39
Anexo 2.	47
IX. Bibliografía.	49

ABREVIATURAS.

Ag	Antígeno.
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetraacético
IM	Intramuscular.
kD	Kilodaltones.
PM	Peso Molecular.
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluorido.
Rf	Coficiente de Movilidad Relativa.
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud.
SDS-PAGE	Electroforesis el Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana.
TBS	Buffer Tris Salino.
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
YEPD	Medio Extracto de levadura, Peptona y Dextrosa.

RESUMEN.

A partir del estudio de extractos crudos obtenidos de 49 cepas de *Candida albicans* aisladas de humanos (59.3%) y animales (bovinos) (40.7%), se identificó electroforéticamente una proteína de peso molecular de 48 kD, la cual presentó las mismas características electroforéticas con la proteína enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como control positivo en la prueba de identificación.

La producción de sueros hiperinmunes positivos en conejo contra *Candida albicans* auxiliaron satisfactoriamente en la identificación de un antígeno de 48 kD de *Candida albicans* mediante la prueba de Western blot, así mismo los sueros producidos en ratón contra la enzima enolasa de 48 kD de *Saccharomyces cerevisiae* comprobó la reactividad antigénica de esta enzima con la proteína de 48 kD de *Candida albicans*. Por consiguiente, al igual que las mannanas de la pared celular de este hongo, una proteína de 48 kD se ha detectado específicamente en el suero de pacientes con infecciones sistémicas por *Candida albicans* (28,37), lo cual, además de darnos alguna idea de su posible papel en la virulencia de este microorganismo, la proteína identificada a partir de las cepas de *Candida albicans* pudiera ser la enolasa.

I. INTRODUCCION.

La Candidosis es una infección micótica que puede ser primaria o secundaria la cual es causada por diferentes especies del género *Candida*. La infección puede ser aguda o crónica, superficial o profunda y su espectro clínico es amplio (Cuadro 1) (15).

CUADRO 1
FORMAS CLINICAS DE CANDIDOSIS.
CANDIDOSIS SUPERFICIAL.
Infección cutánea.
Infección mucocutánea.
Onicomicosis.
Infección orofaríngea.
Vulvovaginitis.
Queratitis.
Conjuntivitis.
CANDIDOSIS PROFUNDA.
A) Inoculación local.
Esofagitis.
Candidosis gastrointestinal.
Infección del tracto urinario.
Peritonitis.
B) Infección diseminada hematogénica.
Candidemia.
Candidosis diseminada crónica (Hepato-esplénica).
Flebitis supurativa.

Kwon-Chung & Bennett, 1992.

Las infecciones por este género son micosis frecuentes y muy extendidas. El aumento dramático de casos de Candidosis en los últimos años es debido a la aparición del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), siendo esta infección micótica la más común en aquellos pacientes infectados por este virus que han desarrollado el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Cuadro 2) (7).

En su presentación sistémica, la Candidosis tiene alta mortalidad en comparación de una septicemia bacteriana, llegando a ser del 38 al 59% (13). Lo anterior puede ser debido a las dificultades que existe en el diagnóstico y tratamiento oportuno para esta micosis; debido a que la mayoría de los pacientes con Candidosis sistémica no demuestran algunas de las manifestaciones clínicas comunes, por lo cual esta infección puede ser atribuida a otras causas de una pirexia común; asociado a lo anterior, los hemocultivos no son confiables en el diagnóstico llegando a ser negativo en un 56% de pacientes con Candidosis diseminada (4). Debido a los largos periodos de incubación que ofrece un hemocultivo y a los métodos actuales del laboratorio clínico para la identificación del género y especies de *Candida* (17,33); el tiempo para conocer la etiología de la infección puede ser de 2-5 días; llegando esto a ser fatal para los pacientes (23). Por ello, es de gran interés de ofrecer nuevas alternativas al diagnóstico de la Candidosis sistémica, siendo en la actualidad las pruebas serodiagnósticas una buena alternativa en su diagnóstico (21), entre estas se estudian: la evaluación de antígenos específicos (32), pruebas serológicas basadas en la detección de antígenos circulantes (28,30) y determinación del valor diagnóstico de anticuerpos contra antígenos inmunodominantes (5).

El género *Candida* fue denominado así por Berfhout en 1923 e incluye más de 150 especies, pero solamente algunas de ellas pueden ser patógenas y desarrollarse a temperatura de 37°C (1,25).

Clasificación:

CLASE: *Deuteromycetes*
SUBCLASE: *Blastomycetidia*
ORDEN: *Criptococal*
FAMILIA: *Criptocaceae*
GENERO: *Candida*
ESPECIE: *albicans*

El principal agente etiológico causante de esta infección es *Candida albicans* (27) el cual es un microorganismo eucariótico que presenta una reproducción asexual manifestándose la formación de clamidosporas y blastosporas, es un hongo dimórfico, comensal oportunista que habita normalmente en membranas cutánea y mucosales particularmente del tracto digestivo del hombre y animales (31), y probablemente es albergada por la mayoría de los individuos en algún estado de su vida.

CUADRO 2

PORCENTAJE DE INFECCIONES MICOTICAS EN PACIENTES CON SIDA.

Infección	Porcentaje(%)
Candidosis oral.	40-90
Candidosis esofágica.	50
Criptococosis.	3-33
Histoplasmosis.	5-30
Coccidioidomicosis.	Rara.
Aspergilosis pulmonar.	5
Esporotricosis cerebral.	Rara.
Hialohifomicosis.	Rara.
Dermatofitosis.	20-90

Ellis, 1994

Candida albicans ha tenido en los últimos años una incidencia muy elevada debido a los diversos factores que predisponen a una infección por este hongo (23) (Cuadro 3); además, la susceptibilidad al tipo de infección depende de los deficiencias específicas de defensa del huésped (9). Por otra parte, *Candida albicans* tiene factores que contribuyen a su habilidad para comportarse como un microorganismo patógeno, algunos de estos son: adhesión (29), variantes genotípicos y fenotípicos (30), proteínas de choque térmico (22) y enzimas (14,23).

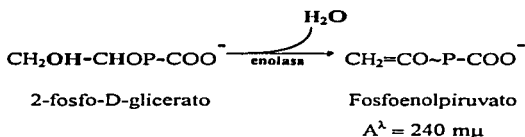
FACTORES QUE PREDISPONEN A UNA INFECCION POR <i>Candida albicans</i>		
CANDIDOSIS	PRESENTACIONES COMUNES	FACTORES
Superficial	Oral Vaginal	Antibióticos. Embarazo. Diabetes Mellitus. Infección con VIH. Función granulocítica defectuosa.
Candidosis mucocutánea crónica.	Candidosis mucocutánea crónica afectando múltiples sitios superficiales.	Muchas veces familiar. Defectos en la inmunidad mediada por células con desórdenes endócrinos.
Sistémica.	Uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro en pacientes inmunosuprimidos.	Leucemia aguda. Linfoma aguda. Quimioterapia citotóxica. Corticosteroides. Antibióticos de amplio espectro. Transplantes de órganos. Quemaduras severas. Cirugía gastrointestinal mayor.

Matthews, 1994.

En el aspecto enzimático, numerosos reportes indican la presencia de una enzima inmunogénica dominante en la serología de pacientes con Candidosis sistémica (19,21), siendo un determinante antigénico que se encuentra en el citoplasma del hongo tanto en su forma micelial como levaduriforme (20). Por otro lado diversos reportes referentes al aislamiento y purificación de este antígeno (5), determinación de su actividad enzimática (18,36), reactividad cruzada con un antígeno conocido de *Saccharomyces cerevisiae* (11) y

secuencia de aminoácidos (8,34), concluyen que se trata de la enzima glucolítica ENOLASA, la cual tiene un peso molecular de 48 kD.

Como se menciona anteriormente, la enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa, EC 4.2.1.11), es una enzima que pertenece a la clase de las liasas que está presente en el ciclo biológico de la glucólisis (6), y cataliza la deshidratación del 2-fosfo-D-glicerato generando fosfoenolpiruvato en presencia de iones divalentes metálicos Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} , además cataliza la reacción de manera reversa durante la gluconeogénesis (10); la enolasa es inhibida por iones fluoruro porque forma un complejo con el magnesio eliminando así eficazmente este cofactor de la reacción enzimática. Los iones calcio la inhiben competitivamente (3).



A partir de ciertos valores obtenidos por métodos analíticos se concluye que la enzima enolasa contiene 8 átomos de sulfuro y que un átomo de mercurio unido con la molécula proteica. Presumiblemente la proteína activa tiene un átomo de magnesio unido (3).

La enolasa es una proteína enzimática, constituida por dos subunidades estructurales de clase α_2 , la cual su peso molecular varía dependiendo de su origen; comprendiendo un rango de 82-100 kD siendo el peso para la enolasa aislada a partir de levaduras en forma dimérica de 92 kD. Solo en esta forma la enolasa es enzimáticamente activa. El peso molecular de las subunidades varía según el origen de su aislamiento, comprendiendo un rango de 44-50 kD (6).

Para las especies del género *Candida*, la enolasa es una enzima glucolítica constitutiva, y la especie *Candida albicans* la libera en el proceso de infección mucocutáneo a sistémico, siendo un componente inmunogénico en suero de pacientes con esta infección pudiendo ser detectada antigenicamente en forma monomérica con un peso molecular de 48 kD (12,24).

II. JUSTIFICACION.

La previa identificación de antígenos inmunodominantes de origen proteico, es uno de los pasos a seguir en la búsqueda de marcadores específicos para el diagnóstico de enfermedades micóticas como la Candidosis sistémica o invasiva, siendo la enolasa de 48 kD de *Candida albicans* quien pudiera cubrir estas expectativas.

III. HIPOTESIS.

Si la proteína de 48 kD de *Candida albicans* es constitutiva e inmunogénica, entonces podrá ser aislada y posteriormente identificada mediante electroforesis e Inmunotransferencia, respectivamente, en las cepas de *Candida albicans* aisladas a partir de humanos y animales.

IV. OBJETIVO GENERAL.

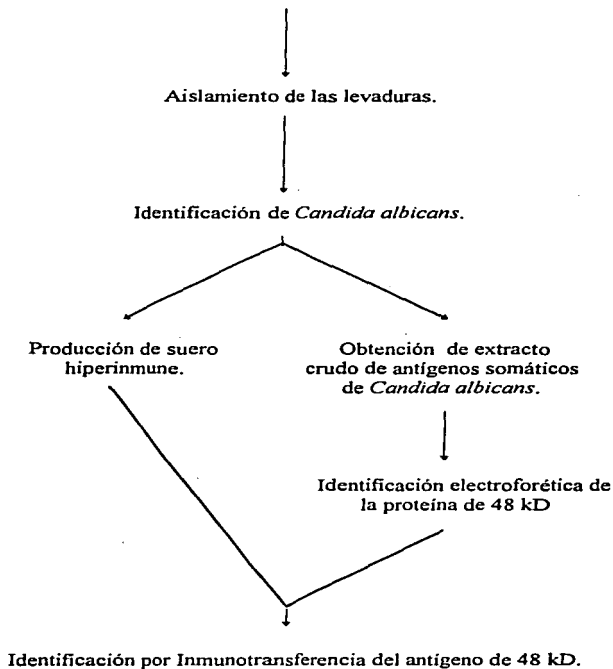
Identificar mediante las técnicas de Electroforesis e Inmunotransferencia, la presencia de una proteína antigénica de 48 kD en cepas de *Candida albicans* aisladas en muestras clínicas de humanos y bovinos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Obtener muestras clínicas de tipo exudados y urocultivos en pacientes con Candidosis.
2. Aislar e identificar a *Candida albicans* a partir de las muestras clínicas obtenidas.
3. Obtener extractos crudos de las cepas de *Candida albicans* en su fase levaduriforme.
4. Identificar electroforéticamente la proteína de 48 kD a partir de los extractos crudos
5. Producir suero hiperinmune en conejo contra *Candida albicans*.
6. Producir suero hiperinmune en ratón contra la enzima enolasa.
7. Identificar mediante inmunotransferencia la proteína antigénica de 48 kD en *Candida albicans*.

V. CUADRO METODOLOGICO.

Obtención de muestras clínicas de pacientes con Candidosis.



MATERIAL Y METODOS.

1. OBTENCION DE MUESTRAS CLINICAS.

Las muestras clínicas (Exudados y urocultivo) fueron obtenidas de 42 casos clínicos de origen humano en el laboratorio de análisis clínicos de la ENEP *Iztacala*, UNAM.

Se utilizaron 40 cepas de *Candida spp* de origen bovino donadas por la cátedra de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en Ciudad Universitaria, UNAM.

2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Candida albicans*.

Las muestras clínicas obtenidas fueron sembradas en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para su aislamiento.

Los métodos utilizados en el laboratorio para la identificación del género y especie de las cepas obtenidas fueron los siguientes:

a) **Tinción de Gram.** Con el objeto de identificar las levaduras (33).

b) **Formación del tubo germinal.** *Candida albicans* produce un filamento hifal que da origen al tubo germinativo cuando las levaduras fueron incubadas en suero de equino a 37°C durante 3 horas (33).

c) **Producción de Clamidosporas.** *Candida albicans* tiene la habilidad de formar esporas esféricas de doble pared llamadas Clamidosporas cuando una muestra de células se sembraron por la técnica de rasgado o Sandwich en agar Czapek Dox o agar Corn Meal más 1% de Tween 80. Se revisó al microscopio cada 24 horas para identificar las estructuras (33).

d) **Tolerancia a pH ácido.** *Candida albicans* tiene la habilidad de crecer a pH de 1.2-1.5 en medio Czapek Dox (33).

e) **Auxonograma y Zimograma.** Pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos, respectivamente (ver cuadro 4) (17).

Para cada prueba realizada para la identificación de *Candida albicans*, se dispuso de la cepa de referencia *Candida albicans* (ATCC-10232) como control positivo y *Candida krusei* como control negativo.

CUADRO 1 ASIMILACION (AUXONOGRAMAS), FERMENTACION (ZIMOGRAMAS) DE ELEMENTOS CON CARBONO DE <i>Candida albicans</i>		
Prueba	Carbohidrato	Resultado
Auxonograma	D-glucosa	+
	maltosa	+
	sacarosa	+
	D-galactosa	+
	lactosa	-
	rafinosa	-
	inositol	-
	cellobiosa	-
	D-xilosa	+
	trehalosa	+
	L-arabinosa	V
	adonitol	V
	2-ceto-gluconato	+
	metil-D-glucósido	+
	melezitosa	V
N-acetilglucosamina	+	
Zimograma	D-glucosa	+
	maltosa	+
	sacarosa	V

Mariat & Drouhet, 1996

3. OBTENCION DE UN EXTRACTO CRUDO A PARTIR DE CELULAS DE *Candida albicans* EN SU FORMA LEVADURIFORME.

Condiciones de crecimiento de la levadura.

A partir de un cultivo de *Candida albicans* crecidas a 37°C durante 24 horas en medio SDA (26), las levaduras fueron recolectadas y crecidas nuevamente en caldo YEPD (Extracto de levadura, Peptona y Dextrosa) (ver anexo 1) a 37°C durante toda la noche con agitación constante.

Preparación de un extracto crudo de antígenos somáticos. Método I VORTEX (8).

Las células fueron concentradas por centrifugación a 1, 500 x g durante 10 minutos y lavadas tres veces con agua destilada. Las blastosporas (10⁹ células) fueron resuspendidas en 1 ml de buffer lisis (ver anexo 1). Un volumen equivalente de 0.4 mm de perlas de vidrio fueron adicionadas y las células se rompieron por acción del "vortex" a 4°C. El sobrenadante fue decantado en un tubo limpio y las perlas de vidrio fueron lavadas dos veces con 1 ml de Buffer lisis conteniendo 0.1% de dodecil sulfato de sodio. El sobrenadante fue clarificado por centrifugación a 10, 000 x g durante 20 minutos.

Preparación de un extracto crudo con antígenos somáticos. Método II SONICACION (36).

Las células fueron concentradas por centrifugación a 1, 500 x g durante 10 minutos y lavadas tres veces con agua destilada. El botón final fue disuelto en 20 ml de agua destilada conteniendo 1 mM de fenil metil sulfonil fluorido (PMSF), como inhibidor de proteasas. Las células fueron sonicadas por seis ciclos de 6 minutos cada uno con un sonicador a un poder de 75 W. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 2, 000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 100, 000 x g durante 1 hora a 10°C, posteriormente el sobrenadante fue dializado con TBS (ver anexo 1) hasta obtener un volumen aproximado de 1.0 ml.

Fración soluble.

El sobrenadante obtenido por los dos métodos descritos anteriormente, representan la fracción soluble de antígenos somáticos de *Candida albicans* y la concentración de proteínas fue medido por el método de Bradford (2) (Anexo 2).

4. ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE *Candida albicans*.

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% por el método descrito por Laemmli (16) como se indica a continuación:

Preparación del gel de separación al 10%.

1.5 M Tris (Hidroximetilaminometano)-HCl, pH 8.8	2.5 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	100.0 μ l
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida)	3.3 ml
Persulfato de amonio (10%)	50.0 μ l
Agua destilada	4.04 ml
TEMED	10.0 μ l
	<hr/>
Volumen total	10.0 ml

La mezcla anterior se vertió rápidamente a la cámara de corrimiento electroforético, guardando una muestra para observar el momento de la polimerización

Preparación del gel de concentración al 4%.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
Dodecilsulfato de sodio	100.0 μ l
Acrilamida (30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida)	1.3 ml
Persulfato de amonio (10%)	50.0 μ l
Agua destilada	6.1 ml
TEMED	10.0 μ l
	<hr/>
Volumen total	10.0 ml

Se adicionó la mezcla anterior con cuidado y rapidez sobre el gel de separación ya polimerizado en la cámara de electroforesis, guardando una pequeña porción para observar el momento de la polimerización, se colocó un peine de diez dientes el cual se retiró cuando el gel de condensación se polimerizó, dejando de esta manera los pozos formados. Posteriormente se adicionó a la cámara el buffer de corrimiento y se realizó un precorrimiento a 120 volts durante 20 minutos para eliminar de esta manera posibles impurezas en el gel.

Preparación de las muestras.

Los extractos crudos de antígenos somáticos de las cepas de *Candida albicans*, se diluyeron en una relación de 1:4 con buffer muestra o solución digestora (ver anexo 1).

Corrimiento electroforético.

Se realizó el corrimiento electroforético de la fracción soluble de antígenos somáticos de la cepa de referencia *Candida albicans* obtenida por los métodos de vortex y sonicación; a los extractos crudos de las cepas de *Candida albicans* problema obtenidos por el método de vortex, a los marcadores de peso molecular así como al control positivo de la prueba la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Preparado el gel electroforético, se adicionó las muestras previamente digeridas en las cuales había 20-40 µg de proteínas. Las muestras se adicionaron con una jeringa Hamilton, una en cada pozo, este último con capacidad hasta 20µl. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: Miosina (200 KDa), Fosforilasa B (97.4 KDa), Albúmina sérica bovina (68 KDa), Ovoalbúmina (43 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), β-lactoglobulina (18.4 KDa) y lisozima (14.3 KDa) (Gibco BRL, USA).

Condiciones de corrimiento.

La condición de poder de corrimiento para una resolución óptima con un mínimo de distorsión térmica en las bandas proteicas fue a 180 volts con voltaje constante, con un tiempo aproximado de corrimiento de 45 minutos.

Tinción de las proteínas en el gel.

Las proteínas en el gel fueron teñidas durante 3-4 horas con la solución azul de Coomassie (ver anexo I) y desteñidas con una Solución desteñidora 1 la cual es una mezcla de metanol, ácido acético y agua (5:1:1.25) (ver anexo 1) durante 1-3 horas. Para eliminar el exceso de colorante, el gel se sumergió posteriormente a una solución desteñidora 2 la cual está formada por mezcla de metanol, ácido acético y agua (1:1.4:17.6) (ver anexo 1).

Determinación del peso molecular de las proteínas presentes en el gel.

El peso molecular de las proteínas observadas en el gel fue calculado mediante una curva estándar de proteínas con peso molecular conocido. Esta curva estándar de proteínas se realizó trazando el coeficiente de movilidad relativa (Rf) de cada proteína estándar contra Log^{10} de su peso molecular en kD. El peso molecular de la proteína a identificar de las muestras así como del control positivo de la enzima se determinó calculando sus Rf sobre la curva estándar e interpolando el valor del Log^{10} del peso molecular. El antilogaritmo de ese número es el peso molecular de la proteína.

RF: desplazamiento que tiene una muestra con respecto a la distancia total que recorre la muestra (frente de corrimiento).

5. PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES.

Preparación de la suspensión de levaduras de *Candida albicans*.

La cepa *Candida albicans* ATCC-10232 de referencia fue crecida en 200 ml de YEPD por toda la noche; posteriormente fueron centrifugadas a 1, 500 x g durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con agua destilada y el botón resultante se inactivó con formaldehído al 0.25% durante 24 horas a 4°C. Las levaduras fueron lavadas dos veces con agua destilada y se resuspendieron en solución salina fisiológica estéril hasta obtener una concentración de 2×10^8 células por ml.

Producción de suero hiperinmune contra levaduras de *Candida albicans* en conejo.

Se utilizó un conejo macho raza Nueva Zelanda de 2.5 Kg. de peso con el siguiente protocolo de inmunización: 2 ml de una emulsión que contenía 1 ml del Adyuvante Completo de Freund más 1 ml de la suspensión de levaduras fueron inyectados vía intramuscular (Im). 14 días después se inoculó 2 ml de una suspensión que contenía 1 mL del Adyuvante Incompleto de Freund más 1 mL de la suspensión de levaduras por vía Im. Después de 28 días se volvió a inocular 1 ml de la suspensión de levaduras. Para el día 40 se dio un refuerzo

de 1 ml de la suspensión de levaduras por la misma vía de inoculación hasta obtener un título de aglutinación en placa de 1:128. La aglutinación en placa se realizó de la siguiente forma: en un pozo de la placa se colocaron 50µl de suero realizándose diluciones dobles y 50µl de una suspensión de levaduras al 2%, se mezclaron y agitaron a 160 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente y se prosiguió a leer los resultados. Como control negativo se utilizó suero normal del conejo.

Producción de suero hiperinmune contra la enzima enolasa en ratón.

Se utilizaron dos ratones a los cuales se les aplicó el siguiente protocolo de inmunización: se les inoculó 0.5 mg de la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae* disuelta en 0.5 ml de Solución Buffer de fosfatos (PBS) (ver anexo 1) pH 7.4 más 0.5 ml del Adyuvante completo de Freund, vía subcutánea (SC). Veinte días después se inoculó la misma dosis en 0.5 ml del PBS vía SC. El día veintitrés se les tomó la muestra a los ratones inmunizados y al ratón control negativo no inoculado.

6.COMPROBACION DE LA PRESENCIA DE LA PROTEINA ANTIGENICA DE 48 kD MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA.

La transferencia se realizó por el método descrito por Towbin y Col. (35).

Inicialmente se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% de las siguientes muestras: los extractos crudos de antígenos somáticos de *Candida albicans* ATCC-10232 de referencia, de la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae*; siguiendo lo anteriormente descrito.

Montaje y condiciones de transferencia. Se cortó un trozo de membrana de nitrocelulosa y dos de papel filtro al tamaño del gel obtenido en la electroforesis. Se humedeció la membrana y el papel filtro en buffer de transferencia. Se ensambló el gel electroforético, la membrana de nitrocelulosa y papel filtro como se indica en la figura 1.

Se colocaron las partes anteriores en la cámara de transferencia cuidando que la membrana de nitrocelulosa quedara del lado del electrodo positivo.

La transferencia se corrió a 18 volts durante 24 horas con flujo de agua constante para evitar un posible calentamiento. Una vez terminada la transferencia se desmanteló el aparato y el "Sandwich". Se marcó la membrana mostrando la orientación del gel.

Para corroborar la transferencia se tiñó tanto el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie como se indica anteriormente, así como la primera y la última de las tiras de nitrocelulosa previamente cortadas con solución Negro de Amido (ver anexo 1).

Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos. Las tiras cortadas se sumergieron en una solución bloqueadora (ver anexo 1) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados en Buffer Salino Tris (TBS) (ver anexo 1) durante 15 minutos cada uno.

FIGURA 1.

ACRILICO
FIBRA
PAPEL FILTRO
GEL DE POLIACRILAMIDA
MEMBRANA DE NITROCELULOSA
PAPEL FILTRO
FIBRA
ACRILICO

Detección de las proteínas transferidas. Se sumergieron las tiras de nitrocelulosa durante 4 horas a temperatura ambiente en tubos de ensaye previa y debidamente etiquetados que contenían por separado los siguientes sueros: suero de conejo anti-*Candida albicans* positivo a una dilución 1:128, suero de ratón antielasa sin diluir, suero de conejo y ratón sin inocular como controles negativos. Posteriormente las tiras se transfirieron a tubos de ensaye que contenían TBS con el fin de realizar tres lavados de 15 minutos. En seguida, las tiras se enfrentaron con la Proteína A peroxidasa diluida 1:100 durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Se realizaron tres lavados como se menciona anteriormente. Finalmente las tiras son reveladas con una solución que contiene peróxido de hidrógeno y α -cloronaftol (ver anexo 1).

VI. RESULTADOS.

1. Obtención de las muestras clínicas.

Se obtuvieron las siguientes muestras clínicas:

Humano	Ex. Faringeo	25	16
	Urocultivo	4	2
	Ex. vaginal	12	10
	Ex. uretral	1	1
Bovino	Mastitis	40	20
Total		82	49

2. Aislamiento e identificación de *Candida albicans*.

Después de la incubación en medio SDA de las 42 muestras de estudios en humano, se obtuvieron un total de 41 cepas, una de ellas no creció; de las cuales 29 cepas fueron positivas a las pruebas del laboratorio realizadas para la identificación de *Candida albicans*. De la misma forma, de las 40 cepas de *Candida* spp de origen bovino, 20 cepas se confirmaron como *Candida albicans*. Por lo consiguiente se trabajo con un total de 49 cepas de *Candida albicans*, de estas últimas un 59.3% fueron de humano y un 40.7% fueron de

bovino. Las pruebas realizadas a la cepa de *Candida krusei* (control negativo) resultaron negativas a las pruebas de identificación de *Candida albicans*.

3. Obtención de los extractos crudos de *Candida albicans*.

Se obtuvieron los extractos crudos con antígenos de *Candida albicans* ATCC-10232 de referencia mediante los métodos I vortex y II sonicación; los cuales presentaron una concentración final de proteínas muy similar, siendo de:

Método I	Método II
1.29 mg/ml	1.39 mg/ml

4. Electroforesis de los extractos crudos de *Candida albicans*.

Se corrió un gel discontinuo de poliacrilamida duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% del extracto crudo con antígenos somáticos de *Candida albicans* ATCC-10232 de referencia obtenidos por “vortex” (método I) y por “sonicación” (método II) descritos anteriormente, los cuales mostraron una gran similitud en el perfil de bandeo proteico (datos no mostrados).

Por otra parte se corrieron los geles electroforéticos al 10% de los extractos crudos de las 49 cepas de *Candida albicans* de origen diverso obtenidos mediante el método I “vortex”, los cuales muestran una considerable heterogeneidad en su contenido proteico; un total de 33 bandas fueron detectadas en el patrón electroforético a partir de los extractos obtenidos de las levaduras aisladas de humano y bovino (figura 2).

El contenido de una proteína de 48 kD es común en todos los extractos crudos analizados, incluyendo el extracto crudo de la cepa *Candida albicans* ATCC-10232 de referencia (figura 3).

Por otra parte, la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae* usado como control positivo, muestra un coeficiente de movilidad relativa idéntico a la proteína identificada de 48 kD en todas las muestras analizadas de *Candida albicans*.

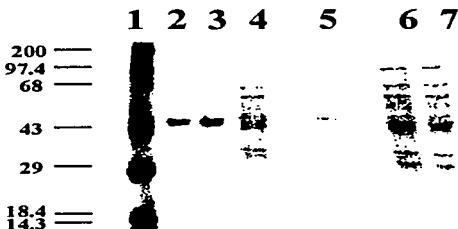
Figura 2.
Patrón electroforético de proteínas
contenidas en los extractos crudos de
***Candida albicans*.**

número de banda	PM kD	A	B	C	D
	200				—
1	97.4	—	—		—
2		—	—		
3		—	—		
4		—	—		
5		—	—		
6	66	—	—		—
7		—	—		
8		—	—		
9		—	—		
10		—	—		
11		—	—		
12	46	—	—	—	
13	43	—	—		—
14		—	—		
15		—	—		
16		—	—		
17		—	—		
18		—	—		
19		—	—		
20		—	—		
21	29	—	—		—
22		—	—		
23		—	—		
24		—	—		
25		—	—		
26		—	—		
27		—	—		
28		—	—		
29		—	—		
30		—	—		
31		—	—		
32		—	—		
33	18.4	—			—
	14.3				—

Categorías del contenido proteico de los extractos crudos *Candida albicans*. Columna A: Patrón electroforético de las proteínas contenidas en los extractos crudos de *C. albicans*, aislada a partir de humanos. Columna B: Patrón electroforético de *C. albicans* aislada a partir de Bovinos. Columna C: Patrón electroforético de la enolasa de 48 kD, utilizada como control positivo. Columna D: Marcadores de peso molecular.

FIGURA 3.

Presencia de la proteína de 48 kD de *Candida albicans* aislada a partir de humanos y bovinos en geles de poliacrilamida al 10%.

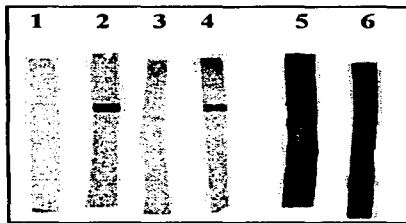


Patrón electroforético de los extractos proteicos de cepas de *Candida albicans*. Líneas: 1, Marcadores de peso molecular (kD); 2 y 3, muestras duplicadas de la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11) de *Saccharomyces cerevisiae* de 48 kD como control positivo; 4, extracto proteico de la cepa de referencia de *Candida albicans*; 5 y 6 extractos proteicos de las cepas de *Candida albicans* aisladas a partir de humanos, y 7 extractos de *Candida albicans* aislada de bovino.

5. Comprobación de la presencia de la proteína antigénica de 48 kD mediante Inmunotransferencia.

Las proteínas en los geles transferidas a papel de nitrocelulosa fueron enfrentadas con los sueros hiperinmunes producidos, observando en la figura 2 el siguiente perfil de bandeado identidad.

FIGURA 3.
INMUNOTRANSFERENCIA.



Inmunotransferencia del extracto con antígenos de *Candida albicans* de referencia fraccionados con SDS-PAGE. Líneas: 2, Transferencia de proteínas de la cepa *Candida albicans* ATCC-10232 de referencia, enfrentado con el suero de conejo anti-*Candida albicans*. Muestra diferentes bandas de identidad antigénica, notándose la presencia del antígeno proteico de 48 kD de *Candida albicans*; 4, Transferencia de proteínas de la cepa de *Candida albicans* de referencia enfrentadas con suero de ratón anticanolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrándose una banda de identidad contra el antígeno 48 kD; 5, Transferencia de la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae* enfrentada con suero de conejo anti-*Candida albicans* positivo. Identificándose una banda de identidad a un antígeno de 48 kD en cada tira; 1 y 3, Transferencia de la enzima enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* enfrentada con suero de conejo y ratón no inoculados como controles negativos, respectivamente. No se observan bandas de identidad, y 6, Transferencia de las proteínas de *Candida albicans* de referencia enfrentada con suero normal de conejo. No se observan bandas de identidad.

El análisis de la inmunotransferencia del suero anti-*Candida albicans* en conejo, demostró una respuesta a una proteína con peso molecular aparente de 48 kD, además de mostrar una reactividad específica hacia el antígeno enzimático enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae* de

peso molecular similar (Fig. 2). Por otra parte el análisis de la inmunotransferencia del suero anti-enolasa de ratón, indicó una banda de identidad a una proteína con peso molecular de 48 kD de *Candida albicans*, lo que posiblemente confirme la identificación inmunogénica de la proteína enzimática enolasa de *Candida albicans* (Fig. 2).

VII. DISCUSION.

A partir de los resultados obtenidos se establece que los métodos de vortex y sonicación (métodos I y II, respectivamente), utilizados en la extracción de antígenos somáticos de la cepa de *Candida albicans* ATCC-10232 de referencia, mostraron un bandeo proteico muy semejante al comparar su patrón electroforético; así mismo, una proteína de 48 kD es común en ambos métodos de extracción. La concentración final de proteínas en los extractos crudos obtenidos por los dos métodos antedichos, resultó muy similar. Por lo consiguiente, la obtención de los antígenos somáticos para las cepas de *Candida albicans* problema, se realizó por el método I descrito por Franklin, K.M. y Col.(*) puesto que ofrece una metodología más rápida, sencilla, económica con respecto a la metodología II descrita por Zöller, L y Col.(36).

Por otra parte, los corrimientos electroforéticos realizados a los extractos crudos de antígenos somáticos de las cepas de *Candida albicans* en su fase levaduriforme de origen humano y animal, muestran entre sí gran heterogeneidad en el contenido de proteínas; empero, la presencia de una proteína de 48 kD, está presente en las 49 cepas de *Candida albicans* revisadas (figura 1).

La confirmación electroforética precisa de la banda de 48 kD en las diferentes cepas de *Candida albicans*, se realizó mediante la comparación de su coeficiente de movilidad relativa y peso molecular con la banda control positivo de la enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual muestra un peso molecular calculado de 48 kD y un coeficiente de

motilidad relativa idéntico a la proteína estudiada de los extractos crudos antes mencionados. Por lo tanto, se demuestra que la proteína de 48 kD en los extractos crudos de las cepas de *Candida albicans* aisladas a partir de humano y animal, así como la enzima enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae* usada como control positivo tienen las mismas características electroforéticas.

Actualmente se ha reportado la presencia del antígeno inmunodominante enolasa en el suero de pacientes con Candidosis sistémica (28), además, la identificación de anticuerpos específicos hacia un antígeno inmunodominante de 48 kD presentes en pacientes infectados con VIH que desarrollaron la enfermedad del SIDA (8). Debido a la importancia de su posible aplicación como futura herramienta para el diagnóstico de Candidosis sistémica, la previa identificación del antígeno enolasa de 48 kD de *Candida albicans* es de gran importancia en la búsqueda de marcadores específicos para esta infección. El uso de sueros hiperinmunes de conejo y ratón inmunizados contra las levaduras de este hongo y la enolasa (E.C. 4.2.1.11, Sigma) de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, confirma el exitoso aislamiento e identificación de la proteína antigénica de 48 kD, además de verificar su reactividad antigénica con la proteína enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*. En este último aspecto, se necesitará de realizar pruebas específicas con esta proteína de 48 kD de *Candida albicans* para confirmar la idea de que pudiera tratarse de la enzima enolasa; la prueba de actividad enzimática y/o la purificación de la enzima serían opciones valiosas..

VIII. CONCLUSIONES.

1. Los métodos de obtención de los extractos crudos de antígenos de antígenos somáticos de *Candida albicans* resultaron satisfactorios de manera cualitativa como cuantitativa en su contenido proteico. Sin embargo, el método vortex fue el empleado para todas las cepas problema de este hongo por presentar una metodología rápida y económica, lo que le permite emplearlo con seguridad para posteriores investigaciones donde se trabaje con proteínas de este origen.
2. Se identificó electroforéticamente la proteína constitutiva de 48 kD en las cepas de *Candida albicans* de origen humano y bovino como la cepa de referencia.
3. Se demostró la presencia de la proteína antigénica de 48 kD en la cepa *Candida albicans* de referencia mediante inmunotransferencia comprobándose su reactividad antigénica con la enzima enolasa de *Sacharomyces cerevisiae*.
4. Se logró la estandarización en la obtención e identificación de la proteína constitutiva y antigénica de 48 kD a partir de las cepas de *Candida albicans* con lo cual permitirá realizar investigaciones enfocadas a desarrollar técnicas de diagnóstico específico para poder detectar de manera pronta la Candidosis sistémica.

ANEXO 1

PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

Medio agar dextrosa Sabouraud (SDA).

Fórmula aproximada por litro.

Mezcla de peptonas.	10.0 g
Dextrosa.	40.0 g
Agar.	15.0 g

Suspender 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 min. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C a 15 lb y 15 minutos por autoclave.

Medio caldo extracto de levadura, peptona y dextrosa (YEPD).

Fórmula aproximada por litro.

Mezcla de peptonas.	20.0 g
Dextrosa.	20.0 g
Extracto de levadura.	10.0 g.

Suspender las cantidades antes mencionadas en un litro de agua destilada. Agitar hasta disolver los elementos del medio, se puede Calentar si es necesario. Esterilizar a 121°C, 15 lb y 15 minutos por autoclave.

Agar de Czapek Dox + Tween 80.

Agar Czapek-Dox.	50.0 g
Agua destilada.	1000 ml
Tween 80 (polisorbato).	10 ml

Suspender 50 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada y mezclar vigorosamente. Adicionar 10 ml de Tween 80 y mezclar. Calentar por un minuto. Esterilizar por autoclave. Enfriar y vaciar a cajas petri.

Agar Corn Meal + Tween 80.

Agar Corn Meal.	17.0 g
Agua destilada.	1000 ml
Tween 80.	10 ml

Adicionar el agar Corn Meal al agua destilada y mezclar. Calentar hasta lograr que se disuelva totalmente el agar. Esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y vertir en cajas petri estériles.

Solución salina fisiológica al 0.85%.

Cloruro de sodio.	0.85 g
Agua destilada.	100 ml

Solución buffer de fosfatos (PBS) 0.1M pH 7.4

Solución A (Fosfato de sodio monobásico 0.2M).

Disolver 27.6 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado en agua destilada, aforando a un litro.

Solución B (Fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0.2M).

Disolver 53.65 g de fosfato de sodio monobásico heptahidratado en agua destilada aforando a un litro.

Mezclar 95 ml de la solución A + 405 ml de la solución B + 500 ml de agua destilada. Se obtiene de esta manera PBS pH 7.4

Reactivo de Bradford.

Azul brillante de Coomassie R-250.	50 mg
Etanol al 95%.	25 ml
Ácido O-fosfórico al 85%.	50 ml
Aforar a 500 ml.	

Buffer lisis.

PMSF (inhibidor de proteasa).	1 mM
β -mercaptoetanol.	10 mM
EDTA.	1 mM
PBS, pH 7.4	1000 ml

Amortiguador Tris (Hidroximetilaminometano)-HCl 1.5 M

Tris-base. 18.75 g

Agua destilada. 80 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N. Llevar a 100 ml de agua destilada y almacenar a 4°C.

Amortiguador Tris-HCl 0.5 M

Tris-base. 6.0 g

Agua destilada. 60 ml

Ajustar a pH 6.8 con HCl 1N. Llevar a 100 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

Acrilamida/BIS (30 % stock).

Acrilamida. 29.2 g

Bis-acrilamida. 0.8 g

Llevar a 100 ml con agua destilada. Filtrar y almacenar a 4°C en oscuridad.

Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio. 0.1 g

Agua destilada. 1.0 ml

SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio (SDS).	10.0 g
Agua destilada.	100 ml

Solución amortiguadora de corrida (Electroforesis) stock

Tris-base.	0.123 M
Glicina.	0.96 M
SDS.	0.017 M
H ₂ O destilada	600 ml

Almacenar a 4° C, calentar a 37 °C antes de usar si ocurre precipitación. Diluir 60 ml de esta solución stock con 240 ml de agua destilada para hacer una electroforesis.

Buffer muestra.

Agua destilada.	4 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.0625 M
Glicerol.	10 %
SDS	0.346 M
2-β-mercaptoetanol.	0.716 M
Azul de bromofenol 0.05%	0.2 ml

Diluir la muestra al menos 1:4 con el buffer muestra y calentar a 95° C durante 5 minutos.

Stock de azul brillante de Coomassie -R250 1%

Azul brillante de Coomassie-R250 2.0 g
Agua destilada. 200 ml
Agitar y filtrar.

Solución de tinción para geles electroforéticos.

Solución stock azul de Coomassie R-250 1% 62.5 ml
Metanol. 250 ml
Ac. acético. 50 ml
Aforar a 500 ml con agua destilada.

Solución para desteñir 1

Metanol. 125 ml
Ac. acético. 25 ml
Aforar con agua destilada a 250 ml.

Solución para desteñir 2

Metanol. 12.5 ml
Ac. acético. 17.5 ml
Aforar con agua destilada a 250 ml.

Sol. salina-Tris 20mM Tris-NaCl (TBS) pH 7.5

Tris-base.	4.84 g
NaCl.	58.48 g

Aforar a pH 7.5 con HCl 1N y aforar a dos litros con agua destilada.

Solución bloqueadora para transferencia.

Leche descremada en polvo.	1.25 g
TBS.	25 ml

Solución amortiguadora de corrida para transferencia.

Tris-base.	0.025 M
Glicina.	0.19 M
Metanol.	20 %

Disolver con agua destilada, ajustar a pH 8.3 y aforar a un litro con agua destilada.

Solución reveladora.

Solución A	
α -cloronaftol.	30.0 mg
Metanol.	10 ml

Solución B	
Solución A .	5 ml
TBS.	25 ml
Peróxido de hidrógeno 30%.	25 μ l

Solución negro de amido.

Negro de amido.	100.0 mg
Metanol.	44 ml
Ac. acético glacial.	1 ml
Agua destilada.	45 ml

Solución estándar de albúmina sérica bovina (ASB) 0.01%

Albúmina sérica bovina.	10.0 mg
PBS, pH 7.4	100 ml

ANEXO 2.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE
BRADFORD (2).

TABLA 1

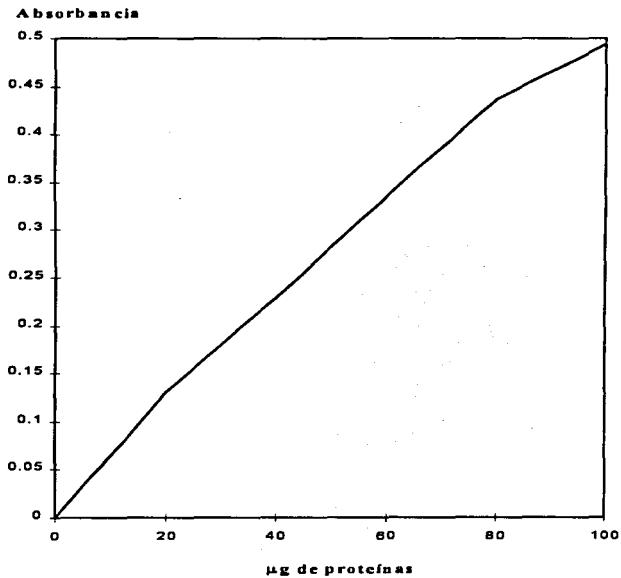
Preparación de la curva de calibración.

Tubo	0	1	2	3	4	5	6	Problemas
Sol. Stand. ASB ml	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	-
agua dest. mL	1	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	-	0.99
React. Bradford ml	5	5	5	5	5	5	5	5
Extrac. crudo. µl	-	-	-	-	-	-	-	10
Absor. Obten. λ =595	0	0.098	0.17	0.332	0.471	0.613	0.735	D

ASB= Albúmina sérica bovina.

D= Diferente para cada muestra.

**GRAFICO DE LA DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL
METODO DE BRADFORD**



Valor de linealidad "r" es 0.9950

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA
IX. BIBLIOGRAFIA.

1. Bonifaz, A. (1991) *Micología Médica Básica*. 1a. Edic. Edit. Mendez-Cervantes. México.
2. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
3. Colowich, S. (1955) *Methods in Enzymology* I. 1st. Edit. Edit. Academic. New York, p. 427-435.
4. De Repentigny, L. and Reiss, E. (1984). Current trends in immunodiagnosis of candidosis and aspergillosis. *Rev. Infect. Dis.* 6:301-312.
5. Deventer Van, A.J.M., Vliet Van H.J.A., Hop, W.C.J. and Goessens, W.H.F. (1994). Diagnostic value of anti-*Candida* enolase antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 32:17-23.
6. Dixon, M. and Webb, E.C. (1979). *Enzymes*. 3rd. Edit. Edtl. Academic press. USA. p. 551-557.
7. Ellis, D.H. (1994). *Clinical micology the human opportunistic mycoses*. De. Pzifer. USA. p. 1-7.

8. Franklyn, K.M., Warmintong, J.R., Ott, A.K. and Ashman, R.B.(1990). An immunodominant antigen of *Candida albicans* shows homology to the enzyme enolase. *Immunol. Cell Biol.* 68:173-178.
9. Greenfield,R.A. (1992). Host defense system interactions with *Candida*. *J. Med. Vet. Myc.* 30:89-104.
10. Herrera, E. (1993). *Elementos de bioquímica*. 1ª Edic. Edit. Interamericana-Mc Graw Hill. México. p. 370.
11. Ito,K., Ishiguro,A., Kanbe, T., Tanaka, K. and Torii, S. (1995). Detection of IgE antibody against *Candida albicans* enolase and its crossreactivity to *Saccharomyces cerevisiae* enolase. *Clin. Exp. All* 25:522-528.
12. Kohno, S. (1996). Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen and β -Glucan antigen in patients with Candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 34:1918-1921.
13. Komshian, S.V., Uwaydah, A.K., Sobel, J.D. and Crane, L.R. (1989). Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient. *Rev. Infec. Dis.* 11:379-390.
14. Kwon-Chung, K.J. (1985). Role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infec. Immun.* 49:571-575.

15. Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E. (1992). *Medical Mycology*. 1st Edic. Edit. Lea and Febinger. USA. p. 280-326.
16. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. London. 227:680-685.
17. Mariat, F y Drouhet, E. (1996). Levaduras de importancia médica y veterinaria. *Dermatol. Rev.Mex.* 40(1): 31-42.
18. Mason, A.B., Brandt, M.E. and Buckley, H.R. (1989). Enolase activity associated with a *Candida albicans* cytoplasmic antigen. *Yeast*. 5:S231-S240.
19. Matthews,R.C., Burnie,J.P. and Tabaqchali,S. (1987). Isolation of immunodominant antigens from sera of patients with systemic candidiasis and characterization of serological response to *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*25:230-237.
20. Matthews, R.C., Wells,C. and Burnie, J.P. (1988). Characterization and cellular localization of the immunodominant 47-Kda antigen of *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 27:227-232.
21. Matthews, R.C. and Burnie, J.P.(1988). Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47 Kda antigen. *J. Clin. Microbiol.* 27:227-232.

22. Matthews, R.C. and Burnie, J. (1992). The role of hsp 90 in fungal infection. *Immunol. today*. 13:345-348.
23. Matthews, R.C. (1994). Pathogenicity determinants of *Candida albicans* potential targets for immunotherapy? *Microbiol.* 140:1505-1511.
24. Matthews, R.C. (1996). Comparative assessment of the detection of *Candida* antigens as a diagnostic tool. *J. Med. Vet. Mycol* 3:1-10.
25. Odds, F.C. (1988). *Candida and Candidosis*. A review and Bibliography. Baillière Tindall, London.
26. Odds, F.C. (1991). Sabouraud('s) agar. *J. Med. Vet. Mycol.* 29:355-359.
27. Odds, F.C. (1994). *Candida albicans*, the life and time of a yeast pathogenic. Presidential address. *J. Med. Vet. Myc.* 32. Suppl. 1:1-8.
28. Pizzo, P.A. (1991). Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassays in patients with cancer and invasive Candidiasis. *N. Eng. J. Med.* 324:1026-1031.
29. Polancheck, I., Antman, A., Barth, Y., Sagi, E. and Giloh, H. (1995). Adherence of *Candida albicans* to epithelial cells: studies using fluorescently labelled yeast and flow cytometry. *Microbiol.* 14:1523-1533.

30. Prasad,R. (1991). *Candida albicans*. 1st. Edit. Edtl. Springer-verlat. Germany. p. 1-20.
31. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. & Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. 1a. Edic. Edit. Wolfe. USA.
32. Salas, T.E. (1995). Obtención de antígenos de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* para el desarrollo de pruebas diagnósticas. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.UNAM.
33. Segundo, Z.C. (1991). Manual teórico práctico de micología médica para la carrera de QFB (prácticas y alternativas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
34. Sundstrom, P. and Aliaga, G.R. (1992). Molecular Cloning of cDNA and analysis of protein secondary structure of *Candida albicans* enolase, an abundant immunodominant glycolytic enzyme. *J. Bacteriol.* 174:6789-6799.
35. Towbin, H. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-435.
36. Zöller, L., Krämer, Y., Kappe, R. and Sonntag, H.G. (1991) Enzyme immunoassays for invasive *Candida* infections:Reactivity of somatic antigens of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 29:1860-1867.

37. Zweibel, S.M., Buckley H.R., Lagen, M.T. and Strockbine, N.A. (1984). Identification and molecular weight characterization of antigens from *Candida albicans* that are recognized by human serum. *Infect. Immun.* 43:715-721.