

60 Subclonación de los principales epítipes antigénicos de la proteína recombinante P27 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Unidad de Biología Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas.

Juan Méndez, Edwin García, Mónica Guerrero, Astrid Bedoya, Margarita Correa, Mauricio Corredor, Ángela Restrepo, Juan Mcewen¹

INTRODUCCIÓN

La paracoccidioidomycosis (PCM) es una micosis sistémica frecuente en Latinoamérica, su diagnóstico se realiza mediante la visualización microscópica del hongo, su aislamiento en cultivos y pruebas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos, utilizando extractos crudos del hongo (1). La P27 es una de las principales proteínas antigénicas del *P. Brasiliensis*; por lo tanto, la subclonación del gen en fragmentos permitiría determinar cuáles son los epítipes más antigénicos, que podrían ser usados en una prueba diagnóstica específica y sensible.

OBJETIVO

Subclonar el gen de la p27 en fragmentos y determinar los epítipes más antigénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La P27 inicialmente clonada en el plásmido BSK II (2) se cortó con las enzimas EcoRI y Xho I, fue introducida en el plásmido Thio C cortado con las enzimas EcoRI y Sal I (esquizomero de Xho I) se ligó toda la noche a 4°C.

Los fragmentos de 100, 200, 300, 500, 600 y 800bp, se amplificaron por PCR con iniciadores que contienen sitio de restricción; fueron cortados con EcoRI y Pst I e igualmente el plásmido Thio C donde se introdujeron. Se ligó toda la noche a 4°C y se transformó en *E. coli* Top 10.

El plásmido por inducción con Isopropyl β-D thiogalactopyranoside (IPTG) 1mM produce una proteína de fusión (tioredoxina) de alta afinidad por el níquel, a esta proteína están unidos nuestros polipéptidos de interés. La purificación se realizó por cromatografía de filtración en gel (sephadex G100) y luego se terminó de purificar por cromatografía de afinidad a través de una resina con Níquel (NINTA)

RESULTADOS

Las pruebas serológicas con extractos crudos son variables e inespecíficas y de riesgosa manipulación (3); el empleo de proteínas recombinantes permite obtener grandes cantidades de un antígeno idéntico. En la actualidad, por inmunotransferencia, se han observado reacciones específicas contra el gen completo y contra un fragmento de 300bp. Se espera determinar cuáles son los fragmentos de mayor antigenicidad y de menor reacción cruzada con otros agentes causantes de micosis.

BIBLIOGRAFÍA

- BRUMMER E, CASTAÑEDA E, RESTREPO A. *Paracoccidioidomycosis: An update. Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 89-117.
- ORTIZ BL, GARCÍA AM, RESTREPO A, MCEWEN JG. Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diag Lab Immunol* 1996; 3: 239-241.
- MCEWEN JG, ORTIZ BL, GARCÍA AM, FLÓREZ AM, BOTERO S, RESTREPO A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 1996; 4: 1-8.

¹ Unidad de Biología Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas y Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia BANTU01@Hotmail.com

61 Identificación de mutaciones en pacientes diagnosticados con MELAS y/o MERRF

Carlos Burgos², Victoria Parra¹, William Cornejo², Gabriel Bedoya³, Andrés Ruiz⁴

PALABRAS CLAVE

CITOPATIAS
MTDNA
HETEROPLASMA
MELAS
MERRF

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Además de los 3.000 millones de pares de bases del DNA nuclear, cada célula contiene múltiples copias de un genoma de 16.569 pb contenido en la mitocondria, denominado DNA mitocondrial (mtDNA). Esta organela es de vital importancia, ya que en ella se produce más del 80% de la energía celular a través de la cadena respiratoria y LA fosforilación oxidativa; cualquier disfunción en estos procesos puede generar una citopatía mitocondrial (1), como: encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y apoplejía (MELAS) y epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF) (2,3). Se ha reportado que las mutaciones más frecuentes en MELAS y MERRF se deben a transiciones en los tRNA de leucina y lisina, respectivamente, por lo que se vería afectada toda la síntesis de proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, involucradas en la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, y por ende la producción de ATP en la célula. Dadas las características propias de la mitocondria, como son la heteroplasma, la segregación mitótica, etc., la presentación clínica de estas citopatías es muy heterogénea lo que lleva a dificultades en el diagnóstico clínico.

Con este trabajo se pretende identificar las mutaciones en mtDNA responsables de cuadros clínicos característicos de los síndromes de MELAS y MERRF en nuestra población, y así confirmar el diagnóstico clínico en el mtDNA.

METODOLOGÍA

Utilizando DNA extraído a partir de sangre periférica y de biopsia muscular de pacientes que cumplan los criterios diagnósticos, se tipificará por medio de secuenciamiento acoplado a PCR los fragmentos del mtDNA en los cuales se han reportado las mutaciones más frecuentes para MELAS y MERRF. Las reacciones de secuencia se resolverán en un Analizador Genético ABI 310 y se analizarán con el programa DNA Navigator.

RESULTADOS ESPERADOS

Se espera identificar el tipo de mutación causante de MELAS y MERRF en nuestra población y además establecer si las mutaciones detectadas han sido o no reportadas anteriormente.

Proyecto CODI: CPT-0006

BIBLIOGRAFÍA

- LEONARD JV, SCHAPIRA AHV. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial defects. *Lancet* 2000; 355: 299-304.
- SZUHAI K, OUWELAND JM, KIRKS RW, LEMAITRE M, TRUFFERT JC, JAUSEN GM, et al. Simultaneous A8344G heteroplasmy and mitochondrial DNA copy number quantification in syndrome MERRF by a multiplex molecular Beacon based real-time fluorescence PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29 (3): E13.
- YASUKAWA T, SUZUKI T, SUZUKI T, UEDA T, OHTA S, WANATABE K. Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAsLeu with pathogenic mutations of myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *J Biol Chem* 2000; 275: 4.251-4.257

.....
¹ Estudiante de Maestría, Posgrado en Ciencias Básicas Biomédicas
² Profesor, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia
³ Profesor, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia
⁴ Profesor, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; Profesor Universidad de Londres