



**" IDENTIFICACION DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD  
CASEINOLITICA EN UN EXTRACTO CELULAR DE  
NOCARDIA BRASILIENSIS . "**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

**PRESENTA :**

**D.C.B. LUZ ISABEL PÉREZ RIVERA**

**MONTERREY, N.L., NOVIEMBRE 1992**

TM

26658

FM

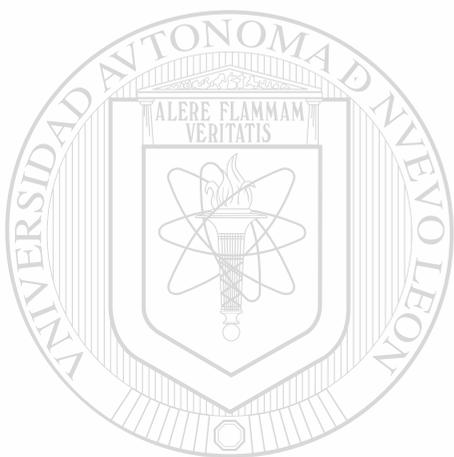
1992

P4

!



1020071211



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

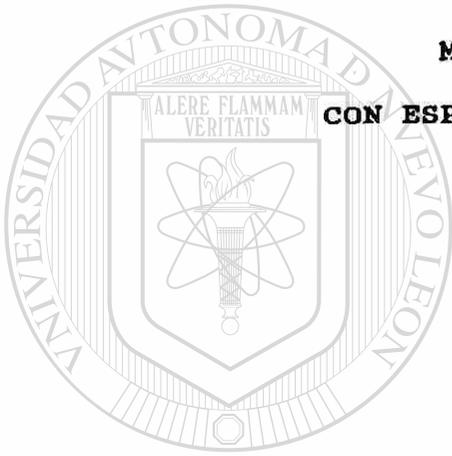
**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**



**PRESENTA**  
**UANL**

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

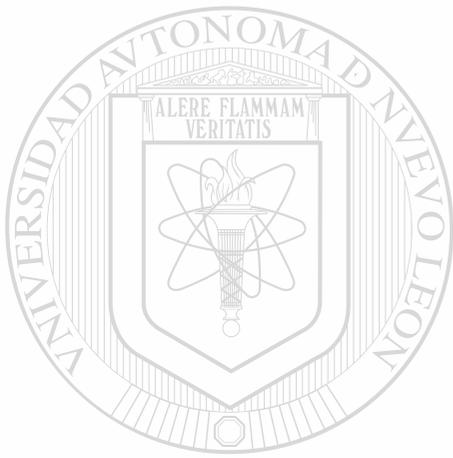
**LUZ ISABEL PEREZ RIVERA**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

®

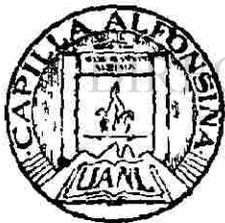
**MONTERREY, N.L., NOVIEMBRE 1992**

TM  
26658  
FM  
1992  
P4



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



COLECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

**FONDO TESIS**

24063

**"IDENTIFICACION DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD CASEINOLITICA EN UN  
EXTRACTO CELULAR DE Nocardia brasiliensis."**



**Presentada por: LUZ ISABEL PEREZ RIVERA**

**UANL**

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**



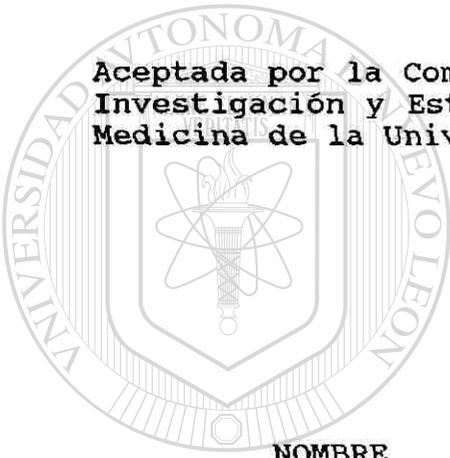
**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

**Este trabajo fue realizado en el Depto. de Inmunología  
de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección del  
Dr. Mario César Salinas Carmona.**

**"IDENTIFICACION DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD CASEINOLITICA EN UN**

**EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis"**

Aceptada por la Comisión de Tesis de la Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



UANL

NOMBRE

FIRMA

Presidente: Dra. Ma. del Socorro Flores de C.

Secretario: Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza

1o. Vocal : Dr. Mario César Salinas Carmona

2o. Vocal : Dra. Herminia Martínez

3o. Vocal : M.C. Ma. Alicia Suárez

**"IDENTIFICACION DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD CASEINOLITICA EN UN  
EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis."**



Este trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona.

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ASESOR DE MAESTRIA

---

Dr. Mario César Salinas Carmona

## DEDICATORIA

A DIOS quien me permitio cumplir una meta mas en mi vida

A mis PADRES a quienes respeto y quiero mucho

A mis HERMANOS: quienes siempre me apoyaron para seguir adelante

A mi ESPOSO: a quien quiero mucho y del cual he recibido todo el apoyo necesario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de Tesis en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., y agradezco toda la confianza que depositó en mí para desarrollar este trabajo de Investigación, lo cual sin su excelente asesoría no hubiera sido posible.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza a quien agradezco infinitamente su confianza y ayuda.

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda por sus consejos durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Lucio Vera Cabrera y a la Q.C.B. Alicia Yañez de I. por compartir sus conocimientos y experiencias y brindarme su apoyo y amistad en todo momento.

A la M.C. Q.F.B. Anna Velia Vázquez Marmolejo por la revisión del manuscrito y por su infinita amistad.

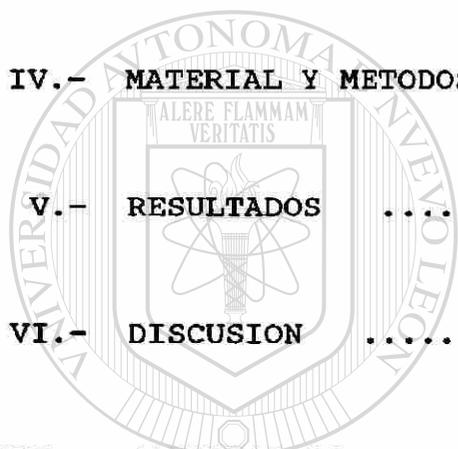
A la Biol. Silvia M. Casillas Quintana por brindarme su ayuda durante la impresión del escrito.

A todo el personal del Departamento de Inmunología a quienes quiero y estimo mucho.

# I N D I C E

Página

I.- RESUMEN .....	1
II.- INTRODUCCION .....	3
III.- OBJETIVO .....	14
IV.- MATERIAL Y METODOS .....	15
V.- RESULTADOS .....	43
VI.- DISCUSION .....	52
VII.- CONCLUSIONES .....	57
<hr/>	
VIII.- BIBLIOGRAFIA .....	59
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS	
IX.- ANEXO A.- ABREVIATURAS .....	66
X.- ANEXO B.- FIGURAS .....	68
XI.- ANEXO C.- TABLAS .....	85



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

## RESUMEN

A partir de un cultivo de Nocardia brasiliensis, el cual creció en un medio de cultivo por una semana a 37°C, se recuperó el filtrado de cultivo y la masa bacteriana, a partir del cual se obtuvo el extracto celular. El patrón electroforético de las proteínas del extracto celular y del filtrado fue determinado mediante electroforesis en gel SDS-PAGE, mientras que para la identificación de las proteasas realizamos la técnica de zimograma.

Logramos identificar, tanto en el extracto celular como en el filtrado de cultivo de N. brasiliensis, de 3 a 2 bandas proteicas con actividad caseinolítica, sin embargo no se logró detectar actividad enzimática en N. asteroides.

El peso molecular aproximado de las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis, medido por electroforesis en gel 12%, fue :51.5, 42 y 40.5 kDa mientras que por filtración en gel fue de 35.5 kDa.

La actividad enzimática de las proteasas del extracto celular, cuantificada por la técnica de Mc Laughlin y Faubert, fue mayor cuando se utilizó como amortiguador Tris-HCL con CaCl<sub>2</sub> 10 mM a un pH de 7.4.

Utilizando diferentes inhibidores enzimáticos , las proteasas identificadas, fueron clasificadas como enzimas que dependen de: grupos serina, grupos SH, iones divalentes (tales como  $\text{Ca}^{++}$ ) y metales pesados (tales como  $\text{Zn}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$ ).

La actividad caseinolítica de las proteasas liberadas por un cultivo de N. brasiliensis, localizado en el centro de una placa de agar con caseína, se vio afectada por los mismos inhibidores enzimáticos, lo que nos sugiere que podrían tratarse de las mismas enzimas.

Al parecer, las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis son inmunogénicas para el hombre, ya que fueron reconocidas por pacientes infectadas con N. brasiliensis; mientras que los pacientes con tuberculosis y enfermedad de Hansen no las reconocieron.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## INTRODUCCION

Nocardia brasiliensis pertenece al género Nocardia, el cual está muy relacionado a otros actinomicetos que contienen abundantes ácidos micólicos, tales como: el género Microbacterium, Corynebacterium, Gordona, Rhodococcus y Tsukamurella (32,34).

N. brasiliensis es un actinomiceto gram positivo, no móvil, filamentoso, intracelular facultativo, parcialmente ácido resistente; el cual crece en medios de cultivos convencionales como el Agar Sabouraud. Después de 2 a 3 semanas en cultivo a temperaturas de 30° C, la N. brasiliensis forma colonias blanco amarillentas, apiladas, rugosas y plegadas.

En ocasiones las colonias de N. brasiliensis pueden presentar un desarrollo excesivo blanco pulverulento, que indica fragmentación de los filamentos, los cuales al observarse microscópicamente originan formas bacilares o cocoidales, semejantes a las mycobacterias o corynebacterias. El diámetro de los filamentos es menos de 1  $\mu$ .

Las Nocardias son microorganismos aeróbicos que se encuentran principalmente en el suelo de regiones tropicales y sub-tropicales y existen primordialmente como organismos saprófitos.

Hay numerosas especies saprofíticas de *Nocardia* encontradas comunmente en el suelo. Se conocen hasta hoy tres especies de *Nocardia* causantes de infecciones en el hombre, tales especies son: *N. brasiliensis*, *N. asteroides* y *N. otitidiscaviarum* (*N. caviae*) (23,35). Estas especies dan origen a infecciones en humanos de tipo localizado; las cuales se presentan como lesiones granulomatosas, supurativas de carácter destructivo en tejidos; que drenan pus hacia el exterior y que contienen granos en el sitio de la lesión. A este padecimiento se le denomina micetoma actinomicótico, siendo *N. brasiliensis* el principal agente causal en México (21). Las infecciones sistémicas o generalizadas producidas por *Nocardia*, en las cuales se observa supuración, pero no se detectan granos, se llama nocardiosis, siendo *N. asteroides* el agente causal más común (17).

El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica generalmente localizada en miembros inferiores, que afecta la piel, tejido subcutáneo, fascia, músculo y ocasionalmente hueso y órganos adyacentes (51).

El cuadro clínico característico del micetoma está constituido por un aumento de volumen del área afectada, de consistencia leñosa, que con el tiempo desarrolla nódulos, abscesos y fístulas que drenan un exudado serosanguinolento en el que se pueden identificar granos; éstos son acúmulos miceliales o microcolonias del agente etiológico, cuyo tamaño y color son característicos del agente causal (18,48).

El micetoma generalmente afecta la piel y/o los miembros inferiores, pero puede localizarse en cualquier región del cuerpo (22). Se han observado casos de micetoma en el cuello, la espalda el abdomen, la cabeza y la región torácica (39).

Se conoce que el actinomicetoma es una enfermedad de evolución lenta la cual puede variar de un mes hasta años, pero en algunos casos su desarrollo es de 1 a 2 años; afecta hueso y se extiende a otros órganos vecinos; la extensión a pulmón y a la médula espinal se ha visto en las formas torácicas, pero puede existir diseminación por vía linfática a ganglios regionales y en raras ocasiones por vía hematógena (51).

El estudio anatomopatológico del área afectada muestra un granuloma con polimorfonucleares, células plasmáticas, linfocitos e histiocitos. Incluso en estudios experimentales en roedores, hechos por Conde y cols. (15), observaron la presencia de depósitos de inmunoglobulinas y complemento (C<sub>3</sub>), 15 días después de la inoculación con *N. brasiliensis*.

La mayoría de los investigadores mencionan que el micetoma es una enfermedad de los trabajadores del campo.

La distribución por sexo es mayor en el hombre, en una proporción 4:1; se han reportado micetomas en niños (50), aunque

es más común en grupos entre la segunda y cuarta década de la vida.

El micetoma, ya sea actinomicótico (bacterias) o eumicótico (hongos), tiene una amplia distribución en el mundo, presentándose más frecuentemente en la zona localizada entre el Trópico de Cáncer y Trópico de Capricornio.

En América se encuentra distribuido principalmente en los países de Centroamérica, México, Venezuela, Colombia y Brasil. En Africa se presenta más frecuentemente en los países como Sudán, Senegal y Somalia (25,31). En Asia, la India es el país en el cual se han presentado un mayor número de casos (24,38). En los Estados Unidos esta enfermedad es poco frecuente (1,27).

En México el 98% de casos de micetoma es causado por Actinomicetos de los cuales el 86% es causado por N.brasiliensis seguido por: Actinomadura madurae, Streptomyces somaliensis, N. asteroides, Actinomadura pelletierii y Nocardia otitiscaviarum. El otro 2 % es causado por Eumicetos tales como Madurella mycetomatis y Madurella grisae; y otras especies tales como Acremonium sp y Fusarium sp son raros como agentes causales (47).

En algunas ocasiones los micetomas son muy pequeños (minimicetomas) y en otras, pueden adquirir formas clínicas con

formación de tejido de granulación que le da un aspecto neoplásico a la lesión.

El diagnóstico clínico diferencial de los micetomas, debe hacerse con la tuberculosis cutánea, esporotricosis, coccidioidomycosis, botriomicosis y neoplasias. La etiología de la lesión se establece con estudios de laboratorio como el examen micológico directo con hidróxido de potasio o solución salina, lo cual nos permite identificar los "granos" característicos del micetoma. En ocasiones es posible llegar al diagnóstico de la especie de acuerdo a sus características tintoriales y morfología microscópica (12). Además de esto, luego se procede a cultivar la secreción del área afectada en medio Sabouraud y/o Micosel y en el caso de N. brasiliensis el cultivo se incuba a 30° C por 2 a 3 semanas, observándose colonias blanco amarillentas, con aspecto de "palomitas de maíz", las cuales son bacterias gram positivas y Ziehl Neelsen positivas. Existen en el laboratorio pruebas bioquímicas que ayudan a diferenciar a N. brasiliensis de las otras especies; en el caso de N. brasiliensis, a diferencia de las otras especies de Nocardia, hidroliza la caseína, urea, gelatina y tirosina.

Las pruebas serológicas serían de gran ayuda para el diagnóstico rápido de micetoma, tanto el eumicetoma como el actinomicetoma y también posiblemente para evaluar la respuesta al tratamiento. Los primeros estudios sobre el posible uso de la

serología fueron pruebas de fijación de complemento, para establecer la relación entre *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Streptomyces* (14).

Recientemente Salinas y cols. (45) identificaron 3 antígenos inmunodominantes en *N. brasiliensis*, los cuales fueron reconocidos por sueros de pacientes con micetoma; pero no, por sueros de pacientes con tuberculosis o enfermedad de Hansen. Utilizando dichos antígenos, Salinas y cols.(46), lograron estandarizar una técnica de ELISA mediante la cual, se logró diferenciar entre pacientes con tuberculosis y enfermedad de Hansen de aquellos pacientes infectados por *Nocardia*.

Se han utilizado varios medicamentos en el tratamiento del micetoma actinomicótico tales como: sulfonamidas (trimetoprim-sulfametoxazol), tetraciclinas (minociclina), estreptomycin, rifampicina y amikacina. Recientemente Welsh y cols.(52), reportaron una buena respuesta terapéutica con amikacina en combinación con trimetoprim y sulfametoxazol, en 15 pacientes con micetoma actinomicótico, en los cuales se alcanzó una remisión completa. Si la lesión es pequeña se recomienda su extirpación quirúrgica y continuar con el tratamiento médico.

Los mecanismos de resistencia del huésped a infecciones causada por *N. brasiliensis* no son muy conocidos (11). En la resistencia del huésped a infecciones microbianas participan

mecanismos de resistencia de tipo inespecíficos los cuales incluyen barreras mecánicas, tales como la integridad de la piel y mucosas; de tipo químico entre las cuales se encuentran la lisozima y los ácidos grasos; y celulares como los macrófagos y los polimorfonucleares. La mayor parte de ellos funcionan igualmente en contra de la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, una vez que el microorganismo ha logrado pasar estas barreras, los mecanismos de resistencia de tipo específicos como la Inmunidad celular y humoral, interactúan específicamente para lograr la eliminación del microorganismo. Tanto anticuerpos circulantes como la presencia de hipersensibilidad tardía a antígenos de N. brasiliensis, han sido demostrado en individuos infectados con Nocardia (5,40,41). No obstante, su papel en la resistencia del huésped a infecciones con Nocardia no está claramente establecido. Se ha intentado transferir inmunidad humoral a ratones usando sueros inmunes pero no se ha conseguido; así mismo los intentos por demostrar anticuerpos protectores no han dado resultados definitivos (43); aunque existen datos que sugieren que en algunas cepas de Nocardia, el anticuerpo puede ser importante en la resistencia del huésped (6,9).

La inmunidad mediada por células, probablemente juega un papel importante en la respuesta del huésped a cepas de Nocardia (8). Estudios realizados por Folb y cols.(19) en los que ellos infectaron ratones atímicos (cepas ICR nu/nu y C3H/eBnu/nu) con N. asteroides y N. brasiliensis; observaron que estos

murieron más rápidamente que aquellos ratones que sí tenían timo; lo que sugiere que los linfocitos que maduran en el timo, ejercen un papel fundamental en la resistencia a infecciones por *Nocardia*.

Se conoce que *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* y *N. brasiliensis* pueden crecer como parásitos intracelulares (IC) facultativos dentro de los macrófagos (7). La mejor defensa del huésped en contra de los parásitos intracelulares es llevada a cabo por la Inmunidad Celular.

De hecho, la enfermedad causada por *N. asteroides* (nocardiosis) frecuentemente ocurre en personas en las cuales su inmunidad celular se encuentra afectada. Estudios hechos por Beaman y cols. (7), sugieren que los macrófagos juegan un papel relevante en la defensa del huésped contra cepas virulentas de *N. asteroides*.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Los mecanismos de patogenicidad de las nocardias no se conocen completamente; sin embargo, está bien establecido que *Nocardia asteroide* presenta cambios morfológicos de tipo estructural y ultraestructural, en diferentes fases de crecimiento, evaluados por técnicas de microscopía electrónica (3,4). Estos cambios tienen efectos dramáticos en la virulencia del organismo; pero pocos estudios han sido hechos para relacionar esos cambios a los efectos en la interacción huésped parásito y patogenicidad.

Corynebacterium, Mycobacterium, Rhodococcus y Nocardia tienen paredes celulares complejas compuestas de lípidos, péptidos y polisacáridos. Algunos de esos componentes tales como las nobactinas, que son compuestos lipídicos asociados, responsables del transporte de hierro al interior del organismo; o los sulfolípidos, que poseen capacidad para inhibir la fusión del fagosoma-lisosoma, durante la ingestión de las células de nocardia por los macrófagos (10,26). La superóxido dismutasa, catalasa y algunos componentes tales como el factor cordón (trehalosa-6,6-dimicolato) el cual es tóxico en el ratón (29,30), se han visto implicados como factores contribuyentes a la patogenicidad de los organismos (28), y se piensa que juegan un papel en la persistencia de la bacteria en la célula huésped (2,26).

Otro posible factor de virulencia en N. brasiliensis sería la presencia de proteasas o enzimas catalíticas, las cuales facilitarían la infiltración de este microorganismo a través de los tejidos, ocasionando destrucción del tejido cutáneo, subcutáneo y músculo; en ocasiones puede llegar al hueso. El o los mecanismos de patogenicidad de Nocardia no son conocidos; el estudio de enzimas de N. brasiliensis tiene importancia por su posible implicación en el mecanismo de lesión tisular.

Zlotnik y cols. en 1984 (53), reportaron la purificación de

una proteasa en un filtrado de cultivo de N. brasiliensis cuyo peso molecular varía entre 25,000 y 35,000 daltones y al parecer fue afectada por inhibidores de enzimas que dependen de grupos sulfhidrilo (iodacetamida) y por el inhibidor de cisteína. La(s) función(es) de esta enzima son desconocidas, no obstante, la presencia de proteasas extracelulares en un organismo patogénico sugiere un papel en el proceso diseminativo.

Más recientemente Tsuboi y Yamaguchi, en 1989 (49), detectaron la presencia de proteasas extracelulares tanto en el filtrado de cultivo de N. brasiliensis como de N. asteroides; e investigaron la correlación entre la producción de esta enzima y la patogenicidad de la Nocardia. Ellos reportaron que tales enzimas sólo mostraban actividad enzimática a pH alcalino y neutro. Estas proteasas fueron inhibidas por fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y por quimostatina; sin embargo, observaron que el EDTA sólo mostró una inhibición parcial.

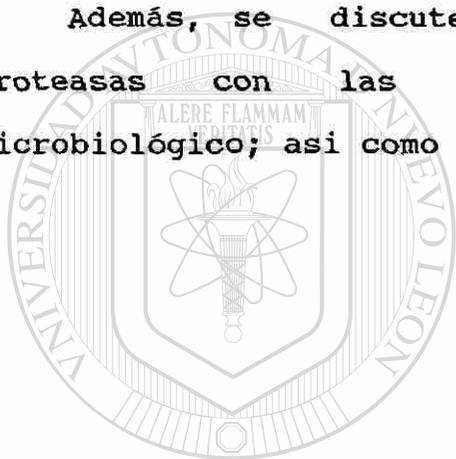
Sin embargo, para confirmar el papel patogénico de dichas proteasas, es necesario hacer otras investigaciones.

Se conoce que N. brasiliensis produce una proteasa extracelular responsable de la digestión de la caseína en un cultivo de agar microbiológico, pero la(s) enzima(s) responsables nunca han sido identificadas. Este hallazgo se considera crucial para diferenciar N. brasiliensis de las otras especies (20).

La descripción de componentes proteolíticos de *Nocardia* podría ser de ayuda para estudios taxonómicos.

En este trabajo describimos la identificación de proteasas tanto en el filtrado, como en el extracto celular de *N. brasiliensis* y su clasificación catalítica mediante el uso de inhibidores enzimáticos.

Además, se discuten las diferencias que tienen estas proteasas con las excretadas en el medio de agar-microbiológico; así como la inmunogenicidad de tales proteasas.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**O B J E T I V O S**

1.- Investigar la presencia de proteasas con actividad caseinolítica en el extracto celular y en el filtrado de cultivo de N. brasiliensis.

2.- Determinar algunas propiedades fisicoquímicas de las proteasas, tales como: peso molecular, pH óptimo y dependencia de iones

3.- Clasificar la clase catalítica a la que pertenece(n) la(s) proteasa(s) identificada(s) mediante el uso de inhibidores enzimáticos.

4.- Comparar la actividad proteolítica del extracto celular con la actividad proteolítica en el agar microbiológico con caseína

5.- Investigar la inmunogenicidad de las proteasas en el suero de personas infectadas con N. brasiliensis.

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

### I.- OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO.

#### A.- CEPA DE N. brasiliensis.

La cepa de Nocardia brasiliensis usada en este estudio fue aislada de un micetoma de un paciente que acudió a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario Dr. "José E. González." Su identificación fue realizada en cultivos microbiológicos convencionales y luego confirmada por el Dr. L. Ajello (CDC Atlanta, G,A) y la cepa es referida como N. brasiliensis HUJEG-1 (44).

Los subcultivos fueron crecidos en agar Sabouraud (Merck), pero la producción de masa bacteriana fue obtenida en medio de cultivo infusión cerebro-corazón (BHI, Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, MI).

#### B.- OBTENCION DE SUSPENSIONES UNICELULARES DE

#### N. brasiliensis.

De las colonias de N. brasiliensis, crecidas en medio agar Sabouraud, se tomaron algunos fragmentos pequeños y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 125 ml (PYREX); los cuales contenían un volumen de 30 ml de medio de cultivo (BHI). Estos cultivos se incubaron a 37°C por 48 h, en baño de agua en agitación (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific).

Después, éstas fueron centrifugados a 1,500 X g por 10 minutos utilizando una centrífuga (BECKMAN TJ-6).

Las bacterias obtenidas fueron lavadas 2 veces en solución salina estéril al 0.85%. La masa bacteriana fue disgregada con un agitador de vidrio estéril y se dejaron sedimentar aquellas colonias que no fueron fragmentadas; con el sobrenadante obtenido se inocularon otra serie de matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían medio de cultivo BHI (30 ml). Se incubaron a 37° C por 48 h en agitación, después las bacterias se lavaron 3 veces con sol. salina al 0.85%, centrifugándolas a 1,500 X g por 7 min. La masa bacteriana obtenida fue triturada utilizando un homogenizador (Eberbach) por un tiempo de 1.5 min con descansos de 30 seg. El homogeneizado obtenido fue centrifugado a 100 X g por 5 min (45). Una muestra del sobrenadante obtenido se mezcló con hidróxido de potasio y se observó al microscopio para comprobar que realmente teníamos una suspensión unicelular. La suspensión

---

unicelular se almacenó en un frasco de vidrio estéril.

#### C.- Obtención del Extracto celular de N. brasiliensis.

Una vez que obtuvimos la suspensión unicelular de N. brasiliensis, inoculamos 40 matraces Erlenmeyer de 1 y 2 l los cuales contenían 160 y 170 ml de medio de cultivo BHI respectivamente. Los cultivos se incubaron a 37° C por 1 semana sin agitación. Al término de la semana, las bacterias crecieron en forma de una capa superficial sobre el medio de cultivo. Las bacterias

fueron recolectadas en frascos de 500 ml (nalgene BECKMAN) y se lavaron con solución salina estéril tibia (40°C) y se centrifugaron a 1,500 X g (Centrífuga BECKMAN TJ-6) por 7 min. Este proceso se repitió 4 veces. La masa bacteriana fue desengrasada utilizando una mezcla de etanol:éter en una proporción 1:1,1:2 y 1:3, esto se hizo en repetidas ocasiones. Posteriormente las bacterias fueron desecadas a temperatura ambiente (45).

Las bacterias secas se trituraron con polvo de vidrio (PYREX) en un mortero de porcelana por hora y media. Después se agregó un amortiguador tris-HCl 0.01 M con acetato de magnesio 0.01 M y se dejó agitando magnéticamente (Stir Plate SYBRON/THERMOLYNE NUOVA II) a 4° C por 12 h.

Para eliminar aquellas células que no fueron fragmentadas y restos miceliales, se procedió a centrifugar la mezcla a 1,500 X g por 30 min (BECKMAN TJ-6); el precipitado fue eliminado mientras que el sobrenadante fue ultracentrifugado a 144,000 X g por 3 h (BECKMAN 28-70M ).

Finalmente se recuperó el sobrenadante el cual se dializó contra agua destilada por 12 h. El dializado se colocó en viales de vidrio en alícuotas de 15 ml para posteriormente liofilizarse (liofilizadora FREEZE MOBILE VIRTIS); aparte, se separó una pequeña muestra (1ml)

para determinar proteínas por el método de Lowry (36). Para identificar la composición del extracto, se procedió a realizar electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en gradiente 8.75-18% T con SDS (SIGMA) y 2-ME (SIGMA).

## II.- ANALISIS DEL EXTRACTO CELULAR DE Nocardia brasiliensis.

### A.- ELECTROFORESIS EN GEL SDS-PAGE EN GRADIENTE 8.75%-18% EN CONDICIONES DESNATURIZANTES.

Para analizar los componentes del extracto celular de N. brasiliensis; se utilizó un sistema discontinuo de Laemmli (33) con un gel de empaquetamiento al 5% T y un gel de corrimiento en gradiente de 8.75-18% T, los cuales se prepararon de la siguiente manera:

#### 1.- PREPARACION DEL GEL DE CORRIMIENTO 8.75% - 18% T:

Concentración % T	8.75	18
Acrilamida-Bisacrilamida	2.04 ml	4.197 ml
(30% T, 2.7% C)		
Buffer Tris-HCL 3M pH 8.8	1.32 ml	1.32 ml
SDS 10%	0.069 ml	0.069 ml
Agua tri-destilada	3.060 ml	0.645 ml
Glicerina 50%	0.480 ml	0.740 ml
Persulfato de amonio 5%	0.025 ml	0.025 ml
TEMED	0.003 ml	0.003 ml
	-----	-----
	7.0 ml	7.0 ml

Se utilizó un formador de gradiente (BIO-RAD Laboratories) el cual está formado por una cámara reservorio y una cámara mezcladora, ambas cámaras tienen las mismas dimensiones. En la cámara reservorio se colocó la solución de acrilamida de menor porcentaje (8.75% T) mientras que la cámara mezcladora contiene la solución de acrilamida de mayor porcentaje (18% T). Ambas cámaras se unen por un canal que está en la parte inferior, el cual se abre en el momento que se empieza a vaciar la solución de acrilamida al cassette, utilizando una bomba peristáltica (LKB 2132 Microperpex); la cual se conecta a la cámara mezcladora a través de una manguera (Tygon, 1/8" ID, 3ft.) . El formador de gradiente se coloca sobre una placa agitadora (Stirrer plate, Thermolyne Nuova II). El cassette que se utilizó para hacer el gel en gradiente está formado de 2 placas de vidrio de 18 X 14 cm entre las cuales se colocan 3 espaciadores de teflón de 0.75 mm (BIO-RAD Lab.) uno en cada lado del cassette, dejando la parte superior libre para vaciar la mezcla de acrilamida-bis-acrilamida. Una vez que se vacía la solución de acrilamida-bisacrilamida al cassette, se agrega agua tri-destilada quedando ésta en la parte superior del gel. El gel es polimerizado en un tiempo aproximado de 45 a 60 min. Posteriormente se retiró el agua, que habíamos agregado en la parte superior del gel, utilizando un papel filtro.

## 2.- PREPARACION DEL GEL DE EMPAQUETAMIENTO:

El gel concentrador al 5% T se preparó de la siguiente manera:

### GEL DE EMPAQUETAMIENTO 5% T

Acrilamida-bisacrilamida -----	0.1665	ml
(30% T, 2.7% C)		
Buffer Tris-HCl IM pH 6.8 -----	0.125	ml
Agua tri-destilada -----	0.660	ml
SDS al 10% -----	0.01	ml
Persulfato de amonio (5%) -----	0.014	ml
TEMED -----	0.001	ml
	<hr/>	
	0.810	ml

Antes de vaciar al cassette la solución de acrilamida-bis-acrilamida 5% T, la humedad de la parte superior del gel, se eliminó introduciendo papel filtro (BIO-RAD). Posteriormente se colocó un peine de teflón (BIO-RAD 0.75 mm 10 carriles) y luego se vació la solución de acrilamida-bisacrilamida 5% T. Después de la polimerización se quitó el peine y posteriormente se lavó el gel con agua tri-destilada.

### 3.- ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE 8.75%-18% T DEL EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis.

El amortiguador de corrimiento que se utilizó fue tris 125 mM, glicina 192 mM con SDS al 0.1%, el cual se colocó en la parte superior e inferior de la cámara de corrimiento. Como fuente de poder se utilizó LKB 110/220 v. Antes de aplicar la muestra se realizó un pre-corrimiento electroforético por 25 min a 50 v. En el caso del extracto celular de N. brasiliensis se utilizó una concentración de proteínas de 25  $\mu\text{g}$  /0.8 cm mezclado con amortiguador de muestra (SDS al 10%, 2-ME al 10% v/v, sacarosa al 50% en amortiguador tris-HCl 125 mM, pH 6.8 con azul de bromofenol como indicador del frente de iones). Antes de aplicarse la muestra en el carril, se calentó a ebullición durante 2 minutos; luego se enfrió y se aplicó al carril 1.5  $\mu\text{l}$  (30 $\mu\text{g}$ ) utilizando una

---

jeringa Hamilton (1-50  $\mu\text{l}$ ); al mismo tiempo se aplicaron marcadores de peso molecular (SDS-6H y Dalton Mark VII-

L SIGMA Co.), los cuales se prepararon de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial que lo fabrica.

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 v hasta que el frente del colorante llegó a donde inicia el gel de corrimiento y en ese momento se aumentó el voltaje a 150 v, hasta que el colorante indicador del frente de iones llegó al extremo inferior del gel.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó con nitrato de plata o con azul de Coomassie de la siguiente manera:

#### TINCION CON NITRATO DE PLATA

##### A. PROCEDIMIENTO

- 1.- El gel se sumergió en solución fijadora (metanol 50% y ácido acético 12%) por 20 minutos.
- 2.- Luego se hicieron 3 lavados de 10 minutos con una solución de lavado etanol 10% y ácido acético 5% para eliminar el SDS.
- 3.- El gel se colocó en solución oxidante (Dicromato de potasio 0.0034 M y Ac. nítrico 0.00322 M por un tiempo de 5 min.
- 4.- Después el oxidante se eliminó mediante 3 lavados de 10 min con agua tri-distilada.
- 5.- El gel se sumergió en solución de nitrato de plata 0.012 M por un tiempo de 5 min en luz intensa y 25 min en luz normal.
- 6.- Por último las bandas proteicas se revelaron con una solución de carbonato de sodio 0.28 M y formol al 0.05%.

#### TINCION CON AZUL COOMASSIE

##### A.- PROCEDIMIENTO

- 1.- El gel fue sumergido en una solución de Coomassie

blue R-250 al 0.1% en solución fijadora ( metanol 40% y ácido acético 10%) por un tiempo de 30 min.

2.- Para desteñir el gel se utilizó una solución metanol 40% y ácido acético al 10%, para remover el colorante (usualmente de 1 a 3 h)

### III.-DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL EXTRACTO

#### CELULAR DE N. brasiliensis.

##### A.- ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN GEL (ZIMOGRAMA)

Para investigar la presencia de proteasas en el extracto celular de N. brasiliensis, nosotros adaptamos la técnica de zimograma utilizada por Pérez Montfort y cols. (42), modificada de la siguiente manera:

**GEL-SUBSTRATO:** Es un gel de poliacrilamida al 7.5% en amortiguador tris-HCl 0.075 M pH 7.4 y NaCl 0.15 M con 0.57 mg/ml de caseína.

**GEL 12 %:** Consta de un gel lineal sin gradiente, sin SDS y sin 2-ME en el cual se separan las proteínas del extracto celular de N. brasiliensis a 150 v por 3 h. Ambos geles se colocaron a manera de sandwich y se incubaron a 37° C por 1 hora y media y luego se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron con metanol/ácido acético.

**1.- PREPARACION DEL GEL AL 12% SIN SDS Y SIN 2-MERCAPTOETANOL:**

**GEL DE CORRIMIENTO.**

Concentración %T	12%
Acrilamida-Bisacrilamida ----- (30% T y 2.7% C)	6.00 ml
Buffer tris-HCl 1.5 M pH 8.8 -----	1.87 ml
Agua tri-destilada -----	7.05 ml
Persulfato de amonio 10% -----	0.0075 ml
TEMED -----	0.0075 ml
	<hr/>
	12.0 ml

**GEL DE EMPAQUETAMIENTO AL 4%:**

Acrilamida-Bisacrilamida ----- (30 % T, 2.5 % C)	1.3 ml
Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 -----	2.5 ml
Agua tri-destilada -----	6.2 ml
Persulfato de amonio 10% -----	0.005 ml
TEMED -----	0.010 ml
	<hr/>
TOTAL	10 ml

Para determinar la actividad enzimática del extracto celular de N. brasiliensis se utilizó una concentración proteica de 60  $\mu\text{g}$  /carril 0.8 cm, en amortiguador de muestra 2X (sacarosa 50% en amortiguador tris-HCl 0.125 M pH 6.8 y 0.0005% azul de bromofenol sin SDS y sin 2-ME). La electroforesis fue llevada a cabo a un voltaje constante 150 v por 2 horas y media o hasta que el frente del colorante alcanzó la orilla del gel. Se usó como amortiguador de corrimiento tris-OH 0.025 M, 0.12 M glicina a pH 8.3 sin SDS.

Se utilizaron marcadores de peso molecular conocido (SIGMA Chemical Co. MW-ND 500 Kit)  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) y BSA (66 kDa).

Una vez terminada la electroforesis, el gel que contiene las proteínas del extracto celular de

---

N. brasiliensis, se sumergió en amortiguador tris-HCl 0.1 M con  $\text{CaCl}_2$  10 mM pH 7.4 a temperatura ambiente por

15 min con el fin de equilibrar el pH.

## **2. PREPARACION DEL GEL-SUBSTRATO PARA EL ENSAYO DE**

### **ZIMOGRAMA:**

Se preparó un gel al 7.5% T de acrilamida-bisacrilamida que contiene caseína como substrato, el cual se preparó de la siguiente manera:

**Concentracion %T****7.5%**

Acrilamida-bisacrilamida ----- (30% T, 2.5% C)	3	ml
Buffer tris-HCL 0.075 M, NaCl 0.15 M -- pH 7.4	3	ml
Agua tri-destilada -----	5.83	ml
Caseína 0.57 mg/ml (Merck) -----	6.84	mg
Persulfato de amonio 10% -----	0.06	ml
TEMED -----	0.0006	ml
<b>TOTAL</b>	<b>12.0</b>	<b>ml</b>

Después de preparada la solución de acrilamida-bisacrilamida al 7.5% T con caseína se vació a un cassette (2 placas de vidrio 18 X 24 cm) y se dejó polimerizar por un tiempo de 30 min.

para continuar con la técnica de zimograma, el gel en el cual estan las proteínas del extracto celular de N. brasiliensis, se retiró del amortiguador tris-HCl en el que estaba sumergido y se empalmó sobre el gel-substrato a manera de sandwich y ambos geles se incubaron en cámara húmeda por 3 h a 37° C. Después de la incubación ambos geles se separaron y se tiñeron con azul de Coomassie.

**B.- ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN PAPEL.****1.- TRANSFERENCIA DE LAS PROTEASAS DEL GEL AL PAPEL DE NITROCELULOSA.**

Se hizo un gel al 12% lineal sin SDS y sin 2-ME en condiciones no desnaturalizantes tal como se mencionó en la sección anterior. Una vez separadas las proteínas del extracto celular de *N. brasiliensis* (60 µg/0.8cm), éstas fueron transferidas al papel de nitrocelulosa de 0.45 µ de porosidad (BIO-RAD Lab). La transferencia se llevó a cabo en un amortiguador tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3 con metanol al 20%.

Las proteínas del gel se transfirieron al papel de nitrocelulosa mediante la aplicación de un voltaje constante de 240 v (aproximadamente 0.74 amperios) durante 90 min. Se utilizó un sistema de enfriamiento (LKB 209 multitemp) para evitar el

calentamiento y la evaporación del amortiguador. Al término de la transferencia, el gel se tiñó con nitrato de plata o azul de Coomassie para determinar la eficiencia de la transferencia.

El papel de nitrocelulosa, el cual contiene las proteínas del extracto celular, fue colocado en un amortiguador tris-HCl 0.1M con CaCl<sub>2</sub> pH 7.4 a temperatura ambiente por 15 min. Una vez terminada la incubación el papel fue colocado sobre el gel-caseína cuya preparación ya fue mencionada. Tanto el gel-

substrato y el papel fueron incubados por 120 min. a 37°C.

Una vez terminada la incubación, se separaron tanto el gel como el papel y ambos fueron teñidos con azul de Coomassie por 30 min a temperatura ambiente; posteriormente fueron desteñidos con ácido acético al 10% y metanol al 40%.

**C.- ENSAYO DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN TUBO (TECNICA Mc Laughlin y Faubert).**

Nosotros utilizamos la técnica descrita por Mc Laughlin y Faubert (37), con algunas modificaciones:

Se utilizaron 100  $\mu$ l de caseína o azocaseína 1% (Merck) y se mezclaron con 150  $\mu$ l del extracto celular de N. brasiliensis conteniendo 20  $\mu$ g/ $\mu$ l (3.0 mg total),

ambos disueltos en amortiguador tris-HCl 0.1M y CaCl<sub>2</sub> 0.1M pH 7.4. Como control positivo de actividad

enzimática se utilizó tripsina (Difco laboratories, Detroit,MI). Se incubaron a 37° C por un tiempo de

3 h y posteriormente se añadieron 250  $\mu$ l de TCA al 10% y se incubó por 10 min. Esto fue con el fin de precipitar aquellas proteínas que no fueron hidrolizadas enzimáticamente; después se centrifugó (Serofuge II) a 550 X g por 15 min y del sobrenadante se tomaron 100  $\mu$ l, los cuales se mezclaron con 900  $\mu$ l de NaOH 0.5 N . Los péptidos solubles en TCA, fueron determinados

- espectrofotométricamente (ZEISS PMQ3), como una medida indirecta de actividad enzimática a 280 nm (caseína) o 420 nm (azocaseína).

#### IV.- EFECTO DEL pH Y COMPOSICION DEL BUFFER EN LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis.

Para saber cuál es el efecto del pH y la composición del amortiguador en la actividad enzimática encontrada en el extracto celular de N. brasiliensis, realizamos los siguientes experimentos: Primero determinamos el pH óptimo en el cual hay una mayor actividad enzimática del extracto celular mediante la técnica de Mc Laughlin y Faubert (ensayo en tubo).

El sustrato (caseína) utilizado, así como el control (tripsina) y el extracto celular de N. brasiliensis, fueron

disueltos en los amortiguadores siguientes: citrato pH 3, acetato pH 5, fosfato-salina pH 7, tris-HCl pH 7.4 con CaCl<sub>2</sub>

0.1 M y carbonato pH 9.

La técnica consistió en mezclar 100 µl de caseína al 1% y 150 µl del extracto celular de N. brasiliensis (3.0 mg) o tripsina como control. Posteriormente se incubaron por 3 h a 37°C, luego se añadieron 250 µl de TCA 10% y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 550 X g por 15 min y se recolectaron 100 µl del sobrenadante, los cuales se pasaron a un tubo que contenía

900  $\mu$ l de NaOH 0.5 N, éste se leyó a una longitud de onda de 280 nm.

**V.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES ENZIMATICOS EN LAS PROTEASAS DE N. brasiliensis.**

Para clasificar la actividad catalítica de las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis, se determinó la actividad enzimática después de que dicho extracto estuvo en contacto con los diferentes inhibidores enzimáticos. La actividad enzimática fue medida tanto en zimograma (ensayo en gel), como por la técnica en tubo de Mc Laughlin y Faubert.

**A.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA MEDIDA MEDIANTE:**

**1.-LA TECNICA EN GEL (ZIMOGRAMA).(42)**

Para llevar a cabo estos experimentos, primero se hizo una electroforesis de las proteínas de extracto

celular de N.brasiliensis en un gel al 12 % en condiciones no desnaturizantes, sin SDS y sin 2-ME

tal como se describió en la sección anterior.

Después del corrimiento electroforético, el gel fue sumergido en un amortiguador tris-HCl pH 7.4 con  $\text{CaCl}_2$  10 mM por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a cortar el gel en tiras longitudinales quedando un carril por tira. De manera individual, las tiras fueron sumergidas en los siguientes

inhibidores enzimáticos (SIGMA):1) Inhibidor de proteasas-serina:fenil-metil sulfonil fluoruro (PMSF)  $1 \times 10^{-3}$  M; 2) Inhibidor de grupos sulfhidrilo: 2-mercaptoetanol (2-ME)  $7 \times 10^{-2}$  M, iodacetamida  $0.2 \times 10^{-2}$  M y 2 para-hidroxi mercuri benzoico (PHMB)  $10 \times 10^{-5}$  M; 3) Agente quelante-metal pesados (Zn): 2,2 dipirydyl  $2 \times 10^{-3}$  M y 2,9-dimetil-1-10 fenantrolina (neocuproine)  $1 \times 10^{-3}$  M; 4) Agente quelantes de iones calcio: etilendiamina tetracetato (EDTA)  $3 \times 10^{-3}$  M. Se incubaron las tiras con los diferentes inhibidores por un tiempo de 30 min. y luego fueron lavadas con amortiguador tris-HCl 0.1 M pH 7.4 sin  $\text{CaCl}_2$ . Posteriormente las tiras fueron empalmadas sobre el gel-substrato (caseína) colocando un portaobjeto sobre ambos geles para hacer más presión. Todo se llevó a cabo en una cámara húmeda a una temperatura de  $37^\circ \text{C}$  por 90 min. Después de

terminada la incubación, ambos geles se separaron y fueron teñidos con azul de Coomassie por un tiempo de 30 minutos y luego fueron desteñidos con ácido acético 10% y metanol 40% por 90 min.

## 2.- ENSAYO EN TUBO (Mc Laughlin y Faubert).

Se mezclaron en tubos Eppendorf, de manera individual, los inhibidores enzimáticos y el extracto celular de N brasiliensis quedando en un volumen final  $150 \mu\text{l}$  a una concentración proteica de  $600 \mu\text{g}$  y se incubaron a  $37^\circ \text{C}$  por 60 min. Después se le agregó  $100 \mu\text{l}$  de

caseína 1% (substrato) la cual estaba disuelta en amortiguador tris-HCl 0.1M pH 7.4 con  $\text{CaCl}_2$ , e inmediatamente se incubó por 3 h a  $37^\circ \text{C}$ . Una vez terminada la incubación se agregó TCA 10% y se dejó reposar por 10 minutos; finalmente se procedió a centrifugar a  $550 \times g$  por 15 min y del sobrenadante obtenido se tomaron  $100 \mu\text{l}$  y se mezclaron con  $900 \mu\text{l}$  de NaOH 0.5 N y se midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (ZEISS PM Q3).

El control positivo de actividad enzimática fue la tripsina sobre caseína a una concentración de 20 mg/ml (SIGMA) y como control negativo fue la papaína (SIGMA). Los resultados fueron expresados como % de actividad enzimática residual.

## **VI.- DETERMINACION DE PESO MOLECULAR DE LAS PROTEASAS DEL**

### **EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis.**

Para determinar el peso molecular de las proteínas que presentaron actividad caseinolítica en el extracto celular de N. brasiliensis, se utilizaron la cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-100) y la electroforesis en gel 12% (midiendo el Rf).

#### **A.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL (SEPHADEX G-100).**

Se utilizó una columna de cromatografía de 22 cm de longitud  $\times$  300 mm de diámetro con llave de teflón

(Wheaton Scientific 265134); la cual fue empaquetada con sephadex G-100 (Pharmacia) en amortiguador salina-fosfato (PBS) pH 7.4 0.1 M. Se reguló el flujo 0.5 ml por minuto y se recolectaron fracciones de 2 ml. Se determinó el volumen vacío ( $V_0$ ) a la columna de cromatografía, haciendo pasar primero el dextrán azul cuyo peso molecular es de  $2 \times 10^6$  (SIGMA MWGF-200 Kit D4772). El  $V_0$  de la columna está basado en el volumen del eluyente requerido para eluir una molécula grande tal como el dextrán azul. Posteriormente se pasaron los siguientes marcadores proteicos de peso molecular (MWGF-200 Kit Sigma):  $\beta$ -amilasa PM 200,000 Da (A8781) 4 mg/ml; BSA PM 66,000 Da (A8531) 10 mg/ml; anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos PM 29,000 Da (C7025) 3 mg/ml y citocromo C de corazón de caballo PM 12,400 Da (C7150) 10 mg/ml. Estos marcadores fueron eluidos con

PBS pH 7.4 y a las fracciones obtenidas se les determinó la absorbancia a 280 nm. El volumen de elución ( $V_e$ ) de los diferentes marcadores, se determinó midiendo la absorbancia del eluido recolectado, desde que se aplicó la muestra, hasta que la absorbancia a 280 nm del eluyente fue mayor.

Se realizó una curva tipo en la que se graficó  $V_e/V_0$  (abscisa) y peso molecular (ordenadas) en papel semi-logarítmico.

Para determinar el peso molecular de las proteínas con

actividad caseinolítica del extracto celular de N. brasiliensis, se pasó a través de la columna, 10 mg/0.5ml del extracto celular de N. brasiliensis y se recolectaron fracciones de 1 ml. A las fracciones obtenidas se les determinó la absorbancia a 280 nm; posteriormente fueron liofilizadas y finalmente se les determinó la actividad enzimática utilizando la técnica de zimograma. El  $V_e/V_o$  de las fracciones; en las que se encontró actividad enzimática, se extrapoló en la curva estandard y de esa manera se determinó el peso molecular de las proteasas.

#### B.- ELECTROFORESIS EN GEL 12% SIN SDS Y NI 2-ME.

A las proteínas del extracto celular de N. brasiliensis que se separaron electroforéticamente, se les determinó su movilidad relativa ( $R_f$ ), la cual resulta de la distancia que migra la proteína sobre la distancia que migra el colorante azul de bromofenol, en la parte inferior del gel de corrimiento.

Para tener una idea del peso molecular de las proteínas presentes en el extracto celular de N. brasiliensis, se extrapolaron los diferentes  $R_f$  de las proteínas del extracto celular, en una gráfica realizada con los  $R_f$  de marcadores proteicos (MW-ND-500 Kit SIGMA Chémical Company) conocidos, tales como:

$\alpha$ -lactoalbúmina PM 14,200 Da (L-4385); anhidrasa carbónica PM 29,000 Da (C-5024); albúmina de huevo PM 45,000 Da (A-8529) y BSA PM 66,000 Da (A-8654).

#### VII.- OBTENCION DEL FILTRADO DE CULTIVO DE N. brasiliensis.

Se recolectaron 6.4 l de medio de cultivo (BHI) después de 7 días de incubación a 37° C con N. brasiliensis. Este filtrado de cultivo fue concentrado a un volumen final de 170 ml, utilizando una unidad de ultrafiltración de fibra de vidrio (C2 M1787 Travenol, Illinois) y luego se dializó contra agua destilada por 7 días a 4° C; y el dializado fue liofilizado en alícuotas de 15 ml/vial.

#### A.- ANALISIS DEL FILTRADO DE CULTIVO DE N. brasiliensis:

##### 1.- ELECTROFORESIS EN GEL SDS-PAGE EN GRADIENTE 8.75%-

##### 18% T EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

Para analizar las diferentes bandas proteicas del filtrado de cultivo de N. brasiliensis, realizamos una electroforesis en gel SDS-PAGE en gradiente de 8.75-18% T en condiciones desnaturalizantes. Se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli con un gel de empaquetamiento de 5% T y un gel de corrimiento en gradiente 8.75-18% T. La concentración proteica del filtrado fue de 25  $\mu$ g por carril, y fue mezclada en un amortiguador de muestra que contenía: SDS 10%, 2-ME

10% y sacarosa 50%; lo anterior se disolvió en amortiguador tris-HCl 125 mM pH 6.8 con azul de bromofenol como indicador. La mezcla se calentó a 60°C por 2 min y posteriormente se aplicó al carril. La electroforesis se llevó a cabo un voltaje constante 80 v en el gel concentrador y a 150 v en el gel de corrimiento. Una vez terminada la electroforesis el gel fue teñido con nitrato de plata o azul de Coomassie.

Antes de determinar la actividad enzimática del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*, el cual había sido previamente concentrado, dializado y liofilizado; eliminamos el exceso de color debido al medio de cultivo, el cual interfería en la demostración de los halos de lisis en el gel-substrato. Entonces decidimos pasar a través de una columna de sephadex G-50 (Pharmacia), 0.5 ml del filtrado de cultivo que contenía

---

20 mg/ml de proteínas. Primeramente se calibró la columna con amortiguador PBS 0.1 M pH 7.4, a un flujo

de 20 gotas/min y luego se le determinó el  $V_0$  de la columna utilizando dextrán azul (PM 200 kDa) y posteriormente se determinó el  $V_e$  de los marcadores de peso molecular conocido tales como: ASB (PM 66 kDa), anhidrasa carbónica (PM 29 kDa) y citocromo C (PM 12.4 kDa).

Después se procedió a pasar la muestra del filtrado de

cultivo de N. brasiliensis (1.5 ml) y posteriormente se recolectaron fracciones de 0.5 ml a las cuales se les determinó la absorbancia a 280 nm y aquellas fracciones que absorbieron a esa longitud, fueron liofilizadas para después determinar actividad enzimática por la técnica en gel (Zimograma).

**2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN GEL  
(ZIMOGRAMA) DEL FILTRADO DE CULTIVO DE  
N. brasiliensis.**

De todas las fracciones del filtrado de cultivo que fueron eluidas de la columna cromatográfica de filtración en gel (sephadex G-50), solamente 17 absorbieron a 280 nm. Antes de determinarles la actividad enzimática por la técnica de zimograma (en gel), decidimos juntar las siguientes fracciones: 1-

3 (tubo 1), 4-9 (tubo 2) y 10-17 (tubo 3). A tales tubos se les realizó primeramente una electroforesis en PAGE

al 12% en condiciones no desnaturalizantes sin SDS y sin 2-ME. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 v en el gel concentrador y de 150 v en el gel de corrimiento por 2 h y media. Una vez terminada la electroforesis, el gel fue sumergido en un amortiguador tris-HCl 0.1 M con CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.4 por 15 min a temperatura ambiente. Luego el gel se colocó encima del gel-substrato (caseína) y se incubó

en cámara húmeda a 37° C por 3 h. Después de terminada la incubación ambos geles se separaron y fueron teñidos con azul de Coomassie.

La demostración de halos claros en el gel-substrato es una muestra indicativa de actividad enzimática en el filtrado de cultivo de N. brasiliensis.

**VIII.-RELACION ENTRE LAS PROTEASAS DEL EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis, CON LAS PROTEASAS QUE SON LIBERADAS AL MEDIO DE CULTIVO EN AGAR MICROBIOLOGICO-CASEINA.**

**A.- PRODUCCION DE PROTEASAS CASEINOLITICAS EN UN CULTIVO DE N. brasiliensis EN MEDIO DE AGAR MICROBIOLOGICO-CASEINA.**

Como prueba microbiológica para diferenciar entre especies de *Nocardia* se utiliza la digestión de la caseína en cultivos microbiológicos.

Nosotros utilizamos placas de Petri estériles, a las cuales se les agregó 3 ml de una mezcla V/V de leche descremada (Sveltes) al 10% y agar microbiológico 3% (Merck). Tanto la leche descremada como el agar fueron previamente esterilizados por calor por 15 minutos a 15 libras de presión de manera individual antes de vaciar a las placas.

Posteriormente fueron inoculadas en condiciones estériles con la cepa N. brasiliensis HUJEG-1 en el

centro de la placa. Después de 8 días de incubación a 37° C, fue evidente la lisis de caseína alrededor de las colonias bacterianas.

**B.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES ENZIMATICOS EN LAS PROTEASAS LIBERADAS POR N. brasiliensis EN CULTIVOS DE AGAR MICROBIOLOGICO-CASEINA.**

Para conocer el efecto de los inhibidores enzimáticos sobre las proteasas de N. brasiliensis en cultivos de agar microbiológico-caseína, se inoculó con los diferentes inhibidores enzimáticos de manera individual, a cultivos de N. brasiliensis, los cuales se sembraron en dichas placas. Para realizar estos experimentos utilizamos 10 placas estériles que contenían agar microbiológico 3% y leche descremada 10%, las cuales

habían sido inoculadas 5 días antes con la cepa HUJEG-1 de N. brasiliensis.

Los inhibidores enzimáticos utilizados fueron: PMSF  $1 \times 10^{-3}$  M; EDTA  $3 \times 10^{-3}$  M; 2 Mercaptoetanol  $7 \times 10^{-2}$  M; iodacetamida  $2 \times 10^{-2}$  M; PHMB  $10 \times 10^{-5}$  M; 2,2 dipiridyl  $2 \times 10^{-3}$  M y 2,9 dimetil-1-10 fenantrolina (Neocuproine)  $1 \times 10^{-3}$  M. Todos los inhibidores fueron esterilizados por filtración (millipore 0.45  $\mu$ ) antes de su uso y de manera individual fueron dispersados alrededor de las colonias bacterianas, una cantidad de 20  $\mu$ l

aproximadamente. Las placas fueron examinadas diariamente.

**IX.- DETERMINACION DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEASAS DEL EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis.**

**A.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA REVELADAS CON SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA, TUBERCULOSIS Y ENFERMEDAD DE HANSEN.**

Las proteínas del extracto celular de N. brasiliensis, separadas en un gel al 12% sin SDS y sin 2-ME, fueron transferidas al papel de nitrocelulosa tal como se mencionó en la sección III B (13). Una vez terminada la transferencia, el papel de nitrocelulosa fue sumergido en una solución bloqueadora de gelatina de pescado (Higure Liquid gelatin, Norland products, New

Bronswick, N.J.) al 3% en PBS pH 7.4 0.1 M, durante 1 h a 37°C. Posteriormente el papel se lavó con una

solución de gelatina 0.3% en PBS y tween 20 (1:1000), se hicieron 3 lavados cada uno de 10 min. Después el papel se cortó en tirillas de 0.4 cm y éstas se colocaron en un portatiras (BIO-RAD Lab). Las tirillas se incubaron por 18 h a 4°C con los sueros de los pacientes diluidos 1:25 en solución diluyente (gelatina 1.5% en PBS y tween 20 1:1000). Después de la incubación, fueron lavadas 6 veces con solución de lavado y posteriormente

se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el conjugado (anti-inmunoglobulina humana IgG) unida a peroxidasa (A 8400 SIGMA) diluida 1:500 en solución diluyente. Posteriormente las tirillas fueron lavadas para quitar el exceso de conjugado y luego se incubaron con el substrato (Tetraclorhidrato de 3,3 diaminobencidina ) 20 mg en 40 ml de PBS 0.1 M pH 7.5, a la cual se le agregó peróxido de hidrógeno (40  $\mu$ l de la solución 30% por cada 20 ml de solución de diaminobencidina).

Después de unos minutos, la reacción se detuvo con HCl 1N. Las tirillas se lavaron con agua tri-distilada y fueron secadas entre 2 hojas de papel filtro para su posterior análisis.

#### **B.- MUESTRAS DE SUEROS ANALIZADOS EN IET.**

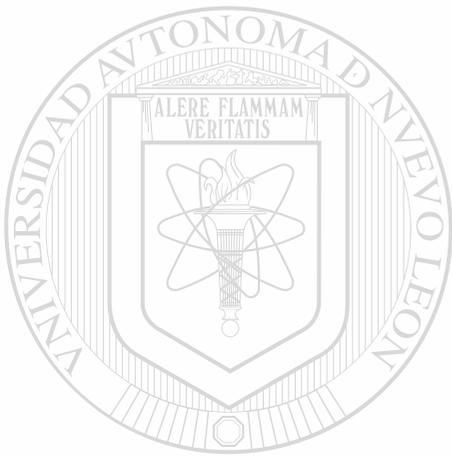
Se analizaron 20 sueros de pacientes infectados por N. brasiliensis los cuales fueron gentilmente donados por Dr. O. Welsh del Depto. de Dermatología de Hospital Universitario "Dr. J.E. González."

De los 20 sueros analizados, 10 de ellos eran de pacientes que mostraban la enfermedad activa (micetoma) y los otros 10 estaban curados.

Para observar la reacción cruzada con Mycobacterium, se analizaron 5 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar y 5 con enfermedad de Hansen. Como control

negativo se utilizaron 4 sueros de personas aparentemente sanas y como control positivo un suero de un conejo inmunizado con extracto celular de N. brasiliensis.

Todas las muestras una vez que fueron recolectadas, fueron guardadas a  $-20^{\circ}$  C.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## R E S U L T A D O S

### I.- EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis.

#### A.- Obtención del Extracto celular y del filtrado de cultivo de N. brasiliensis.

Mediante la inoculación de suspensiones celulares de N. brasiliensis obtuvimos 6.4 l de filtrado de cultivo y 130 g de masa bacteriana húmeda, de la cual se extrajeron 250 mg de extracto celular; la concentración de proteínas del extracto celular fue de 1.3 mg/ml medido por el método de Lowry.

### II.- ANALISIS DEL EXTRACTO CELULAR DE Nocardia brasiliensis.

#### A.- Electroforesis en gel PAGE en gradiente 18%-8.75% T en condiciones desnaturalizantes con SDS Y 2-ME.

En el carril B de la figura 1 se muestra el análisis electroforético del extracto celular de

N. brasiliensis, en el cual se observan más de 30 bandas proteicas cuyos pesos moleculares fluctúan desde 10,000 a 100,000 daltones. Mientras que en el carril A se muestran los marcadores de peso molecular. Este gel fue teñido con nitrato de plata para lo cual se requirió una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{cm}$  en geles de 0.75 mm de grosor y 10 cm de largo. Sin embargo, cuando el gel se tiñó con azul de Coomassie, la concentración proteica fue de 200  $\mu\text{g}/\text{cm}$  o sea 8 veces más la cantidad

de proteínas para alcanzar la sensibilidad del nitrato de plata.

**B.- Electroforesis en gel PAGE lineal 12% en condiciones no desnaturalizantes.**

En la figura 2 ,en el carril A se muestra el patrón electroforético del extracto celular de N. brasiliensis, en la que se observa aproximadamente 11 bandas proteicas, cuyos pesos moleculares están en el rango de 10,000 a 70,000 daltones. En el carril B se encuentran los marcadores de peso molecular que corresponden a:BSA (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2kDa). Este gel fue teñido con azul de Coomassie.

**III.-ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL EXTRACTO CELULAR DE**

**N. brasiliensis.**

**A.- TECNICA EN GEL (ZIMOGRAMA).**

Mediante la técnica de Zimograma pudimos identificar tres bandas proteicas presentes en el extracto celular de N. brasiliensis, mismas que presentáron actividad enzimática sobre el gel-substrato (caseína) a los 30 min de incubación; la cual permaneció hasta las 24 h, observándose como áreas claras que no fueron teñidas por el colorante. En la figura 3 , corresponde al gel-substrato después de la incubación con las proteínas

del extracto celular . En el carril 1 se muestra el control negativo de actividad enzimática, mientras que el carril 2 se muestran 3 áreas no teñidas con el colorante azul de Coomassie en el gel-caseína; esto nos indica la presencia de 3 bandas con actividad caseinolítica en el extracto celular de N. brasiliensis (60 µg/carril).

#### B.- TECNICA EN PAPEL DE NITROCELULOSA.

En el carril 2 de la figura 4, se muestran 2 áreas claras en el gel-caseína, el cual fue teñido con azul de Coomassie; lo que nos indica que 2 de las 3 proteasas caseinolíticas presentes en el extracto celular de N. brasiliensis, se pudieron transferir a papel de nitrocelulosa y conservar su actividad enzimática. En el carril 2 de la figura 5, se

observan las proteínas caseinolíticas del extracto celular de N. brasiliensis. Las bandas que presentaron actividad enzimática quedaron dentro de los espacios claros, los cuales no fueron teñidos con el colorante.

#### C.- ENSAYO EN TUBO (MC LAUGHLIN Y FAUBERT).

La actividad enzimática del extracto celular de N. brasiliensis utilizando como substrato caseína fue expresada en unidades de absorbancia tal como se muestra en la figura 6, en donde la actividad enzimática del extracto celular de N. brasiliensis, a diferentes

concentraciones, fue mayor que la actividad enzimática de la tripsina (control positivo); como control negativo se utilizó la papaína y el extracto celular de N.asteroides. En la figura 7 se muestra la actividad enzimática del extracto celular de N. brasiliensis, comparándola con la tripsina (control positivo) y la papaína (control negativo). En este caso el substrato utilizado fue la azocaseína.

**IV.- EL EFECTO DEL pH Y LA COMPOSICION DE LOS AMORTIGUADORES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL EXTRACTO CELULAR DE Nocardia brasiliensis.**

Las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis, mostraron una mayor actividad enzimática cuando se utilizó como amortiguador Tris-HCl a un pH de 7.4 tal como se observa en la tabla 1. Al parecer, la presencia de CaCl<sub>2</sub> y de las sales Tris-HCl son necesarias para que exista una óptima actividad caseinolítica, tal como se muestra en la tabla 2.

**V.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES ENZIMATICOS SOBRE LAS PROTEASAS DEL EXTRACTO CELULAR DE Nocardia brasiliensis.**

El efecto de los inhibidores enzimáticos sobre la actividad caseinolítica de las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis, medida mediante el ensayo en gel (zimograma),

se muestran en la figura 8 . Las 3 proteasas encontradas en el extracto celular, tal como se observa en el carril A, fueron inhibidas drásticamente por PHMB y PMSF (carril B); sin embargo, el EDTA disminuyó ligeramente la actividad enzimática de las 3 proteasas (carril C); mientras que 2,9-dimethyl-1-10 fenantrolina (neocuproine) afectó la primera y la tercera proteasa; quedando la segunda igual que el control positivo (carril D) y finalmente la iodacetamida y 2-ME inhibieron solamente la 3a proteasa (carril E).

Los resultados de la inhibición enzimática cuantificada por medio de la técnica en tubo (Mc Laughlin y Faubert) se muestra en la tabla 3; en donde se demostró que el PMSF inhibió el 31.3% de la actividad enzimática de las proteasas; mientras que en el EDTA, fue de un 40% aproximadamente; El 2-ME inhibió un 27%; y el PHMB, solo un 20 %. El resto de los inhibidores utilizados no presentaron

ningún efecto sobre las proteasas de dicho extracto.

**VI.- DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR APROXIMADO DE LAS PROTEASAS DEL EXTRACTO CELULAR DE Nocardia brasiliensis POR FILTRACION EN GEL (SEPHADEX G-100) Y ELECTROFORESIS PAGE 12%.**

**A.- FILTRACION EN GEL (SEPHADEX G-100)**

De las fracciones recolectadas (1ml) de la columna de

sephadex G-100, a la cual se le aplicó una muestra de extracto celular de N. brasiliensis, se les determinó la absorbancia a 280 nm y los resultados obtenidos fueron graficados (figura 9). Todas las muestras eluidas, decidimos juntarlas y obtuvimos 7 tubos con mezclas de 3 fracciones en cada uno. De todos los tubos solamente en el tubo 4 (1ml) se demostró actividad enzimática mediante la técnica en gel (zimograma). El  $V_e/V_o$  obtenido, tanto de los marcadores de peso molecular como del tubo 4, se muestra en la tabla 4; y estos resultados fueron graficados en papel semilogarítmico, obteniéndose una curva tipo (figura 10) sobre la cual se extrapoló el  $V_e/V_o$  del tubo 4. El peso molecular obtenido fue de aproximadamente de 35.5 kDa.

---

#### B.- ELECTROFORESIS EN GEL 12% LINEAL.

En la tabla 5 se muestran los  $R_f$  de los marcadores de peso molecular; y de las proteínas del extracto celular de N. brasiliensis, responsables de la hidrólisis de la caseína. Estos valores fueron graficados en papel semi-log obteniendo una curva tipo (figura 11), sobre la cual se extrapoló los  $R_f$  de las proteasas identificadas; determinando, de manera aproximada, sus pesos moleculares, los cuales correspondieron a: 51.5, 42 y 40.5 kDa.

**VII.- FILTRADO DE CULTIVO DE Nocardia brasiliensis.****A.- ANALISIS DEL FILTRADO DE CULTIVO DE N. brasiliensis EN GEL PAGE EN GRADIENTE 8.75-18% EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.**

En el carril B y D de la figura 12, se muestran los patrones electroforéticos del extracto celular y del filtrado de cultivo de N. brasiliensis; mientras que en el carril C y E se muestra el extracto celular y el filtrado de cultivo de N. asteroides; los cuales fueron analizados en SDS-PAGE en gradiente cuyo gel fue teñido con azul de Coomassie. En el carril A se muestran los marcadores de peso molecular conocido.

**B.- ANALISIS DEL FILTRADO DE CULTIVO EN GEL 12% LINEAL EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES.**

En la figura 13 en el carril A se muestra el patrón electroforético del filtrado de cultivo de N. brasiliensis; en el que se observaron bandas proteicas cuyos pesos moleculares están en el rango de 10,000 a 100,000 daltones. En el carril E se muestran los marcadores de peso molecular para condiciones no desnaturalizantes, tales como:  $\alpha$ -lactoalbúmina (PM 14.2kda), anhidrasa carbónica (PM 29 kDa), albúmina de huevo (PM 45 kDa) y BSA (PM 66 kDa).

**C.- FILTRACION EN GEL (SEPHADEX G-50) DEL FILTRADO DE CULTIVO DE N. brasiliensis.**

En la (figura 14), se muestra el perfil de elución de las fracciones recolectadas de la columna de Sephadex G-50; cuando una muestra de filtrado de cultivo de N. brasiliensis se pasó a través de ella, tal como se muestra en la gráfica, 17 fracciones presentaron una mayor absorbancia, éstas fueron seleccionadas para determinar la actividad enzimática por la técnica en gel (zimograma). Los resultados mostraron que 2 de las 3 proteasas encontradas en el extracto celular (carril C) estaban presentes en el filtrado de cultivo de N. brasiliensis (carril A) mientras que en el filtrado de cultivo de N. asteroides (carril B) resultó negativo tal como se observa en la figura 15.

**VIII.-CORRELACION ENTRE LAS PROTEASAS DEL EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis CON LAS PROTEASAS LIBERADAS POR UN CULTIVO DE N. brasiliensis AL MEDIO DE AGAR MICROBIOLOGICO-CASEINA.**

**A.- PRODUCCION DE LAS PROTEASAS DE UN CULTIVO DE N. brasiliensis Y EL EFECTO DE LOS INHIBIDORES ENZIMATICOS SOBRE ESTAS PROTEASAS.**

En la placa A, de la figura 16, se observa el halo claro alrededor de la colonia de N. brasiliensis; el cual corresponde a la hidrólisis de la caseína, producido por

las proteasas liberadas al medio agar microbiológico-caseínas. La actividad enzimática observada se vio afectada por PMSF (placa B) y por PHMB (placa C). La actividad caseinolítica de aquellas placas a las cuales se les agregó iodacetamida (placa D) y neocuproine (placa E) no se vio afectada.

**IX.- ANALISIS POR IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PROTEASAS DEL EXTRACTO CELULAR DE N. brasiliensis CON SUEROS DE PACIENTES CON MICETOMA, TUBERCULOSIS Y ENFERMEDAD DE HANSEN.**

En la tabla 6 se muestra los resultados, obtenidos por IET, de las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis; las cuales fueron reveladas con sueros de pacientes infectados por N. brasiliensis; así como por sueros de pacientes con tuberculosis y enfermedad de Hansen. Los

resultados mostraron que 6 de los 10 sueros de los pacientes con micetoma en remisión y 1 de los 10 sueros de los pacientes con Micetoma activo, presentaron anticuerpos contra las bandas proteicas responsables de la actividad enzimática; mientras que los sueros de los pacientes con tuberculosis y enfermedad de Hansen, resultaron negativos para estas bandas.

## DISCUSION

En este trabajo logramos identificar actividad proteolítica en el extracto celular y en el filtrado de cultivo de Nocardia brasiliensis.

A diferencia de los trabajos realizados por otros investigadores, los cuales reportaron actividad enzimática del total de las proteasas presentes en el filtrado de cultivo de N. brasiliensis, nosotros logramos identificar, mediante la técnica de zimograma, 3 bandas con actividad caseinolítica en el extracto celular de Nocardia brasiliensis; mientras que en el filtrado de cultivo se logró identificar solamente 2 bandas líticas; sin embargo, no se logró detectar actividad enzimática en el extracto celular, ni en el filtrado de cultivo de N. asteroides.

Es importante mencionar que las bandas líticas pudieran corresponder a monómeros agregados; o pudieran representar subunidades no idénticas de 1 sola proteína teniendo cada una diferente actividad.

La actividad enzimática, presente en el extracto celular de N. brasiliensis, al parecer depende de la presencia de  $\text{CaCl}_2$  y de la composición de amortiguador, más que del pH. El rango de pH en el cual se observó actividad enzimática variaba de 3 a 9.

La clasificación de las proteasas del extracto celular de *N. brasiliensis*, por medio del uso de inhibidores enzimáticos utilizando la técnica de zimograma, demostraron que se trata de enzimas de diferente clase catalítica. Este hallazgo no se logró observar cuando utilizamos la técnica de Mc Laughlin y Faubert, como ensayo para medir la actividad enzimática; el cual se basa en medir actividad enzimática total. La carencia de la correlación entre estas 2 técnicas se explica, en parte, a que son técnicas diferentes; ya que la técnica de zimograma tiene la ventaja de ser sensible y simple; además, por medio de la electroforesis se logra separar, por peso molecular, las diferentes enzimas que pudieran estar presentes en el extracto celular; mientras que en el ensayo en tubo todas las enzimas presentes están mezcladas y el resultado final no es más que la suma o la mezcla de las actividades enzimáticas individuales.

---

El efecto de los inhibidores enzimáticos sobre las proteasas presentes en el extracto celular de *N. brasiliensis*, utilizando la técnica (zimograma), nos mostró que las proteasas identificadas en el extracto celular, pertenecen a todas las clases catalíticas existentes; mientras que con la técnica en tubo (Mc Laughlin y Faubert), no fue posible demostrar el efecto de los agentes quelantes de metales pesados tales como el  $Zn^{++}$ .

Al parecer estos hallazgos concuerdan con los resultados reportados por Tsuboi (48) y Zlotnik (53).

Una posible explicación de estos hallazgos, es que existen más de 1 clase de enzimas catalíticas, presentes en el filtrado de cultivo de N. brasiliensis. La posibilidad de que exista más de una enzima en el extracto celular es fuertemente apoyada por el hecho de que algunos inhibidores afectaron solamente 1 banda lítica sin afectar las otras 2.

El peso molecular aproximado de las proteasas presentes en el extracto celular de N. brasiliensis, reportado en este trabajo, al parecer concuerda con el reportado por Zlotnik; sin embargo, el papel de las enzimas en la patogénesis del micetoma no se conoce.

Las proteasas liberadas por N. brasiliensis, al medio de agar con caseína, al parecer, son las mismas que se identificaron en el extracto celular de N. brasiliensis; ya que fueron inhibidas por los mismos inhibidores.

Al parecer, nuestros resultados nos permiten sugerir que las proteasas identificadas, en el extracto celular de N. brasiliensis, son inmunogénicas en el hombre; ya que por IET, 6 de los 10 sueros de los pacientes con micetoma en remisión y 1 de los 10 sueros de los pacientes con micetoma activo, presentaron anticuerpos contra estas proteasas; mientras que los sueros de pacientes con tuberculosis y enfermedad de Hansen no las reconocieron.

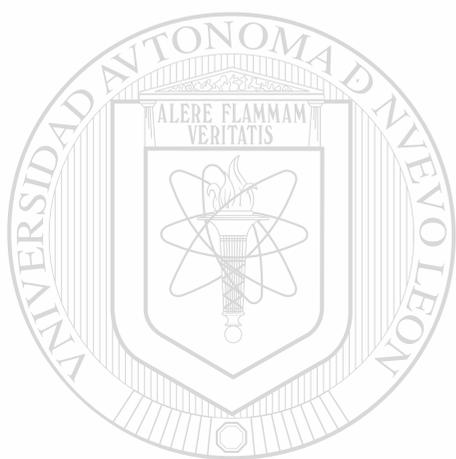
El hecho de que los anticuerpos contra las proteasas estaban presentes en la mayoría de los pacientes con micetoma en remisión, y solamente en 1 de los 10 pacientes con micetoma activo, permite sugerir que tal vez los anticuerpos contra las proteasas se encuentran en el sitio de la lesión, cuando la enfermedad esta en su fase activa; tal como ocurre en otras condiciones patológicas (15,16) o que estén formando complejos inmunes en circulación y éstos no pueden ser detectados en el suero.

La respuesta de anticuerpos en el 60% (6 de 10 pacientes) de los pacientes en remisión, corresponden al isotipo IgG, ésta es una respuesta clásica dependiente de T (linfocitos T).

Cabe mencionar que es importante realizar más experimentos que nos permitan concluir, de manera contundente la inmunogenicidad de las proteasas; por lo tanto, es necesario tener un mayor número de pacientes infectados por *N. brasiliensis* y al mismo tiempo, conocer el período de evolución o resolución de la enfermedad; así como el grado de extensión de las lesiones y determinar la cepa de *N. brasiliensis* causante de la infección.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sobre el estudio de las proteasas, constituyen una base para posteriores investigaciones; basadas principalmente en el aislamiento y purificación de las proteasas; con la finalidad de determinar el

papel que juegan las mismas en el daño tisular observado en el micetoma.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## C O N C L U S I O N E S

1.- Mediante la técnica de zimograma, se identificaron 3 bandas proteicas con actividad caseinolítica en el extracto celular de Nocardia brasiliensis; mientras que en el filtrado de cultivo, únicamente 2.

2.- El pH óptimo en el cual se observó una mayor actividad enzimática fue de 7.4; cuando se utilizó como amortiguador Tris-HCl 0.1 M con cloruro de calcio 10 mM.

3.- La actividad enzimática de las proteasas presentes en el extracto celular, fue inhibida en forma drástica por el PHMB y PMSF; y de manera parcial por el resto de los inhibidores utilizados. Lo que sugiere que existe más de una clase catalítica.

4.- El peso molecular aproximado de las proteasas , determinado por cromatografía de filtración en gel, fue de 35.5 kDa; mientras que por PAGE al 12 % en condiciones no desnaturalizantes, fue: 51.5, 42 y 40.5 kDa.

5.- Tanto las proteasas liberadas al agar con caseína, como las identificadas en el extracto celular, fueron inhibidas por PMSF y PHMB, lo cual sugiere que podría tratarse de las mismas proteasas.

6.- Las proteasas identificadas son inmunogénicas en el hombre; ya que los sueros de pacientes con micetoma en estado de remisión, presentaron anticuerpos del isotipo IgG en circulación.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ajello L. 1986. Mycetomas in the United States. A critical review. In. Memorias del 1er. Simposio Internacional de Mycetoma: Barquisimeto, Venezuela, 1978, Mérida, Venezuela: Edit. Venezuela C.A. pp 252-281.
- 2.- Armstrong, J.A. & Hart P.D. 1971. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis with observations on fusion with phagosomes. J. Exp. Med. 134:713-740.
- 3.- Beaman, B.L. and Shankel, D.M.:1969. Ultrastructure of nocardial cell growth and development on defined and complex agar media. J. Bacteriol. 99:876-884.
- 4.- Beaman, B.L. 1975. Structural and biochemical alterations of Nocardia asteroides cells walls during its growth cycle during its growth cycle. J. Bacteriol. 123:1235-1253.

---

- 5.- Beaman, B.L.: 1976 Possible mechanisms of nocardial pathogenesis. In: Brownell, G., Goodfellow, M. and Serrano,® J. (eds.); Biology of the Nocardiae, Academic press, London, pp 386-417.
- 6.- Beaman, B.L. and Maslan, S. 1977: Effect of cyclophosphamide on experimental Nocardia asteroides infection in mice. Infect. Immun. 16:995-1804.
- 7.- Beaman, B.L. 1977. In vitro response of rabbit alveolar macrophages to infection with Nocardia asteroides. Infect. Immun. 15:925-937.

- 8.- Beaman, B.L., Gershwin, M.E. and Maslan, S.: 1978. Infectious agents in immunodeficient murine models: Pathogenicity of Nocardia asteroides in congenitally athymic (nude) and hereditarily esplenic (Dh/+) mice, *Infect. Immun.* **20**:381-387.
- 9.- Beaman, B.L. 1979. The interaction of Nocardia asteroides of different phases of growth with in vitro maintained macrophages obtained from the lungs of "normal" and "immunized" rabbits. *Infect. Immun.* **26**.
- 10.- Beaman, B.L. 1983. Actinomycete pathogenesis, p45 Ia: Goodfellow: Mordarski M.; Williams S.T. (Ed); *The Biology of the actinomycetes* Academic Press.
- 11.- Beaman B.L. 1981. Mechanisms of pathogenesis and host resistance to the actinomycetes. *Zbl. Bakt Suppl.* **11**:209-220.
- 12.- Beaman B.L. Scates.S.M. 1981. Role of L-forms of Nocardia caviae in the development of chronic-mycetomas in abnormal and immunodeficient murine models. *Infect. Immun.* **33**:893-907.
- 13.- Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiodinated protein A. *Anal Biochem.* **112**:195-203.
- 14.- Claypole E.J. 1913 "On the classification of the Streptothrices particularly in their relation bacteria" *J. Exp. Med.*, **17**:99-116.

- 15.- Carmen Conde, Raúl Mancilla, Magdalena Fresan and Librado Ortiz Ortiz. 1983. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with Nocardia brasiliensis. Infection and Immunity. 40:1218-1222.
- 16.- Clinton, B.A., and W.O. Weigle. 1972. Cellular events during the induction of experiment thyroiditis in the rabbit. J. Exp. Med. 136:1605-1616.
- 17.- Curry W.A. 1980. Human nocardiosis. A clinical review with selected case reports. Arch. Intern Med. 140:818-826.
- 18.- Divo, A. 1977. Microbiología médica. 3a. ed. Ed. Interamericana. pp. 337-380.
- 19.- Folb, P.I., A. Timme and A. Horowitz. 1977. Nocardia infections incongenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. Infect. Immun. 18:459-466.
- 20.- González-Ochoa. 1945. Estudio comparativo entre Actinomyces mexicanus, N. brasiliensis y N. asteroides. Rev. Inst. Salud. Enferm. Trop. México City. 5:155-162.
- 21.- González-Ochoa, A., H.H. Shibayama., D. Felix and m. Amaya. 1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Excerpta Med. Int. Congr. ser. 55:542-551.
- 22.- González-Ochoa, A. 1972. Mycetomas caused by N. brasiliensis with a note on the isolation of the causative organism from the soil. Lab. Invest. 11:1118--1123.
- 23.- González-Ochoa, A. 1973. Virulence of Nocardiae. Can. J. Microbiol. 19:901-907.
- 24.- González-Ochoa 1975. Geografía de las micosis profundas.

Rev. Inv. Salud Pública. 35:85-96.

- 25.- González-Ochoa, A. 1975. Mycetoma in clinical tropical dermatology. Oxford:Blackwell pp. 24-29.
- 26.- Goren, M.B., Hart, P.D., Young, M.R. & Armstrong, J.A. 1976. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:2510-2514.
- 27.- Green W.O. Jr. Adams T.E. (1964). Mycetoma in the United States. Am. J. Clin. Pathol. 3:230-233.
- 28.- Jonsson S., Wallace R.J. Jr., Hull S.I., Musher D.M. (1986) Recurrent Nocardia pneumonia in an adult with chronic granulomatous disease. Am. Rev. Respir. Dis. 133:932-934.
- 29.- Kato M. (1966) Am. Rev. Resp. Dis. 94:395-399.
- 30.- Kato, M. (1973) Infect. Immun. 7:14-21.
- 31.- Kenneth, S.W. and A.F. Mahmoud. 1984. Tropical and geographical medicine. 1a. Edición. Mc Graw Hill. pp.934-941.
- 32.- Kwapinski J.B., Seeliger H.P.R. 1965. Investigations on the antigenic structure of actinomycetales. IX Serological classification of the nocardiae with the polysaccharide fractions of their cell walls. Mycopathol. 25:173-182.
- 33.- Laemlii, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- 34.- Lechevalier, M.P., A.C. Horan and H.A. Lechevalier. 1978. Lipid composition in the classification of Nocardie and

Mycobacteria. J. Bact. **105**:313-318.

35.- Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J. Jr. and Shadomy H.J. Manual of Clinical Microbiology Fourth Edition. American Society for Microbiology.

36.- Lowry, O.H. Rosebrough N.I., Fair A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**:265-275.

37.- M. C. Laughlin, J. and Faubert, G. 1977. Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and an acid proteinase from E. histolytica. Can. J. Microbiology **23**:420-425.

38- Macher, A.M. 1985. Agents of Mycetoma. I.G.L. Mandell, R.G. Douglas, and J.E. Bennet (Ed). Principles and practice of infectious disease. 2a Ed. John Wiley & Sons. Inc. New York. pp 1459-1460

39.- Magaña, M. 1984. Mycetoma. Int. J. Dermatol. **23**:221-236.

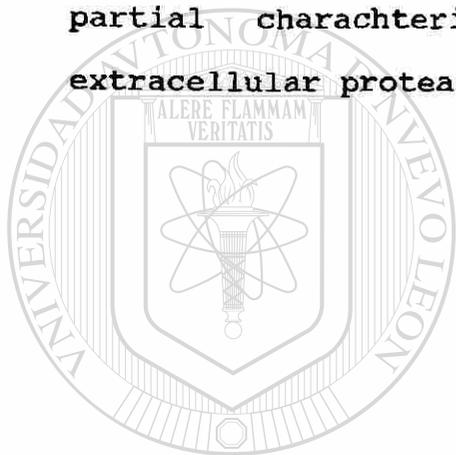
40.- Melendro, E. I., M. F. Contreras, C. Ximenez A.M. García Maynez and L. Ortiz-Ortiz 1978. Changes in host resistance caused by Nocardia brasiliensis in mice: Cross reaction against Listeria monocytogenes . Int. Archs. Allergy. appl. Immun. **57**:74-81.

41.- Ortiz-Ortiz, L. and L.F. Bojalil 1972. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of Nocardia organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of Nocardia Infection. Clin. Exp. Immunol. **12**:225-289.

42.- Pérez-Montfort, R. Ostea-Saloma, P. Velázquez-Medina,

- Montfort I. and Becker, I. 1989. Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica. Mol. Bioch. Parasitol.
- 43.- Rico, G., R. Ochoa, A. Olivia, A. Gonzalez-Mendoza, S.M. Walker and L. Ortiz-Ortiz. 1982. Enhanced resistance to Nocardia brasiliensis infection in mice depleted of antigen-specific B cells. J. Immunol. 129:1688-1693.
- 44.- Salinas, M.C., L. Vera, O. Welsh and M. Rodríguez. 1992. Antibody Response to Nocardia brasiliensis antigens in man. Zbl. Bakt. 276:390-397.
- 45.- Salinas, M.C., L. Vera, O. Welsh and M. Rodríguez. 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from Nocardia brasiliensis. J. of Clin. Microbiol. 30:1183-1188.
- 46.- Salinas, M.C., Casillas, S. and Welsh O. 1991. Determinación de anticuerpos anti-Nocardia brasiliensis por un ensayo inmunoenzimático (ELISA). In press.
- 
- 47.- Saúl A. 1983. Micosis Profundas. En Lecciones Dermatología México, D.F. Editorial Francisco Mendez Cervantes. 127-168. ®
- 48.- Smith, T.D. y N.F. Conant 1960. Bacteriología de Zinsser. 2a. Ed. Hispanoamericano pp. 952-954.
- 49.- Tsuboi R., Yamaguchi T., Matsuda K. and Ogawa H. 1989. Extracellular proteinase production and the pathogenicity of Nocardiae. Arch. Dermatol. Res. 281:78-80
- 50.- Welsh O. 1975. Mycetoma in children. In.: Pediatric Dermatology. Modern problems in pediatrics, Basel; Karger 17:248-253.

- 51.- Welsh O., López R. 1985. Micetomas con diseminación pulmonar. Med. Cutan Iber. Lat. Am. 13:517-523.
- 52.- Welsh O., Saucedo E., González J. and Ocampo J. 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. J. Am. Acad. Dermatol. 17:443-448.
- 53.- Zlotnik H., Scharamm VL., Buckley HR. 1984. Purification and partial characterization of a Nocardia brasiliensis extracellular proteasa. J. Bacteriol. 157:627-631.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

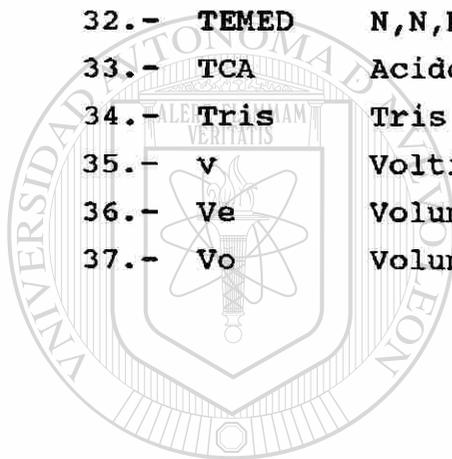
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## ANEXO A. Abreviaturas

1.-	BHI	Infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusion)
2.-	BSA	Albúmina Sérica Bovina (Bovin Serum Albumin)
3.-	C	Grados centígrados
4.-	%C	Por ciento de agente entrecruzador (Bis-acrilamida)
5.-	cm	Centímetro (s)
6.-	Da	Dalton
7.-	EDTA	Etilendiaminotetracetato
8.-	g	Gramos
9.-	h	Hora
10.-	IET	Inmunolectrotransferencia
11.-	kDa	Kilodalton
12.-	l	Litro
13.-	M	Molar
14.-	mg	Miligramo (s)
15.-	min	Minuto (s)
16.-	ml	Mililitro (s)
17.-	mm	Milímetro (s)
18.-	mM	Milimolar
19.-	2-ME	2-Mercaptoetanol
20.-	M	Molar
21.-	N	Normal
22.-	ng	Nanogramo (s)
23.-	nm	Nanómetro (s)
24.-	PBS	Solución salina-fosfato
25.-	PHMB	Para-hidroxi-mercuri-benzoato

- 26.- PMSF Para-metil-sulfonil-fluoruro  
27.- Rf Factor de retardamiento (Movilidad relativa)  
28.- SDS Lauril sulfato de sodio  
29.- SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio  
30.- seg Segundo (s)  
31.- %T Porcentaje de acrilamida total  
32.- TEMED N,N,N',N', tetrametiletilendiamina  
33.- TCA Acido tricloroacético  
34.- Tris Tris (hidroximetil) aminometano  
35.- v Voltios  
36.- Ve Volumen de elución  
37.- Vo Volumen vacio

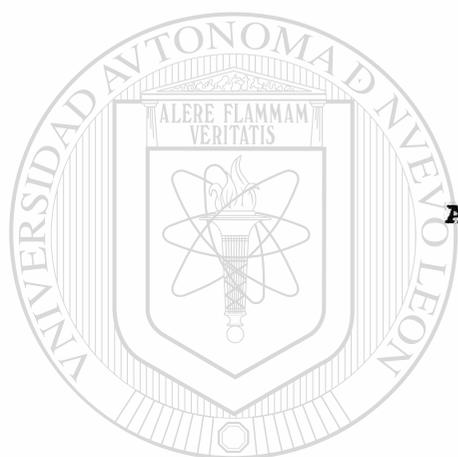


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**ANEXO B: FIGURAS**

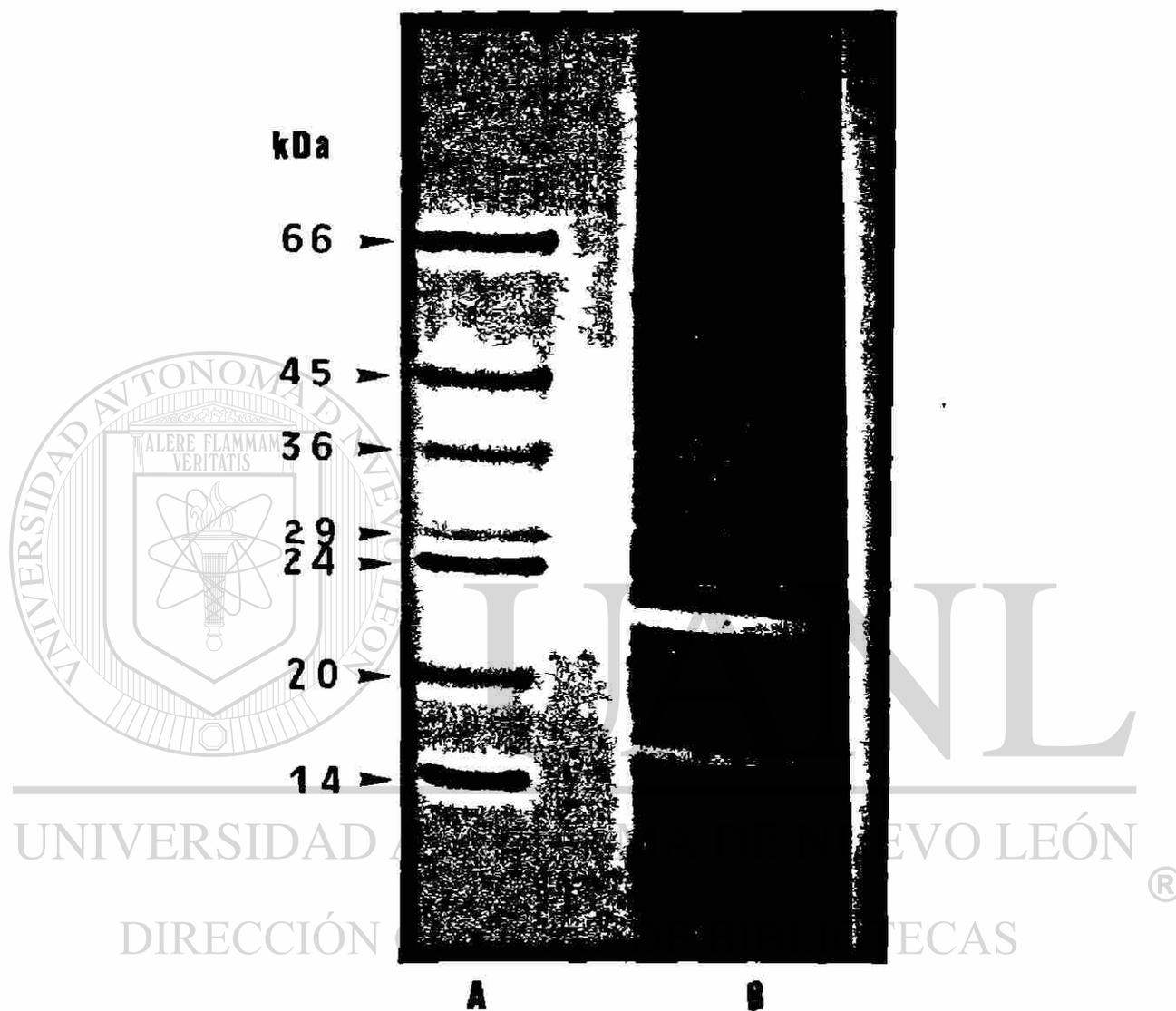
UANL

---

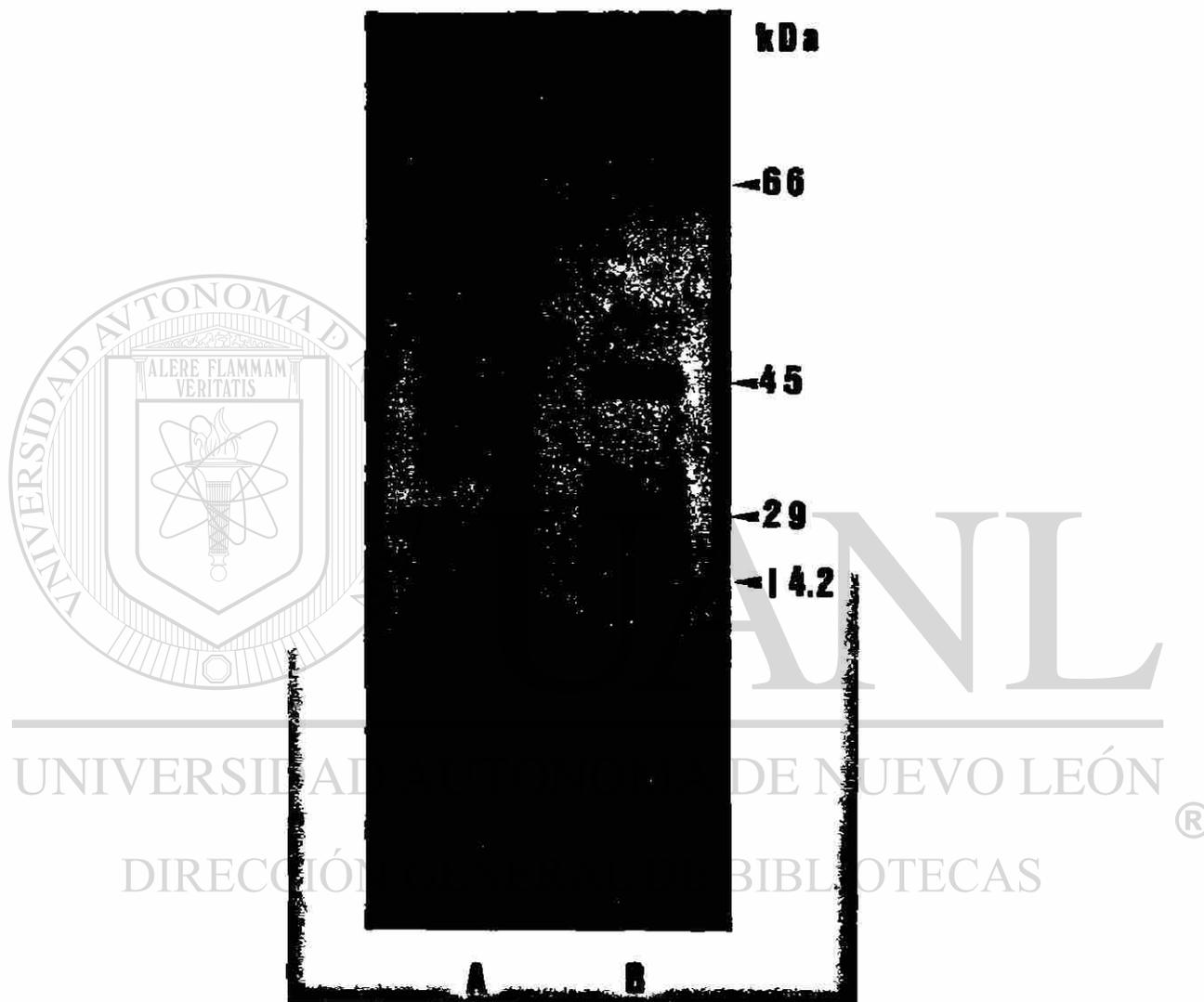
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



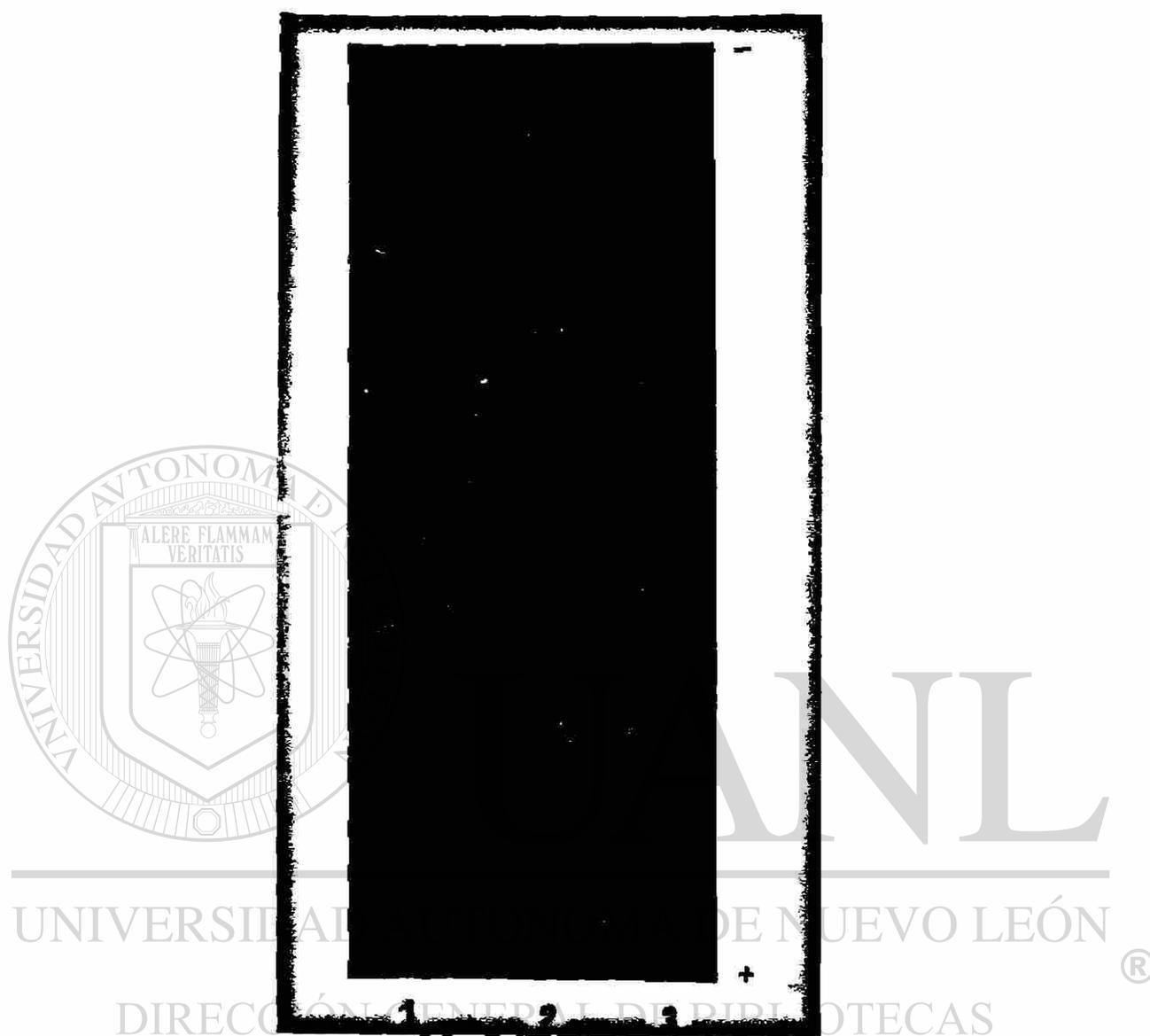
**Figura 1.-** Análisis en SDS-PAGE del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* en gradiente de 8.75%-18%. Carril A: marcadores de peso molecular bajo. Carril B: extracto celular 25  $\mu$ g. Tinción con nitrato de plata.



**Figura 2.-** Análisis en PAGE al 12% en condiciones no desnaturizantes del extracto celular de *Nocardia brasiliensis*. Carril A: extracto celular 60 ug. Carril B: Marcadores de peso molecular conocido MW-ND 500. Tinción con azul de Coomassie R-250.



**Figura 3.-** Técnica de zimograma para identificar actividad enzimática en el extracto celular de N. brasiliensis. Carril 1: Corresponde a la contraparte del gel de los marcadores de peso molecular conocidos (MW-ND 500). Carril 2: corresponde a la contraparte del gel del extracto celular de N. brasiliensis. Tinción con azul de Coomassie R-250.



**Figura 4.-** Zimograma para determinar la actividad enzimática de las proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa Carril 1: marcadores de peso molecular conocido. Carril 2: extracto celular de *N. brasiliensis* (60 ug). Carril 3: control negativo (solución amortiguadora). Gel de caseína teñido con azul de Coomassie.



**Figura 5.-** Papel de nitrocelulosa sobre la cual se transfirieron las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis. Las flechas indican los espacios claros que quedaron después de incubar el papel con el gel-caseína.

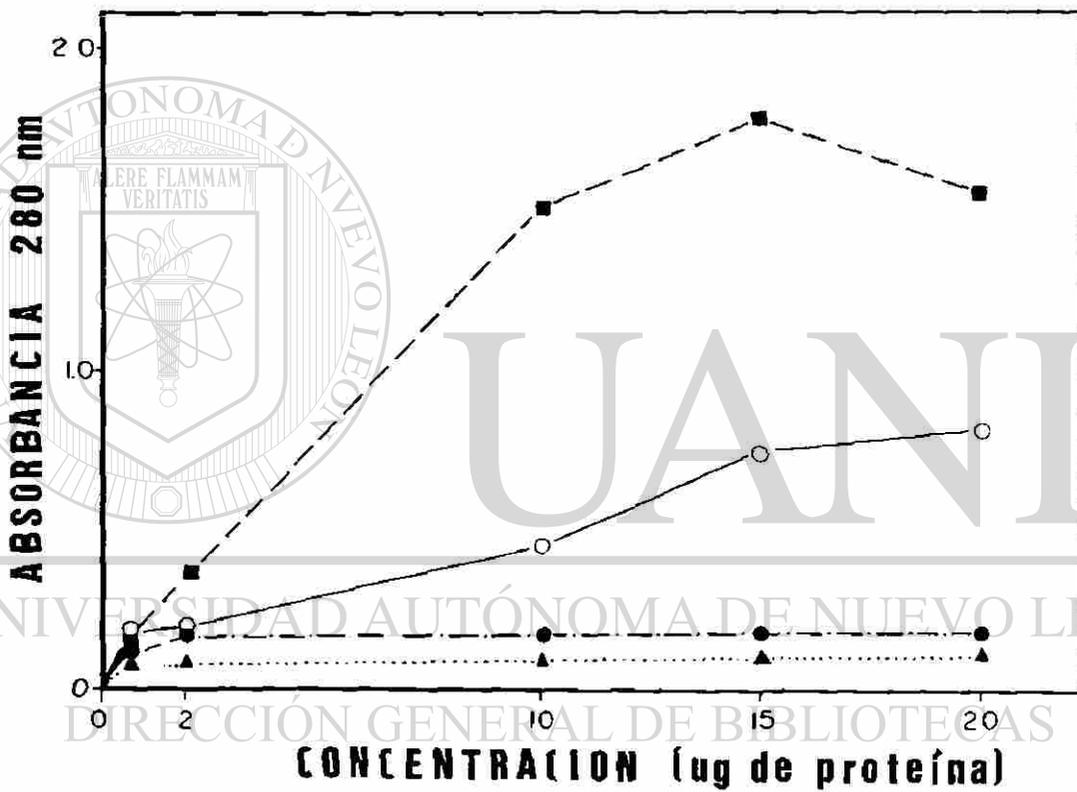


Figura 6.- Actividad proteolítica del extracto celular de *N. brasiliensis* (■-■-■), comparada con la actividad de la tripsina (○-○), papaína (●-●) y extracto celular de *N. asteroides* (▲-▲-▲).

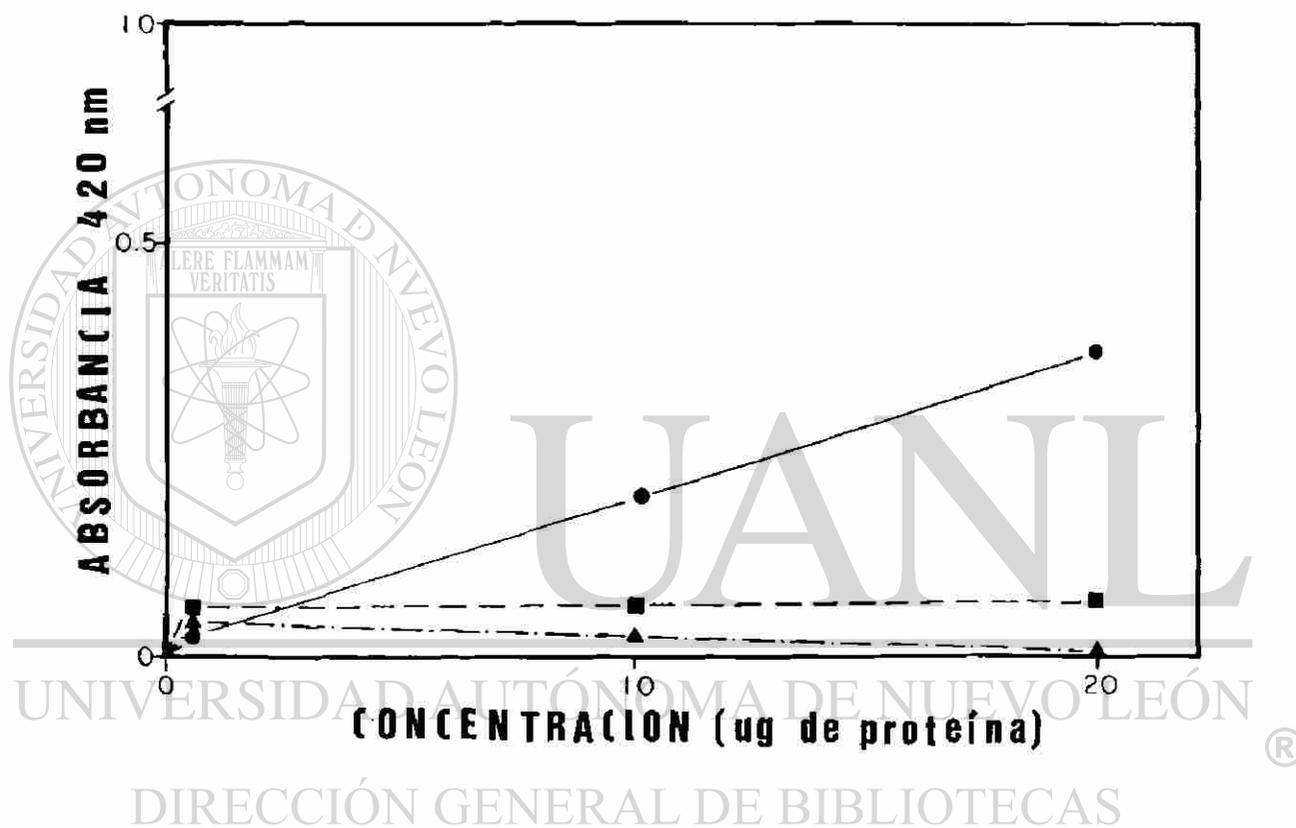
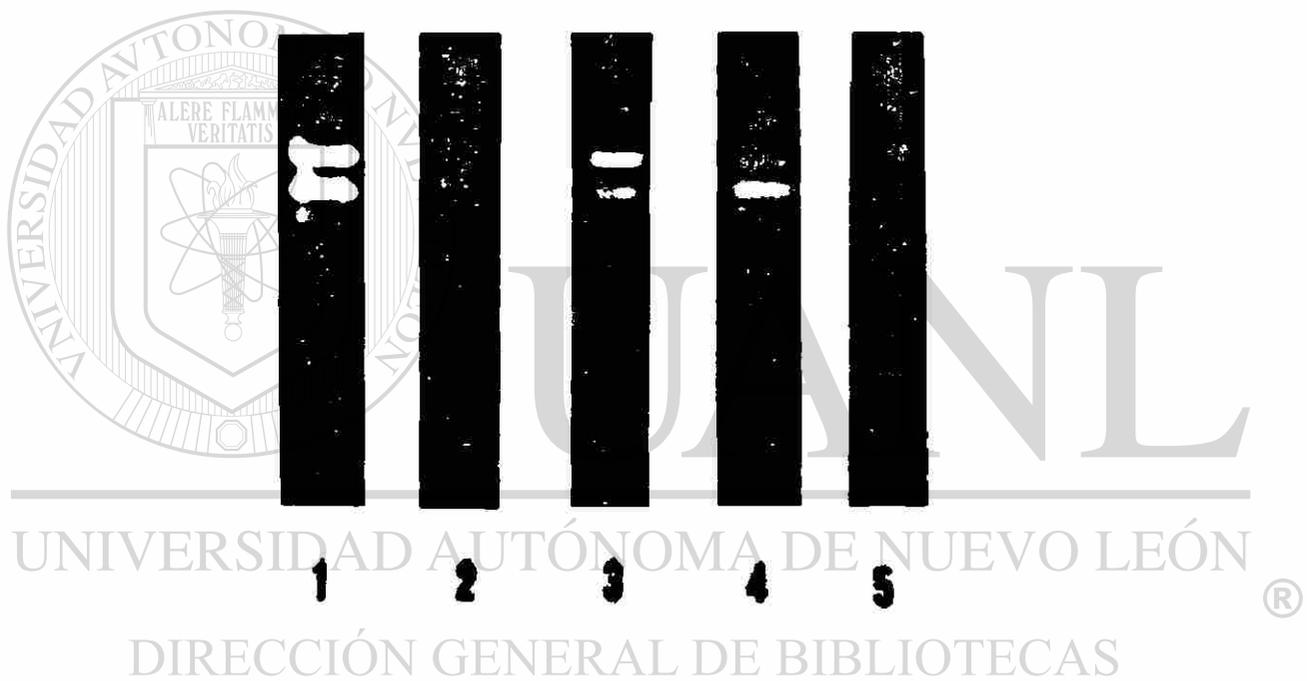
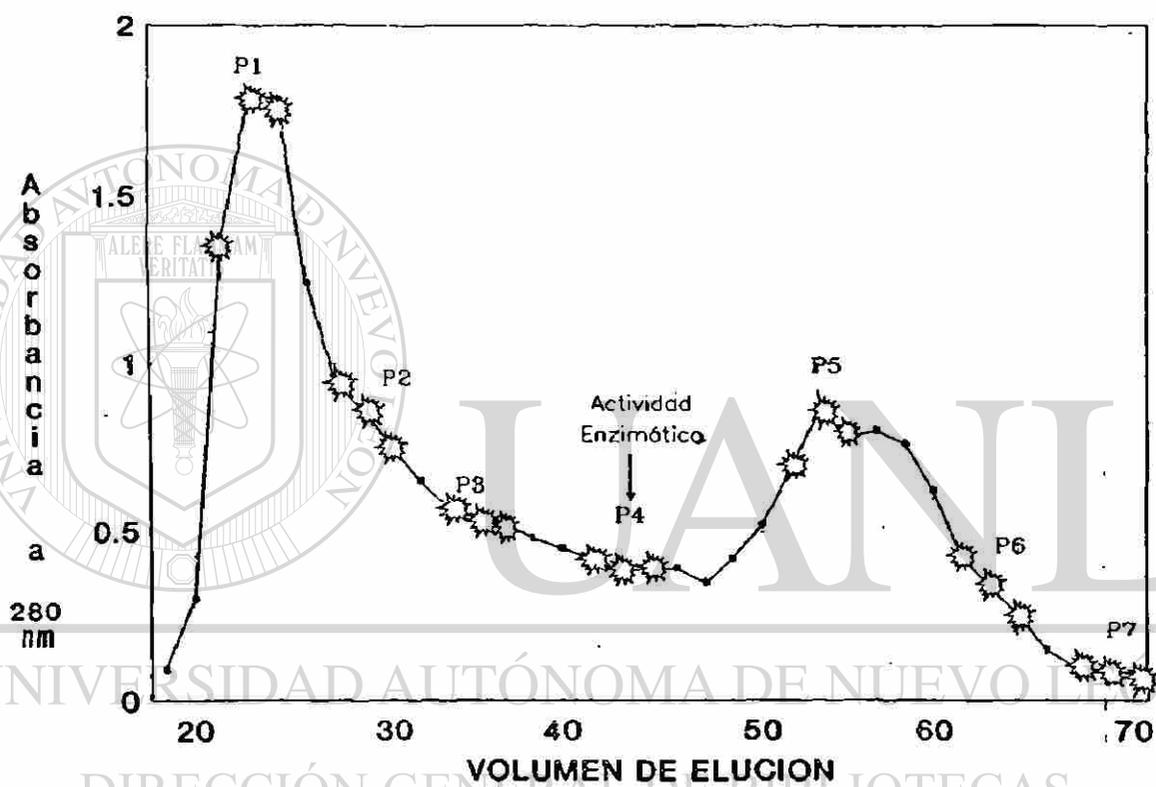


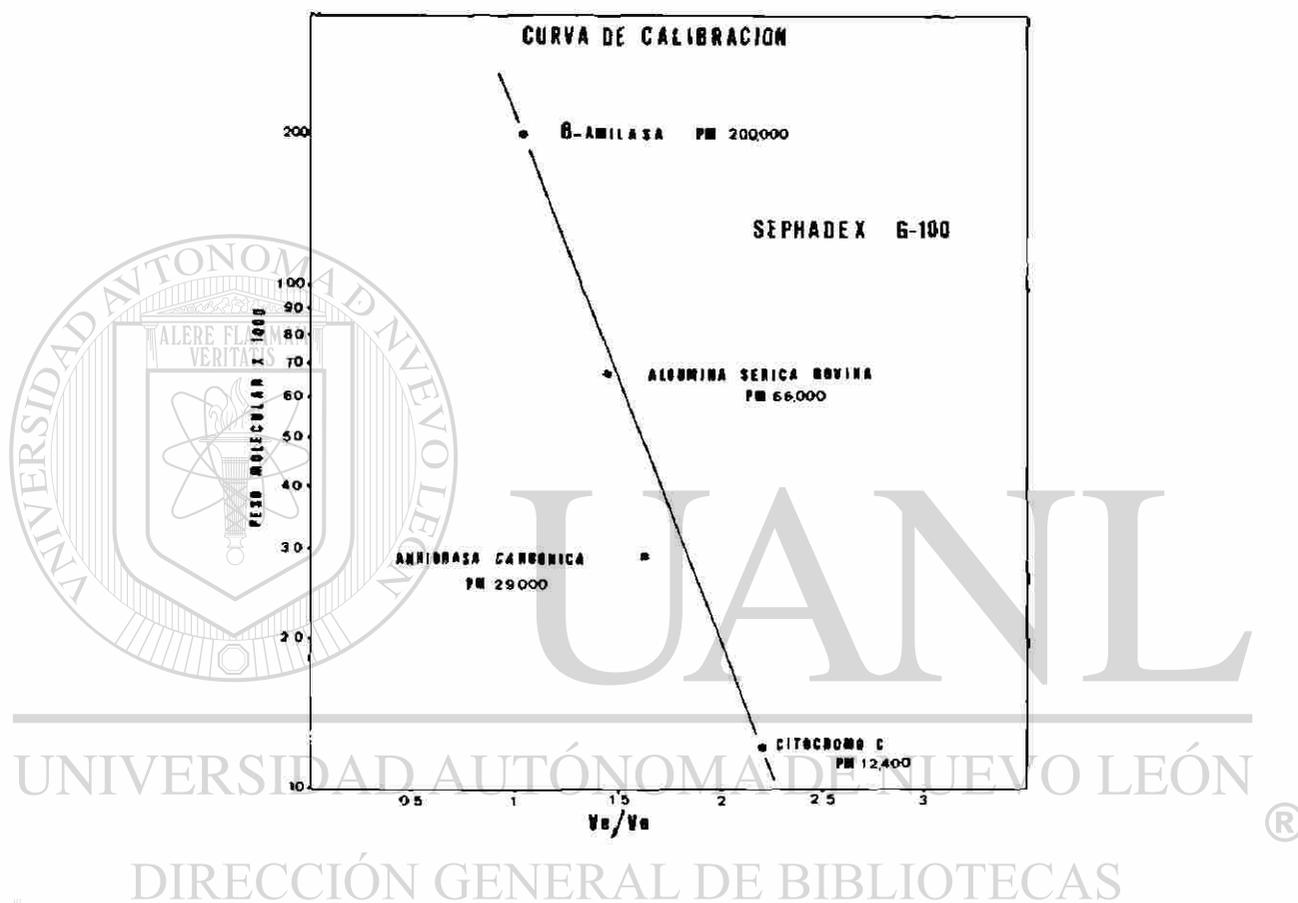
Figura 7.- Actividad de proteasa del extracto celular de *N. brasiliensis* (■-■), comparada con la actividad de la tripsina (●—●) y extracto celular de *N.asteroides* (▲-▲) utilizando como substrato azocaseína.



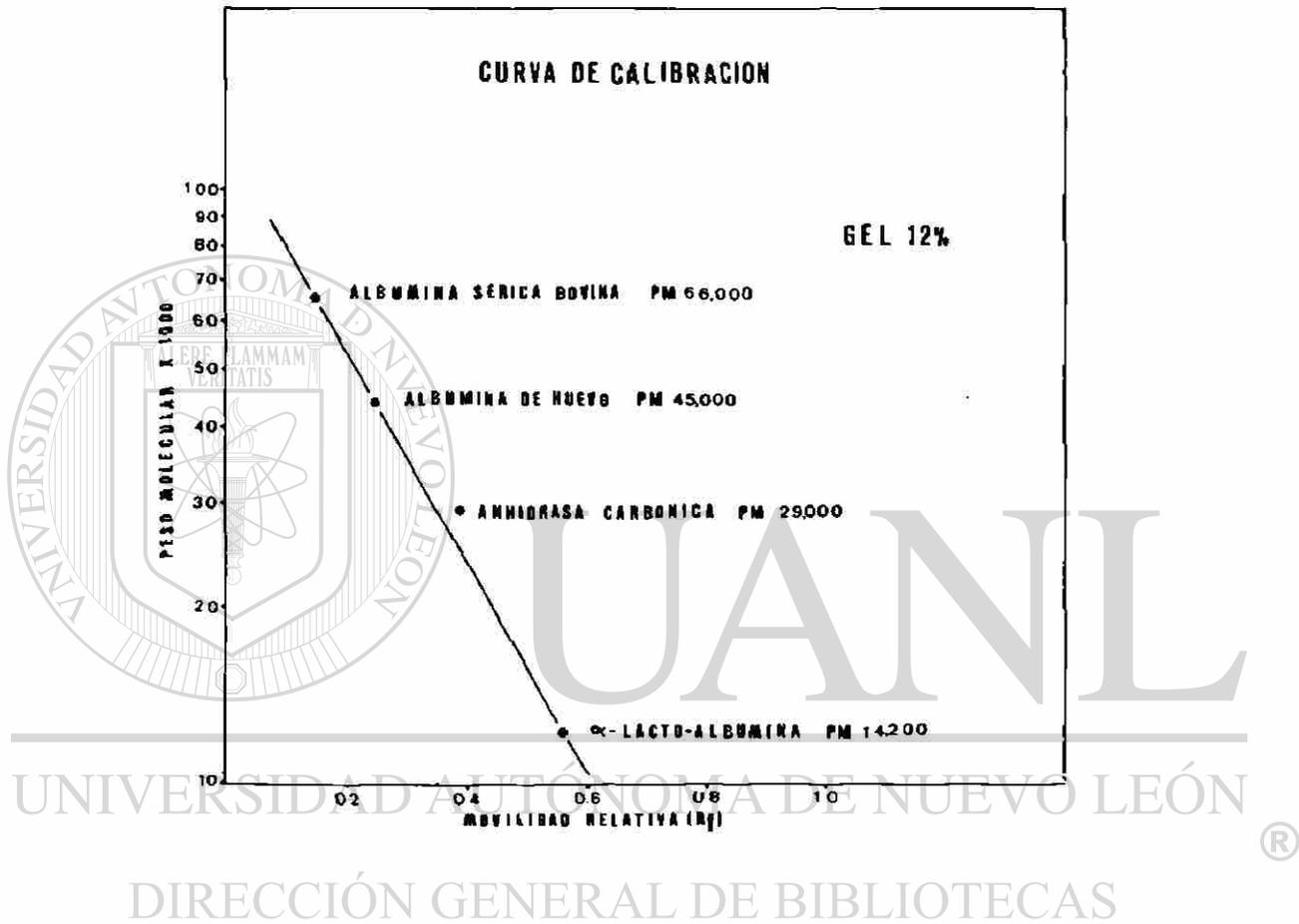
**Figura 8.-** Zimograma del extracto celular de N.brasiliensis, incubada con caseína como sustrato y el efecto de los inhibidores: carril 1 (sin inhibidor), carril 2 (PMSF y PHMB) carril 3 (EDTA), carril 4 (neocuproine) y carril 5 (iodacetamida).



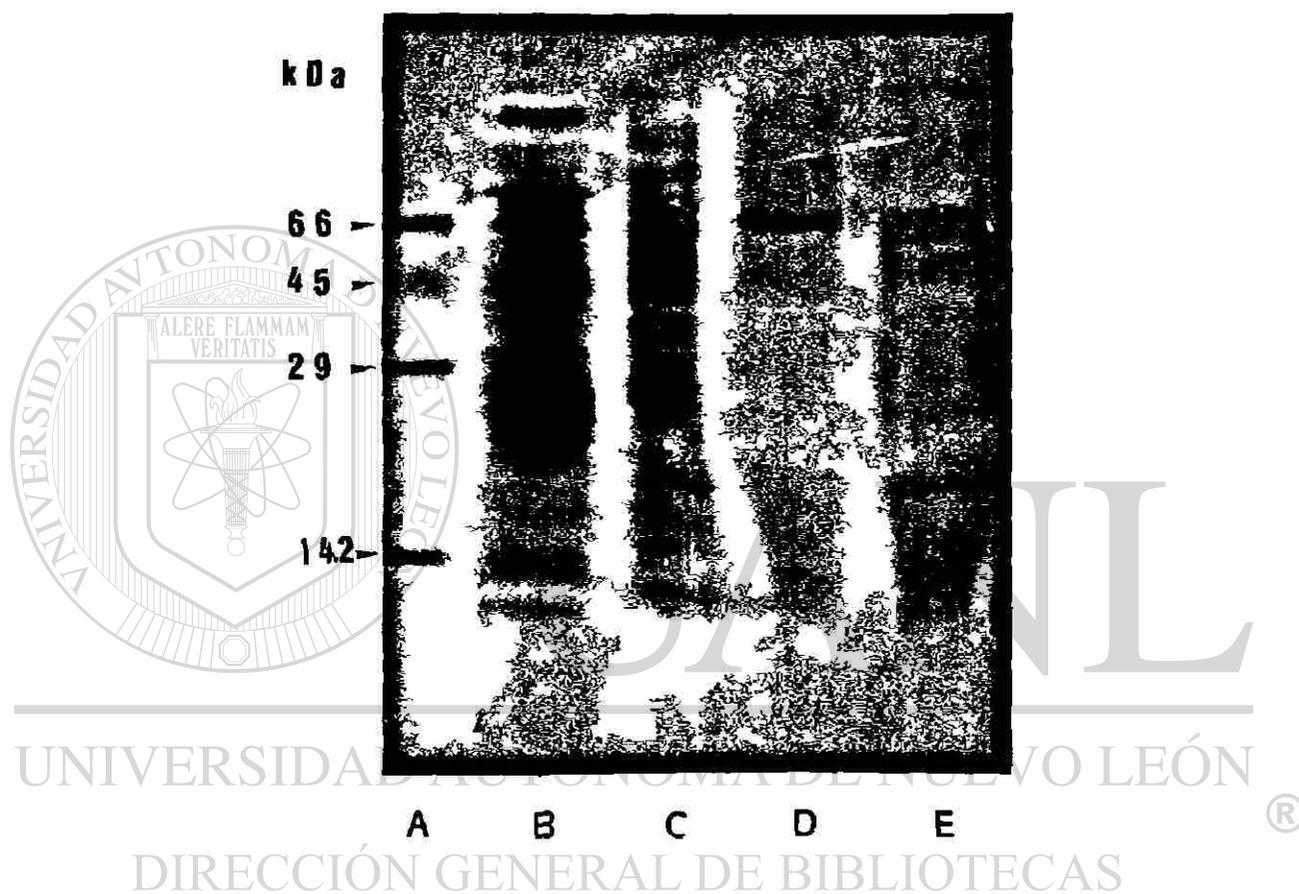
**Figura 9.-** Perfil de elución del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* en sephadex G-100-120.



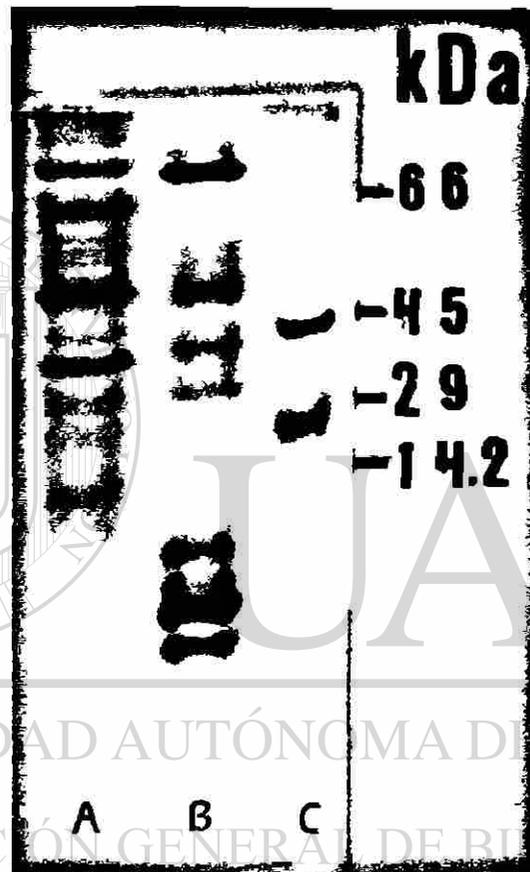
**Figura 10.-** Curva de calibración obtenida por filtración en gel (Sephadex G-100) de los marcadores de peso molecular conocido (kit MW-GF-200 SIGMA).



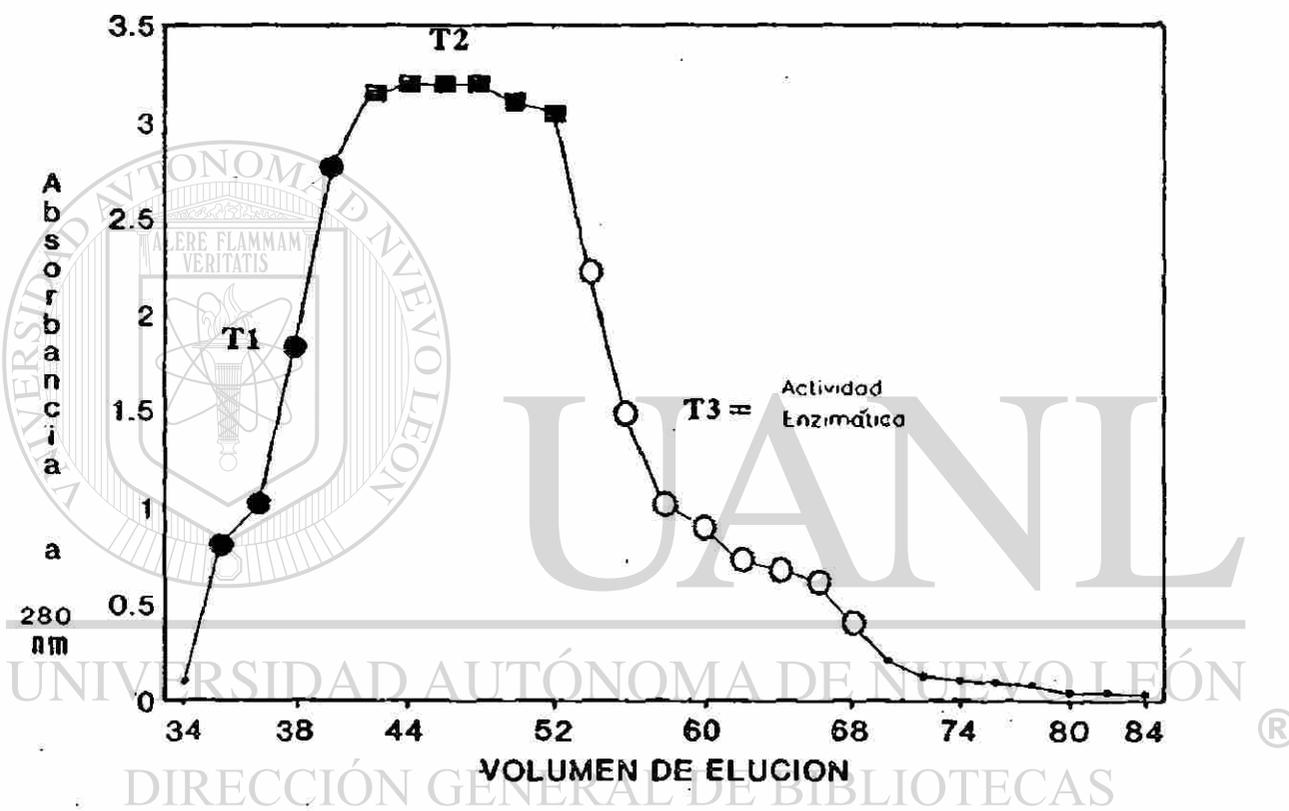
**Figura 11.-** Curva de calibración obtenida por electroforesis en gel 12% en condiciones no desnaturizantes, de las proteínas de peso molecular conocido (kit MW-ND-500 SIGMA).



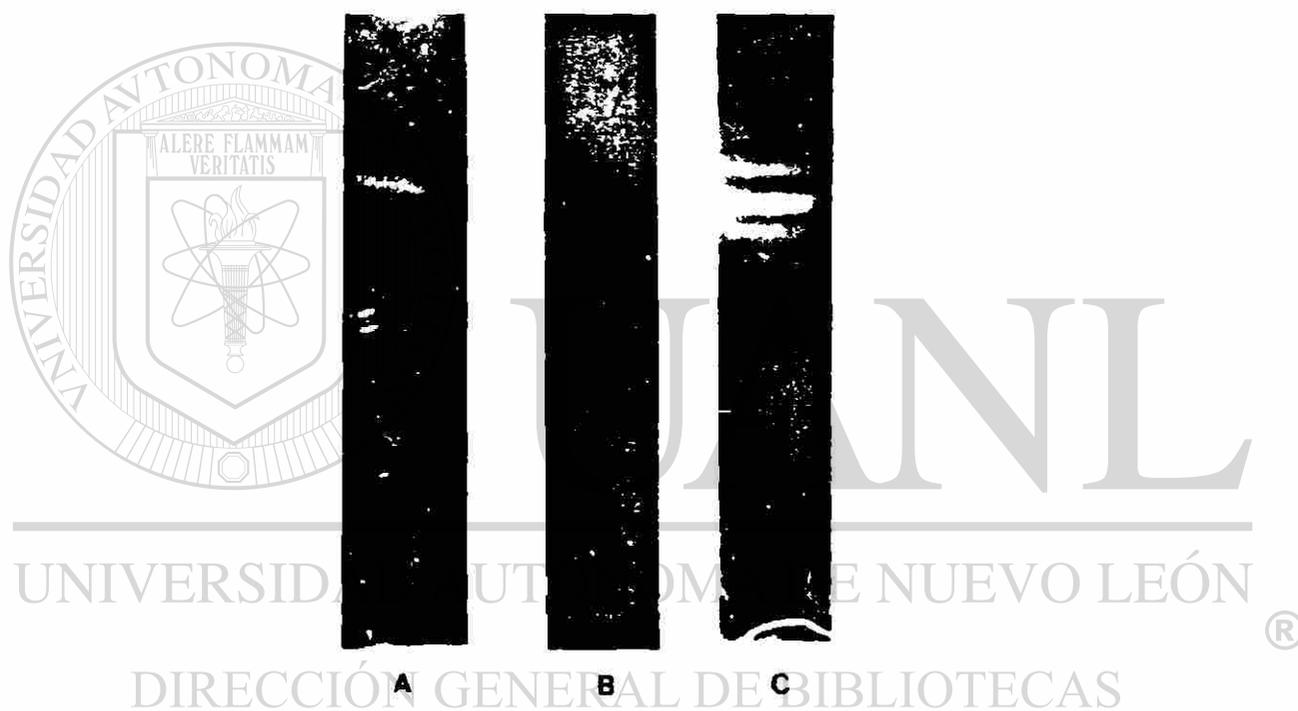
**Figura 12.-** Análisis en SDS-PAGE en gradiente de 8.75-18% con SDS y 2-mercaptoetanol del filtrado de cultivo de N. brasiliensis. Carril A: marcadores de peso molecular conocido. Carril B: extracto celular de N. brasiliensis. Carril C: extracto celular de N. asteroides. Carril D: filtrado de cultivo de N. brasiliensis. Carril E: filtrado de cultivo de N. asteroides.



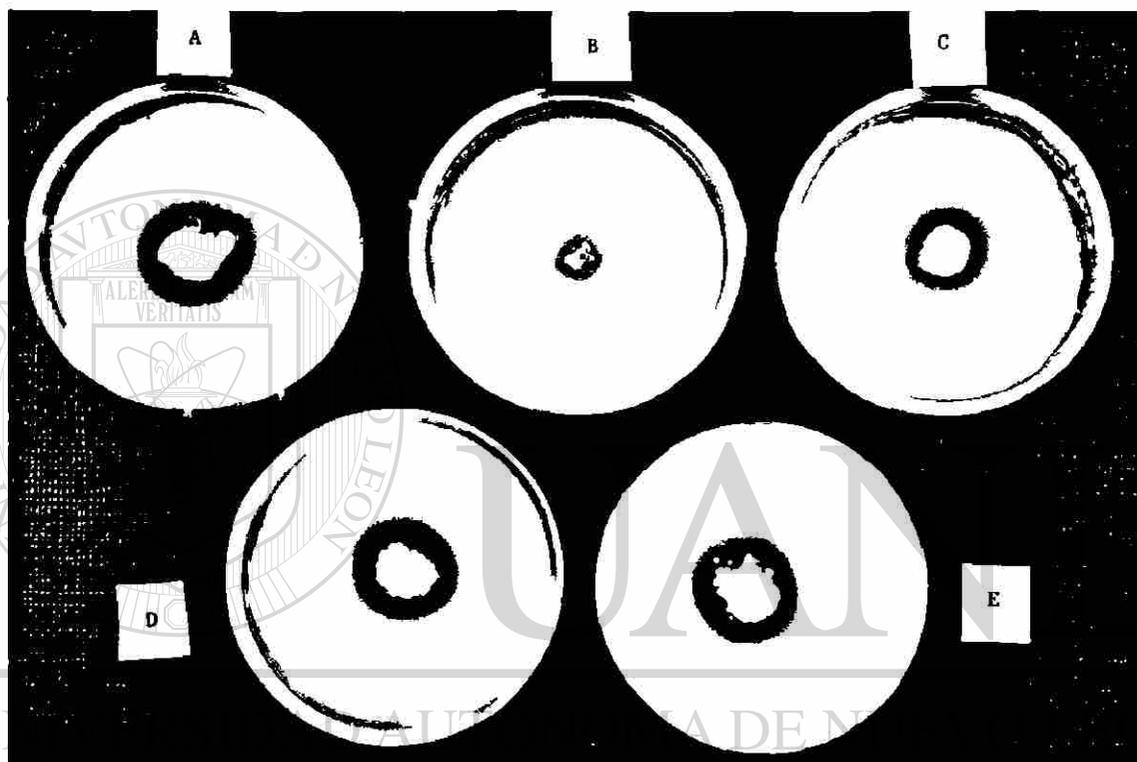
**Figura 13.-** Análisis en PAGE al 12% en condiciones no desnaturizantes del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*. Carril A: filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*. Carril B: extracto celular de *N. brasiliensis*. Carril C: marcadores de peso molecular conocido.



**Figura 14.-** Perfil de elución del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* en sephadex G-50.



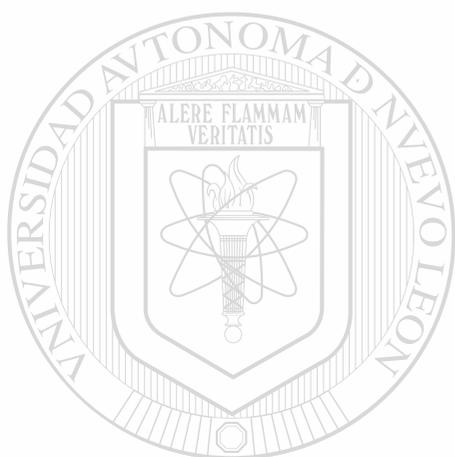
**Figura 15.-** Zimograma para determinar actividad enzimática del filtrado de cultivo de N. brasiliensis. Carril A: Filtrado de cultivo de N. brasiliensis. Carril B: filtrado de cultivo de N. asteroides. Carril C: extracto celular de N. brasiliensis.



## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 16.-** Efecto de los inhibidores enzimáticos sobre la actividad caseinolítica de *N. brasiliensis* en una placa con agar microbiológico-caseína después de 5 días de incubación a temp. ambiente.

Placa A: sin inhibidor. Placa B: fenil-metil-sulfonil-flururo (PMSF). Placa C: para-hidroxi-mercuri-benzoato (PHMB). placa D: iodacetamida. Placa E: neocuproïne.



**ANEXO C: TABLAS**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla No. 1 Efecto del pH y la composición del amortiguador en la actividad de proteasa de N. brasiliensis y la tripsina.

AMORTIGUADOR UTILIZADO <sup>a</sup>	VALORES DE ABSORBANCIA A 280 nm	
	<u>N. brasiliensis</u>	TRIPSINA
Citrato pH 3.0	0.732	1.075
Acetato pH 5.0	0.585	1.075
PBS pH 7.0	0.389	1.344
Tris-HCl pH 7.4	0.791	1.215
Carbonato pH 9.0	0.602	1.322

<sup>a)</sup> El extracto de N. brasiliensis o tripsina y la solución de caseína al 1% fueron disueltos en esos amortiguadores.

Tabla No. 2 Efecto del  $\text{CaCl}_2$  en la actividad enzimática del extracto celular de N. brasiliensis y la tripsina.

AMORTIGUADORES UTILIZADOS	VALORES DE ABSORVANCIA A 280 nm	
	<u>N. brasiliensis</u>	TRIPSINA
Tris-HCl 0.1M con $\text{CaCl}_2$	0.889	0.973
Tris-HCl 0.1M	0.599	0.877
PBS 0.1M con $\text{CaCl}_2$	0.580	1.106
PBS 0.1M	0.489	1.172

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Tabla No. 3 Efecto de diferentes inhibidores en la actividad proteolítica de *N. brasiliensis* en el ensayo en tubo.

INHIBIDOR AÑADIDO <sup>a</sup>	CONCENTRACION FINAL	% ACTIVIDAD RESIDUAL <sup>b</sup>
Fenilmetilsulfonil fluoruro	$1 \times 10^{-3}$	69.7
EDTA	$3 \times 10^{-3}$	60.2
2- Mercaptoetanol	$7 \times 10^{-2}$	77.44
Iodacetamida	$2 \times 10^{-2}$	99.3
P-hidroximercuri- benzoato	$10 \times 10^{-5}$	80.15
2,2'- dipyridyl	$2 \times 10^{-3}$	100.0
2,9-Dimetil-1-10 fenantrolina (Neocuproine)	$1 \times 10^{-3}$	100.0
No inhibidor	- - -	100.0

a) Todos los inhibidores fueron disueltos en amortiguadores tris-HCl, tal como se describió en material y métodos.

b) El porcentaje de actividad residual fue calculado comparando los valores de absorbancia con el control (no inhibidor).

Tabla No. 4 Volumen de elución.  $V_e/V_o$  de los marcadores de peso y de las proteasas del extracto celular de N. brasiliensis en filtración en gel (sephadex G 100).

MARCADORES	$V_e$	$V_e/V_o$	PM
B-amilasa	25	1.04	200,000
Albúmina-sérica-bovina	34	1.4	66,000
Anhidrasa carbónica	48	2.0	29,000
Citocromo C	53	2.2	12,400
Proteasas del extracto celular de <u>N. brasiliensis</u>	43	1.75	35,500

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla No. 5 Movilidad relativa (Rf) de los marcadores de peso molecular y de las proteasas del extracto celular de *N. brasiliensis* en gel al 12% en condiciones no desnaturizantes.

MARCADOR	MIGRACION (mm)	RF	PM
Alfa-lactoalbúmina	4.7	0.456	14,200
Anhidrasa carbónica	4.0	0.388	29,000
Albúmina de huevo	2.5	0.242	45,000
Albúmina-sérica-bovina	1.5	0.145	66,000
Proteasas del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i>	2.2	0.213	51,000
	2.6	0.257	42,000
	2.8	0.271	40,500
Azul de bromo fenol	10.3		

**TABLA 6.** Identificación por Western blot de las proteasas de Nocardia brasiliensis por sueros de pacientes con micetoma, tuberculosis y enfermedad de Hansen.

SUEROS		PROTEASA 1	PROTEASA 2
MICETOMA	ACTIVOS n=10	1/10	1/10
	CURADOS n=10	6/10	6/10
TUBERCULOSIS PULMONAR	n=5	0/5	0/5
ENFERMEDAD DE HANSEN	n=5	0/5	0/5
CONEJO	n=1	1/1	1/1

