

## APÉNDICE

### I. Determinación de la actividad de catalasa:

La actividad de catalasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia/min por 692.5. Este último factor se obtuvo como se describe a continuación: la actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (U) definiéndose una Unidad como la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto durante la reacción enzimática. Matemáticamente se expresa con la siguiente ecuación:

$$U = \Delta C / t \quad \text{ec'n (1)}$$

Bioquímicamente la actividad enzimática se expresa por unidad de volumen esto es, en U/mL. Si despejamos  $\Delta C$  obtendremos:

$$\Delta C = (U/\text{mL})(t) \quad \text{ec'n (1.a)}$$

La Ley de Lambert-Beer es fundamental en todas las determinaciones espectrofotométricas. Esta Ley establece que el cambio de absorbancia es directamente proporcional tanto a la absortividad molar así como al cambio de concentración del compuesto en análisis, como al trayecto óptico del haz. Matemáticamente se expresa con la siguiente ecuación:

$$\Delta A = (\epsilon) (\Delta C) (b) \quad \text{ec'n (2)}$$

La substitución de ec'n (1) en la ec'n (2) resulta en:

$$\Delta A = (\epsilon) (U/mL) (t) (b) \quad \text{ec'n (3)}$$

Por lo cual para obtener U/mL, la ecuación resultante es:

$$U/mL = \Delta A / \epsilon b t \quad \text{ec'n (3.a)}$$

De donde:

U = Unidades de actividad ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )

$\Delta A$  = Cambio de absorbancia del compuesto

$\varepsilon$  = Absortividad molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0.036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ )

b = Espesor de la cubeta en cm.

T = Tiempo en minutos

$\Delta C$  = Cambio de concentración del compuesto ( $\mu\text{mol}$ )

Por lo anterior:

$$U/\text{mL} = \Delta A / (0.036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (1 \text{ min})$$

$$= \Delta A / 0.036 \text{ cm}^3 \text{ min. } /\mu\text{mol}$$

$$= \Delta A / (27.7 \mu\text{mol}/\text{min mL})$$

$$= \Delta A \cdot 27.7 \text{ U/mL} \quad \text{ec'n (3.b)}$$

Para determinar el cálculo de actividad de catalasa (U/mL) se tomo en cuenta otros parámetros de análisis: el volumen total del ensayo en la cubeta y la dilución final de la muestra. En este trabajo se agregó  $40\mu\text{L}$  de

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental muestra en un mL de reacción final, por lo tanto la dilución final de ensayo

fue de 1:25.

Integrando estos parámetros a la ecuación (3.b) resulta lo siguiente:

$$U/mL = (\Delta A) ( 27.7 U/mL) ( Vol. de la cubeta) (dilución final en la cubeta)$$

$$U/mL = (\Delta A) ( 27.7 U/mL) (1) (25)$$

$$U/mL = (\Delta A) ( 692.5 U/mL)$$

Como se menciona en material y métodos, al multiplicar el cambio de absorbancia del  $H_2O_2$  /min. Por el factor resultante, se obtiene la actividad de catalasa en la cubeta expresada en U/mL. Para determinar la proporción de una enzima con respecto a la concentración de proteínas de la muestra se determina la actividad específica de la enzima en U/mg. En este trabajo la actividad específica se calculó dividiendo la actividad de catalasa (U/mL) entre la concentración de proteínas (mg/mL)

## II. Preparación de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4

Solución A = 100 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M

Solución B = 100 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 M

Solución madre = Ajustar el pH de la solución B a 7.4 con la solución

A. Almacenar a 4°C, preparar en el momento de su uso.

Solución de trabajo = Diluir la solución madre 1:20 en agua destilada.

La concentración final de esta solución es de 50mM.

## III. Tinción de Wayne y Díaz para actividad de catalasa en gel de poliacrilamida:

Reactivos:

DBA solución al 1.0 mg/mL (3,3' Diaminobencidina, Sigma D-5637), en PBS 0.01 M.

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solución al 30 %, preparar 100 mL de PBS 0.01 M más 10 µL  
de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado (Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, Lot. 5240KPTL)

Preparar una solución que contenga 100 mL de agua destilada y  
agregar 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado.

Solución de revelado:

Solución A: Cl<sub>2</sub>Fe al 2% p/v en agua destilada, preparar solo 50 mL

Solución B: K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> al 2% p/v en agua destilada preparar 50 mL

Mezclar solución A + B v/v unos minutos antes de su uso.

Procedimiento de la tinción:

a.-Colocar el gel en un refractario, lavarlo con agua destilada  
por 10', eliminar los lavados.

b.-Lavar con solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- H<sub>2</sub>O, por 10 a 15 min, eliminar el sobrenadante.

c.- Agregar la solución de DAB

#### IV. Preparación de células electrocompetentes (10 y 123):

a.- Inocular una sola colonia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en un matraz con BHI, en este caso se deja varios días (48 a 72 h) a 37°C, con gentil agitación a que el cultivo llegue a un crecimiento visible.

b.- Tomar del cultivo anterior 1 mL y aplicarlos a otro matraz con 500 mL de BHI y dejarlos en agitación vigorosa por dos o tres días, preferentemente a una densidad de 0.6 DO<sub>325</sub>.

c. Enfriar el matraz con bacterias, dejarlo por 10 a 15 min., Mantener fríos todos los contenedores en este procedimiento y evitar cambios de temperatura drásticos, transferir a un bote de centrifuga y centrifugar a 5,000 rpm por 10 min, eliminar el sobrenadante y lavar

---

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental de tres a cuatro veces con agua fría estéril hasta eliminar el medio de cultivo.

d.- El paquete celular se resuspende en el menor volumen de agua y de ser necesario no agregar más de 5 mL de agua .

e.- Guardar muestras de 0.5 y 1 mL en micro tubos estériles, guardarlos en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## V. Transformación de *N. brasiliensis* HUJEG-1:

a.- Conecté el Electroporador y llevar la carga a 2.5 KV y 25  $\mu\text{F}$ .

b.- Agregar en una cubeta de elctroporación de 0.1 cm de diámetro interno , 1  $\mu\text{L}$  del DNA plasmídico y 1 mL de suspensión bacteriana frescas , preferentemente.

c.- Colocar la cubeta en la cámara y aplicar el pulso .



d.- Remover inmediatamente y agregar 1 mL de BHI, incubar en agitación suave por 30 a 60 min.

e.- Dispersar 0.5 mL de la suspensión bacteriana sobre placas de agar BHI con asa de vidrio estéril.

f.- Dejar incubar hasta observar colonias bacterianas.

**VI. Preparación de los geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.**

Gel de corrimiento al 12 % T, 2.7 % C:

Reactivos	Volumen en mL
H <sub>2</sub> O	3.4
Acrilamida/bis-acrilamida al 30 %	4.0
Tris 1.5 M (pH=8.8)	2.5
Persulfato de amonio al 10 %	0.1
TEMED	0.004
Volumen total	10.004

El volumen total se vació inmediatamente en un cámara de vidrio, previamente desengrasado. El gel de empaquetamiento al 5 % T, 2.5 % C, se realizó con las siguientes cantidades de reactivos:

Reactivo	Volumen en mL
H <sub>2</sub> O	2.13
Acrilamida/bis-acrilamida al 30 %	0.5
Tris 1.5 M (pH=6.8)	0.38
Persulfato de amonio al 10 %	0.03
TEMED	0.003
Volumen total	3.043

El volumen final se vació en la parte superior de la cámara de vidrio, sobre el gel de corrimiento y rápidamente se colocó un peine formador de carriles para muestras, el gel se dejó polimerizar por una hora.

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ernesto Torres López

Candidato para el Grado de  
Doctorado en Ciencias con especialidad de Inmunología

Tesis: LA ACTIVIDAD DE CATALASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1  
EN LA INDUCCIÓN DEL MICETOMA EXPERIMENTAL.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

### Biografía:

Datos personales: Nacido el 4 de Noviembre de 1960 en la ciudad de Monterrey N.L. México. Hijo del Sr. Juan Torres Garnica (†) y Sra. María Elena López Degollado (†).

Escolaridad: Egresado de la Facultad de Medicina con el grado de Químico Clínico Biólogo en 1984. Graduado de la Escuela de Postgrado en la Maestría con especialidad en Inmunología, con el tema de trabajo: Estudio de la respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución del micetoma experimental en ratones BALB/c, en 1994.

Experiencia profesional: Personal profesional no docente desde Noviembre de 1984 en el Servicio de Inmunología del Hospital Civil de la U.A.N.L.

*No crece un árbol si no se siembra  
Si no se cuida, si no se hidrata  
No ramifica si no se poda  
No florece sin amor*

*Así él que siembre un árbol  
Podrá cosechar las flores,  
Los frutos y las podas,  
Para sembrar en otros campos  
Más árboles, y así poder crecer  
más de lo que pueda  
Llegar a crecer  
un sólo árbol*





