

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



"DISEÑO DE UNA NUEVA METODOLOGIA PARA EL  
AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA PROTEASA  
EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1".

POR

GRACIELA GUERRERO RAMIREZ

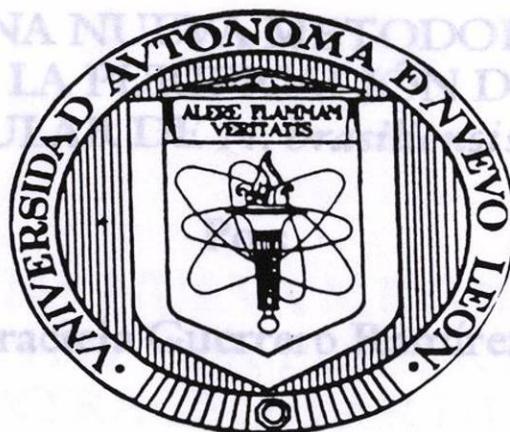
Como requisito parcial para obtener  
el Título de Licenciatura de la Carrera  
de Químico Farmacéutico Biólogo

OCTUBRE 1999

TL  
QR82  
.N6  
G8  
1999  
c.1



1080092573



**APROBACIÓN DE TESIS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**Facultad de Ciencias Químicas**

*Salinas*  
Dr. Mario César Salinas Carmona  
ASESOR PRINCIPAL

**"DISEÑO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1".**

**COMISIÓN DE TESIS**

**POR**

*Cantú*  
Q. F. B. Ma. Elena Cantú Cárdenas  
**GRACIELA GUERRERO RAMÍREZ**

*Guerrero*  
Como requisito parcial para obtener el Título de Licenciatura de la Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

**OCTUBRE 1999**

*Bravo*  
Q. F. B. Elida Aguilar Bravo  
PRIMER VOCAL

*Garza*  
Q. F. B. Ma. Elena Cruz Garza  
SEGUNDO VOCAL



QR82  
.N6  
G8  
1999



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
Facultad de Ciencias Químicas

"DISEÑO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA EL  
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA  
EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HJEG-1."

POR

GRACIELA GUERRERO RAMÍREZ



Como requisito parcial para obtener  
el Título de Licenciatura de la Carrera  
de Químico Farmacéutico Biólogo.

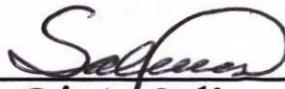
OCTUBRE 1999

**"DISEÑO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO Y LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1".**

**Por:**

**Graciela Guerrero Ramírez**

**APROBACIÓN DE TESIS**

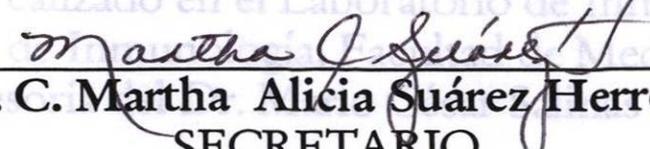


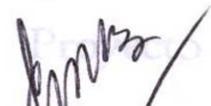
**Dr. Mario César Salinas Carmona**  
**ASESOR PRINCIPAL**

**COMISIÓN DE TESIS**



**Q. F. B. Ma. Elena Cantú Cárdenas**  
**PRESIDENTE**

  
**M. C. Martha Alicia Suárez Herrera**  
**SECRETARIO**

  
**Q. F. B. Elicia Aguilar Bravo**  
**PRIMER VOCAL**

  
**Q. F. B. Ma. Elena Cruz Garza**  
**SEGUNDO VOCAL**

## DEDICATORIA

A mi Madre, Ma. Socorro Ramírez Ruiz, por darme la vida, por darme su confianza, su amor, su amistad, por ser mi mayor ejemplo y mi inspiración para alcanzar mis metas y aspiraciones a la realidad.

**"DISEÑO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO Y LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1".**

A mi Hermana Claudia, por darme el mejor ejemplo de perseverancia, superación y dedicación profesional.

### POR:

A mi Hermano Beto, por el apoyo que en él siempre he sentido y sé que me lo ha dado, por su trato sencillo, su nobleza, su confianza y su amistad.

**Graciela Guerrero Ramírez**

A mi Hermana Corina, por ser con quien he compartido hasta hoy lo bueno y lo mejor de mi vida y por darme la mejor de las amistades.

A mi Padre, Roberto Guerrero Villagómez

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Celular, del Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, U. A. N. L., bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona.

Proyecto apoyado por PAICYT No. SA085

## DEDICATORIA

A mi Madre, **Ma. Socorro Ramírez Ruiz**, por darme la vida, por darme su confianza, su amor, su amistad, por ser mi mayor ejemplo y mi mejor amiga y por apoyarme siempre en cada una de mis metas a realizar.

A mi Hermana **Claudia**, por darme el mejor ejemplo de perseverancia, superación y dedicación profesional.

A mi Hermano **Beto**, por el apoyo que en él siempre he sentido y sé que me lo ha dado, por su trato sencillo, su nobleza, su confianza y su amistad.

A mi Hermana **Corina**, por ser con quien he compartido hasta hoy lo bueno y lo mejor de mi vida y por darme la mejor de las amistades.

Y a mi Padre, **Roberto Guerrero Villagómez**.

A Yenny, quien me ofreció una muy buena amistad, y que ahora apreció bastante.

## AGRADECIMIENTOS

A los compañeros **A. Dios**, por regalarme el don de la Vida, por ser Él la Luz que la ilumina, por ser Él quien la dirige.

A cada uno de los miembros de **mi familia** por su amor, comprensión, confianza y apoyo.

A mis amigas las Químicas **Wendy y Adriana**, al **Dr. Lucio** y a la **Dr. Al Dr. Mario César Salinas Carmona**, por darme la oportunidad de colaborar con él en esta investigación y así cumplir una de las metas más importantes de mi vida.

A la **M. C. Luz Isabel Pérez**, por sus enseñanzas tan valiosas a lo largo de la realización de este trabajo.

A mi Tío, **Esteban Ramírez**, con quien mi familia y yo hemos  
Al grupo de Maestras y Maestros de la carrera de **Q.F.B. de la Facultad de Ciencias Químicas** por haberme dado tantos conocimientos científicos y humanos, los cuales me han ayudado a mi crecimiento personal y profesional.

A **Yenny**, quien me ofreció una muy buena amistad, y que ahora apreció bastante.

A los compañeros y amigos de este departamento, **Dr. Carlos Medina, Dra. Angeles, Dra. Alma Yolanda, Q.F.B. Alejandra, B.M. Juan Manuel, Q.C.B. Edgar, Q.C.B. Ernesto, Q.C.B. Vicente, Kelsoplasma, Lilith, Lucy, Lizzy, Alejandro, Francisco, Aracely, Carlitos y Carmen**, a todo el personal, porque me permitieron compartir tantos momentos felices e inolvidables.

A mis amigas las Químicas **Wendy y Adriana**, al **Dr. Lucio** y a la **Dra. Alejandra**, por su excelente trato, su ayuda y su amistad.

A mis mejores amigos, **Diana, Aída, Carlos, Beba, y Gisel**, con quienes compartí mi carrera y estos últimos 4 años de mi vida, y con quienes comparto hasta hoy la mejor de las amistades.

A mi Tío, **Esteban Ramírez**, con quien mi familia y yo hemos tenido siempre un apoyo seguro e incondicional.

A.....	52
B.....	54
C.....	57

LISTA DE FIGURAS.....	i
-----------------------	---

LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS.....	ii
---------------------------------	----

# INDICE

## LISTA DE FIGURAS

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
1. Proceso de ultrafiltración.....	51
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
2. Zimograma de punto de los filtrados y medios BHI y C. Rivas.....	30
<b>III. ANTECEDENTES.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
3. Análisis electroforético del filtrado de cultivo (medio C. Rivas).....	31
<b>V. PA METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4. Zimograma de punto de la proteasa extracelular purificada.....	35
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
5. Zimograma de punto de filtrado y extracto celular.....	44
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>45</b>
6. Electroforesis en gel al 12% en condiciones no desnaturalizantes del filtrado de cultivo C. Rivas.....	52
<b>X. APÉNDICES</b>	
<b>A.....</b>	<b>52</b>
<b>B.....</b>	<b>54</b>
<b>C.....</b>	<b>57</b>
7. Zimograma de punto de la proteasa extracelular purificada.....	35
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
8. Electroforesis en gel PAGE en gradiente al 8-18% de la proteasa extracelular purificada.....	36
<b>LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS.....</b>	<b>ii</b>
9. Electroforesis en gel PAGE al 12% en condiciones no desnaturalizantes del filtrado.....	37

## LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Proceso de ultrafiltración.....	51
Gel-sustrato 7.5%T, 2.7 % C., caseína 1.14 mg/ml.....	52
2. Zimograma de punto de los filtrados y extractos de cultivo de los medios BHI y C. Rivas. ....	30
3. Análisis electroforético SDS-PAGE en gradiente 8-18% del filtrado de cultivo (medio C. Rivas) .....	52 31
4. Zimograma de punto de los filtrados de cultivo .....	53 32
5. Zimograma de contacto filtrado y extracto celular en medio C. Rivas. ....	53 33
6. Electroforesis preparativa en gel al 12% en condiciones no desnaturalizantes del filtrado de cultivo C. Rivas. ....	28 34
7. Zimograma de punto de la proteasa extracelular purificada. ....	35
8. Electroforesis en gel PAGE en gradiente al 8-18% de la proteasa extracelular purificada .....	38 36
9. Electroforesis en gel PAGE al 12% en condiciones no desnaturalizantes del filtrado .....	37

## LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS

	Página
Gráfica 3. Rendimiento de la proteasa extracelular de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	40
Tabla 1. Preparación del zimograma: Gel-sustrato 7.5%T, 2.7 % C., caseína 1.14 mg/ml.....	52
Tabla 2. Preparación del gel de corrimiento en gradiente 8-18%, 2,7%C.....	52
de dos fucates diferentes.....	41
Tabla 3. Preparación del gel de empaquetamiento 5%T, 2.7%C.....	52
Tabla 4. Preparación del gel de corrimiento 12%T.....	53
Tabla 5. Preparación del gel de empaquetamiento 4%T.....	53
Tabla 6. Rendimiento de masa bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en dos medios de cultivo.....	28
Tabla 7. Rendimiento de proteínas totales de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en dos medios de cultivo diferentes.....	29
Gráfica 1. Curva de calibración obtenida por electroforesis en gel al 12% en condiciones no desnaturizantes de las proteínas de peso molecular conocido.....	38
Gráfica 2. Curva de calibración obtenida por filtración en gel (Sephadex G-100) de los marcadores de peso molecular conocido.....	39

## II. RESUMEN

**Gráfica 3.** Rendimiento de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1 de dos medios de cultivo diferentes. . . . . 40

**Gráfica 4.** Rendimiento de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1 de dos fuentes diferentes. . . . . 41

El rendimiento con esta metodología se caracterizó por ser bajo y el costo alto, razón por la cual en el presente trabajo se diseñó una nueva metodología para mejorar el rendimiento y disminuir los costos de producción, y además simplificar el proceso de aislamiento y purificación de proteasas.

A partir del filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 cultivada en un medio diseñado por Catalina Rivas a base de peptona de colágea se inició el aislamiento de esta proteína. El filtrado de cultivo se concentró y posteriormente se precipitó con sulfato de amonio al 50% y el sobrenadante fue dializado exhaustivamente. Mediante electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturizantes se logró una buena separación, luego se eluyó la proteasa purificada. La cuantificación de la proteasa se determinó por el método de Bradford, la actividad caseinolítica se verificó con la técnica de zimograma de punto. La pureza se evaluó en un gel de poliacrilamida en gradiente 8-18% teñido con nitrato de plata.

Con esta metodología el rendimiento se incrementó cuatro veces respecto al método establecido anteriormente.

## I. RESUMEN

En los últimos años se han descrito diferentes proteasas de *Nocardia brasiliensis* las cuales han sido implicadas en el daño tisular observado en el micetoma.

Salinas y cols. (1992) identificaron unas proteasas a partir de extractos celulares de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. En 1996 Licón Trillo y cols. purificaron unas proteasas con actividad caseinolítica en columnas de DEAE-celulosa combinadas con electroelución en geles preparativos de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes.

El rendimiento con esta metodología se caracterizó por ser bajo y el costo alto, razón por la cual en el presente trabajo se diseñó una nueva metodología para mejorar el rendimiento y disminuir los costos de producción, y además simplificar el proceso de aislamiento y purificación de proteasas.

A partir del filtrado de cultivo de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 cultivada en un medio diseñado por Catalina Rivas a base de peptona de colágena se inició el aislamiento de esta proteína. El filtrado de cultivo se concentró y posteriormente se precipitó con sulfato de amonio al 50% y el sobrenadante fue dializado exhaustivamente. Mediante electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturizantes se logró una buena separación, luego se eluyó la proteasa purificada. La cuantificación de la proteasa se determinó por el método de Bradford, la actividad caseinolítica se verificó con la técnica de zimograma de punto. La pureza se evaluó en un gel de poliacrilamida en gradiente 8-18% teñido con nitrato de plata.

Con esta metodología el rendimiento se incrementó cuatro veces respecto al método establecido anteriormente.

Existen dos clases de micetomas, los producidos por eumicetos u hongos verdaderos que se encuentran en México y los producidos por actinomicetos. (33).

## II. INTRODUCCIÓN

Los micetomas actinomicéticos son más frecuentes, constituyen el 98%. *Nocardia brasiliensis* pertenece al género *Nocardia* de la familia Nocardiaceae del orden Actinomycetales. El género *Nocardia* está antigénicamente muy relacionado con los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordona* y *Tsukamurella*. (32,36).

	<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i> <i>brasiliensis</i> (86%)
<p><i>N. brasiliensis</i> es una bacteria Gram positiva, aeróbica estricta, intracelular facultativa, parcialmente ácido resistente, no móvil, forma filamentos ramificados extensos en la mayoría de los medios de cultivo, produce un micelio aéreo de 0,3 a 1,5 mm de diámetro que se fragmenta después de cuatro días de incubación y produce células bacilares y cocoides irregulares. Se cultiva entre 30-40°C a un pH de 7,5 en medio Sabouraud o Micosel por período de 2 a 3 semanas, crece en forma de colonias con aspecto de rosetas de maíz de color blanco-amarillento. (16, 38).</p>		<i>paraguayensis</i>

Sandoval-Trujillo (32).

Las especies de nocardias causantes de la mayoría de las infecciones son: *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* y *N. brasiliensis*, las infecciones que causan son:

- a) Nocardiosis localizada,
- b) Nocardiosis sistémica,
- c) Infecciones linfocutáneas y
- d) Micetoma.

En México los micetomas por los actinomicetos representan un 98%. *N. brasiliensis* provoca generalmente abscesos subcutáneos crónicos llamados micetomas. (8, 12).

Existen dos clases de micetomas, los producidos por eumicetos u hongos verdaderos que son excepcionales en México y los producidos por actinomicetos. (33).

Los micetomas actinomicéticos son más frecuentes, constituyen el 98% de todos los casos en México.

**ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE MICETOMA.**

<b>ACTINOMICETOS</b>	<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i> <i>brasilensis</i> (86%) <i>otitis-caviarum</i>
	<i>Actinomadura</i>	<i>madurae</i> (10%) <i>pelletieri</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>somaliensis</i> <i>paraguayensis</i>

Sandoval- Trujillo (32).

La distribución geográfica de actinomicetosis es endémica en países tropicales. La incidencia más alta se observa en la India, Senegal, Somalia. En América se distribuye en México, Venezuela, Colombia y Brasil. En México se han reportado casos en los estados de: Morelos, Jalisco, Veracruz, Michoacán, Edo. de México, Guerrero y Nuevo León. (2, 13, 19).

En México los micetomas por los actinomicetos representan un 98%, el 2% restante es causado por eumicetos como *Madurella mycetomatis* y *Madurella grisae pelletieri*. (2, 9).

*N. brasiliensis* es el principal agente causal del micetoma actinomicótico en México (86% de los casos), y se presenta tanto en sujetos inmunocompetentes como en inmunocomprometidos. (13).

La distribución por sexo es más alta en el hombre que en la mujer en proporción 4:1 y más común entre la segunda y cuarta década de la vida. También la incidencia es mayor en áreas rurales, debido al tipo de ocupación, afectando a campesinos, leñadores y personas que trabajan en condiciones rudimentarias sin protección de zapatos cerrados. Los agentes etiológicos penetran por medio de una solución de continuidad, por ejemplo por espinas, astillas de madera, clavos, piedras, etc.(33, 40).

En los pacientes infectados con *Nocardia brasiliensis* se observa una celulitis pustular, localizada alrededor del área del trauma contaminada con tierra o material en descomposición. La enfermedad suele afectar principalmente miembros inferiores (pies), ocasionalmente las manos y el tronco, pero ha sido reportada en muchas otras localizaciones del cuerpo. El microorganismo probablemente penetra por implantación traumática en el tejido. Un sitio frecuentemente afectado es la planta del pie, iniciándose una pequeña hinchazón subcutánea que lentamente aumenta de volumen y se reblandece. Al romperse la superficie, se forman fístulas y el proceso va penetrando en tejidos más profundos, causando inflamación y deformación del pie. El producto de exudación de las fístulas es un líquido seropurulento, que contiene acúmulos bacterianos en estructuras llamadas gránulos de 30 a 120  $\mu\text{m}$  de diámetro. En general los micetomas actinomicóticos se caracterizan por la invasión de tejido, destrucción ósea y por hiperplasia de tejido fibroso alrededor de las fístulas. Los gránulos actinomicóticos están compuestos de filamentos miceliales entretejidos, muy delgados y con estructuras periféricas en forma de clavos. La enfermedad es de evolución crónica y los pacientes habitualmente tienen un buen pronóstico cuando son adecuadamente tratados. En las lesiones no tratadas, pueden persistir por años y

extenderse provocando así deformidad y pérdida de la función del miembro. (2, 3, 19, 31, 39).

En la infección por *Nocardia* se induce inmunidad mediada por células, así como la producción de anticuerpos del tipo Ig G durante las diferentes etapas del micetoma.(32).

No se conocen todavía los mecanismos de patogenicidad de la *Nocardia*, ni el papel que juega la respuesta inmune del hospedero durante la infección por estas bacterias.

Los estudios realizados con *Nocardia* están encaminados principalmente a tratar de explicar los mecanismos de resistencia del huésped contra esta bacteria.(8, 41).  
Se observó una reacción de hipersensibilidad retardada en pacientes infectados con esta bacteria. Posteriormente en 1962 obtuvieron un polisacárido de *N. asteroides*, el cual producía reacciones positivas en pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* aunque la reacción era menos intensa. (11).

En 1960 González-Ochoa y Sandoval, y en 1962 González-Ochoa demostraron la patogenicidad de cepas de *N. brasiliensis* aisladas de suelos al ser capaces de producir lesiones y granos en ratones después de 20-30 días. (12).

Más tarde, Macotela Ruiz y Mariat (1963) produjeron lesiones con granos al inocular ratones, hamsters y cobayos con *N. asteroides* y con *N. brasiliensis*. (32).

En 1967, González-Ochoa y Kumico-Hojyo encontraron que, después de inocular con una sola dosis de *N. brasiliensis* a ratones de

### III. ANTECEDENTES.

Nocard en 1888 reportó el primer caso conocido de una enfermedad producida por *Nocardia*, cuando la aisló de lesiones granulomatosas en bovinos. (32)

En 1943, Drake y Henrici aislaron el primer material somático de *Nocardia brasiliensis* y encontraron que producía una reacción de hipersensibilidad retardada. (32).

González-Ochoa y su grupo en 1953 aislaron un polisacárido crudo de *N. brasiliensis* que producía reacción de hipersensibilidad retardada en pacientes infectados con esta bacteria. Posteriormente en 1962 obtuvieron un polisacárido de *N. asteroides*, el cual producía reacciones positivas en pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* aunque la reacción era menos intensa. (11).

En 1960 González-Ochoa y Sandoval, y en 1962 González-Ochoa demostraron la patogenicidad de cepas de *N. brasiliensis* aisladas de suelos al ser capaces de producir lesiones y granos en ratones después de 20-30 días. (12).

Más tarde, Macotela Ruiz y Mariat (1963) produjeron lesiones con granos al inocular ratones, hamsters y cobayos con *N. asteroides* y con *N. brasiliensis*. (32).

En 1967, González-Ochoa y Kumico-Hojyo encontraron que, después de inocular con una sola dosis de *N. brasiliensis* a ratones de

laboratorio en la almohadilla plantar, se producía el típico micetoma caracterizado por la presencia de senos y granos. (13).

En la respuesta inmune celular Melendro y cols. (1977) mostraron la aparición de un estado de hipersensibilidad tardía en ratones atímicos inmunizados con un extracto purificado de *N. brasiliensis*. Estos ratones murieron más rápidamente que los ratones normales con timo, lo que sugiere que el timo ejerce un papel fundamental en la resistencia contra *Nocardia*. Folb y cols hicieron observaciones similares. (8, 22).

En 1989 Tsuboi y Yamaguchi, detectaron la presencia de proteasas extracelulares tanto en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* como Zlotnik y Buckley confirmaron los hallazgos de González-Ochoa al inocular ratones BALB/c con células vivas de *N. brasiliensis* en la almohadilla plantar. Los ratones desarrollaron micetomas los cuales variaban en tamaño y involucramiento del miembro dependiendo de la dosis y el vehículo en que se administrarán las células (salina vs. adyuvante). (41).

Rico y cols. en 1982 hicieron experimentos de transferencia pasiva de anticuerpos anti-*Nocardia* en ratones y observaron que estos no solo no protegían sino que las lesiones en los animales inmunizados pasivamente eran más graves que los que no recibieron anticuerpos. (32, 27).

Utilizando dichos antígenos, Salinas y cols, lograron estandarizar una técnica de ELISA mediante la cual, se logró

Zlotnik y cols en 1984, 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 y por el inhibidor de cisteína. (41).

Salinas y cols en 1993, encontraron mediante la técnica de zimograma tres bandas caseinolíticas, producidas por proteasas presentes en un extracto celular y en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*. (30).

En 1986 El-Zaatari y cols, lograron obtener dos anticuerpos monoclonales, estos reaccionaban cruzadamente con antígenos de micobacterias.(7).

En 1987 Angeles y Sugar estandarizaron un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos anti-*Nocardia asteroides* en el cual se encontraba la proteína de 55kDa previamente identificada como específica para esta especie. (1).

En 1989 Tsuboi y Yamaguchi, detectaron la presencia de proteasas extracelulares tanto en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* como de *N. asteroides*. (35).

Jiménez y cols en 1990, produjeron varios anticuerpos monoclonales contra antígenos somáticos de *Nocardia* en ratones BALB/c. Estos antígenos reaccionaban cruzadamente con antígenos de micobacterias. (17).

Salinas-Carmona y cols en 1992 identificaron tres antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis* los cuales fueron reconocidos por los sueros de pacientes, los tres antígenos inmunodominantes descritos fueron de un peso molecular de 24, 26 y 61 kDa. Utilizando dichos antígenos, Salinas y cols, 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*.(29, 31, 37).

Buscando posibles mecanismos de daño por nocardias Salinas y cols en 1993, encontraron mediante la técnica de zimograma tres bandas caseinolíticas, producidas por proteasas presentes en un extracto celular y en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*. (30).

#### IV. OBJETIVOS

Licón y Salinas-Carmona en 1996 aislaron y purificaron proteasas a partir del extracto celular de *N. brasiliensis* utilizando una metodología combinada de cromatografía en gel Sephadex G-100 y electroelución de geles de poliacrilamida, metodología con la cual el rendimiento de purificación de la proteasa era muy bajo y el costo elevado. (21).

Diseñar una metodología que simplifique el proceso para el aislamiento y purificación de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis*

En el presente trabajo nos propusimos diseñar una nueva metodología para aislar y purificar la proteasa extracelular, con la cual se logre aumentar el rendimiento y disminuir costos de producción.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar las proteasas intracelular y extracelular de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 utilizando dos medios de cultivo diferentes.
2. Seleccionar el medio de cultivo con el cual se obtenga un rendimiento más alto, a partir de la comparación de dos medios de cultivo: el convencional (BHI) y el diseñado por C. Rivas (medio a base de peptona de colágena).
3. Obtener el filtrado del medio de cultivo seleccionado, y aislar y purificar de este la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1.
4. Comparar el rendimiento de la proteasa extracelular y de la proteasa intracelular purificadas de los dos medios de cultivo (BHI y C. Rivas).
5. Determinar el peso molecular de la proteasa extracelular purificada de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

## IV. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

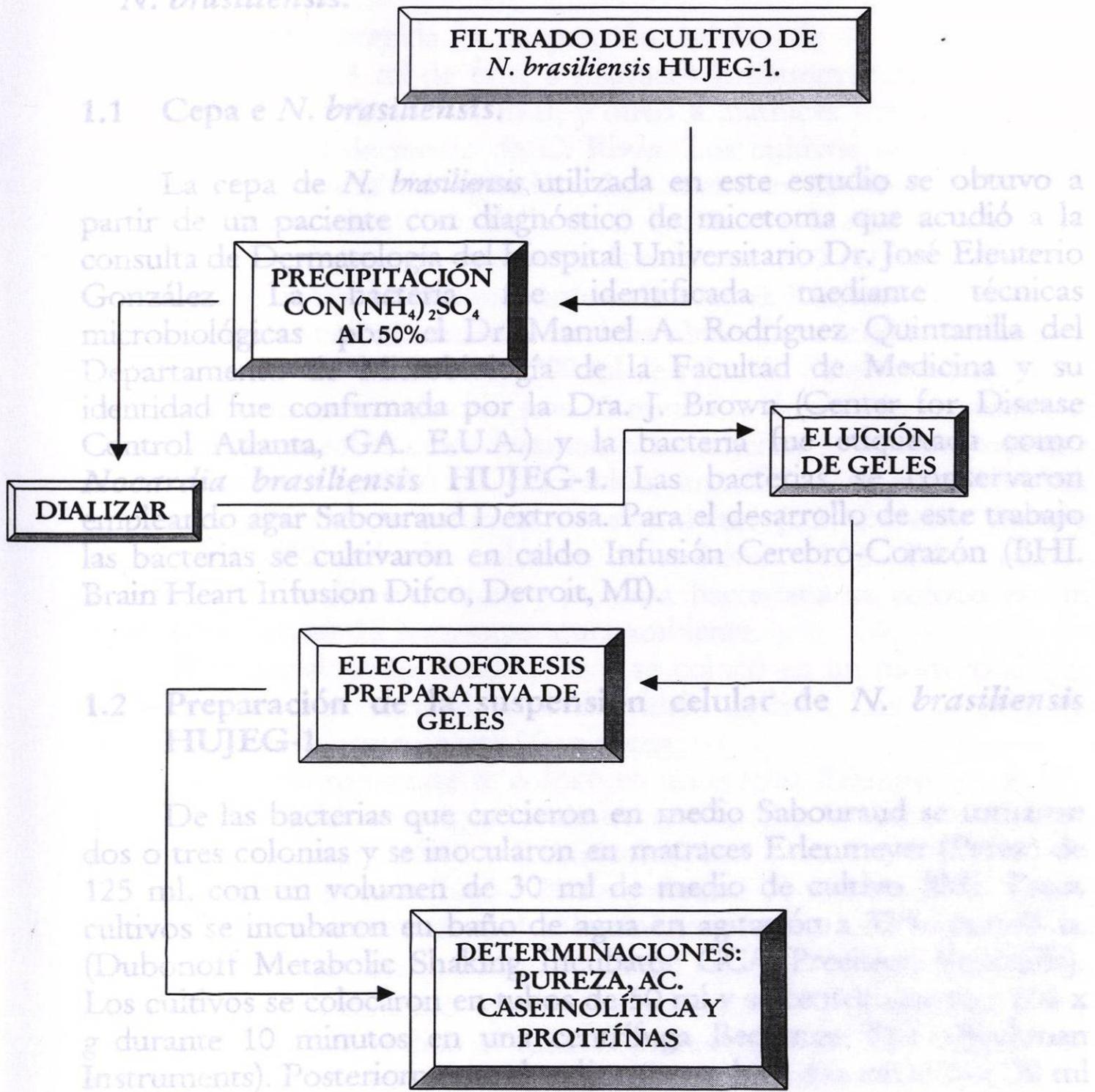
Diseñar una metodología que simplifique el proceso para el aislamiento y purificación de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1, y que además aumente el rendimiento y disminuya tanto el costo como el tiempo del proceso.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar las proteasas intracelular y extracelular de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 utilizando dos medios de cultivo diferentes.
2. Seleccionar el medio de cultivo con el cual se obtenga un rendimiento más alto, a partir de la comparación de dos medios de cultivo: el convencional (BHI) y el diseñado por C. Rivas (medio a base de peptona de colágena).
3. Obtener el filtrado del medio de cultivo seleccionado, y aislar y purificar de este la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1.
4. Comparar el rendimiento de la proteasa extracelular y de la proteasa intracelular purificadas de los dos medios de cultivo (BHI y C. Rivas).
5. Determinar el peso molecular de la proteasa extracelular purificada de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

# METODOLOGÍA DISEÑADA EN ESTE TRABAJO PARA EL AISLAMIENTO Y LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

## DIAGRAMA DE FLUJO.



de solución salina 0.85% p/v. Las bacterias se disgregaron con un agitador de vidrio y se

## V. METODOLOGÍA

### 1.3 Obtención del extracto celular crudo y del filtrado de

## **1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CELULAR CRUDO DE *N. brasiliensis*.**

Una vez obtenida la suspensión celular de *N. brasiliensis*, se inocularon con 0.4 ml de ésta, 8 matraces Erlenmeyer de 1 litro con

**1.10 Cepa e *N. brasiliensis*.** BHI, y otros 8 matraces Erlenmeyer de 1 litro con 160 ml de medio de C. Rivas. Los cultivos se incubaron a

37°C La cepa de *N. brasiliensis* utilizada en este estudio se obtuvo a partir de un paciente con diagnóstico de micetoma que acudió a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. La bacteria fue identificada mediante técnicas microbiológicas por el Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y su identidad fue confirmada por la Dra. J. Brown (Center for Disease Control Atlanta, GA. E.U.A.) y la bacteria fue etiquetada como *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. Las bacterias se conservaron empleando agar Sabouraud Dextrosa. Para el desarrollo de este trabajo las bacterias se cultivaron en caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI. Brain Heart Infusion Difco, Detroit, MI).

El material deslipidizado y seco se colocó en un mortero al que

### **1.2 Preparación de la suspensión celular de *N. brasiliensis* HUJEG-1.**

La mezcla resultante se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con

De las bacterias que crecieron en medio Sabouraud se tomaron dos o tres colonias y se inocularon en matraces Erlenmeyer (Pyrex) de 125 ml, con un volumen de 30 ml de medio de cultivo BHI. Estos cultivos se incubaron en baño de agua en agitación a 37°C por 48 h, (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific). Los cultivos se colocaron en tubos de 50 ml y se centrifugaron a 166 x g durante 10 minutos en una centrífuga Beckman TJ-6 (Beckman Instruments). Posteriormente el sedimento se lavó dos veces con 30 ml

de *N. brasiliensis*.

de solución salina 0.85% p/v. Las bacterias se disgregaron con un agitador de vidrio y se resuspendieron en 10 ml de solución salina.

### 1.3 Obtención del extracto celular crudo y del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

Una vez obtenida la suspensión celular de *N. brasiliensis*, se inocularon con 0.4 ml de ésta, 8 matraces Erlenmeyer de 1 litro con 160 ml de medio de cultivo BHI, y otros 8 matraces Erlenmeyer de 1 litro con 160 ml de medio de C. Rivas. Los cultivos se incubaron a 37°C por 1 semana sin agitación. Los matraces se decantaron para separar el medio de cultivo de la masa bacteriana, la cual se recuperó en matraces Erlenmeyer para luego lavarla con 500 ml agua destilada estéril en un embudo Büchner sobre un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. La masa bacteriana obtenida se secó y deslipidizó. Para lograr esto se adicionaron 200 ml de solución de etanol-éter etílico (1:1), y se colocó en agitación por 10 minutos, al cabo de los cuales el sobrenadante se retiró cuidadosamente. Lo anterior se realizó hasta que el sobrenadante perdió la coloración amarilla. Posteriormente se agregaron 200 ml de solución de etanol-éter (1:2) 2 veces más, y finalmente 200 ml de solución etanol-éter (1:3). Este último deslipidizado se filtró a vacío y la masa bacteriana se colocó en un desecador durante 12 h a temperatura ambiente.

El material deslipidizado y seco se colocó en un mortero al que se le agregó una cantidad igual de vidrio molido. Las bacterias se trituraron mecánicamente por 90 minutos.

La mezcla resultante se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 300 ml del amortiguador de extracción Tris-HCl 0.1 M pH 6.5 (apéndice B), en agitación a 4°C durante 12 h.

La mezcla se centrifugó a 200 x g durante 30 minutos para retirar el vidrio y bacterias intactas, el sobrenadante se recolectó y se filtró a través de una membrana Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro, mientras que el sedimento se resuspendió en 300 ml del amortiguador de extracción y se realizó el mismo procedimiento 2 veces más. El material de las tres extracciones corresponde al extracto celular crudo de *N. brasiliensis*.

Mientras tanto ambos medios de cultivo se filtraron por separado a través de una membrana Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro con un embudo Büchner sobre un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío. Los filtrados se trataron posteriormente con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido al 50%, se separó el sobrenadante del precipitado, el sobrenadante se dializó exhaustivamente.

## 2. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MAYOR RENDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

Se tomaron alícuotas de los filtrados y de los extractos de cultivo de ambos medios BHI y C. Rivas para determinarles el contenido de proteínas y la actividad caseinolítica, esto con el fin de seleccionar el medio con el que se obtenga mayor rendimiento de proteasa. La fracción restante de cada uno se liofilizó.

### 2.1 Determinación de Proteínas Totales (Método Bradford).

La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford realizando una curva de calibración con una solución de albúmina sérica bovina. Las soluciones estándares de concentraciones entre 2 y 18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , fueron preparadas a partir de un patrón de concentración 1  $\text{mg}/\text{ml}$ . Se colocaron 0.25 ml de muestra en presencia de 0.25 ml del reactivo de Bradford (apéndice B) por 25 minutos a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro DU-6 (Beckman Instruments). (4).

### 3.2 Precipitación de Proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%.

#### 2.2 Zimograma de punto para determinar actividad caseinolítica de extractos celulares y filtrados de cultivo de los medios BHI y C. Rivas.

Se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra sobre un gel-sustrato (ver tabla 1) de poliacrilamida con caseína al 0.114% p/v, se incubó a 37°C durante 90 minutos en cámara húmeda. Después se tiñó el gel con solución de azul de Coomassie R-250 0.1% p/v. Después se colocó el gel en solución desteñidora (apéndice B) por 1-2 hrs, se observaron los puntos donde hubo hidrólisis como zonas sin teñir, y de esta manera se detectó la actividad caseinolítica. La preparación del gel se realizó de acuerdo a la tabla 1.

### 3. OBTENCIÓN DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

Se inocularon 40 matraces de 1 litro con 160 ml del medio de cultivo C. Rivas con 0.4 ml de suspensión unicelular de *N. brasiliensis*, se incubaron a 37°C durante 7 días, sin agitación. Después de la incubación se separó la masa bacteriana del medio de cultivo por decantación. El medio de cultivo agotado se filtró a vacío con papel Millipore 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

#### 3.1 Ultrafiltración del Filtrado de Cultivo.

El filtrado pasa a través de una manguera con la ayuda de una bomba peristáltica, la manguera está conectada a un cartucho (Capillary Flow Dializer CF-15 Model, BAXTER) por el cual el filtrado se ultrafiltró y se concentró hasta un volumen aproximado de 100 ml. (Ver Fig. 1).

### 3.2 Precipitación de Proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50%. 2.7% C.

El filtrado luego de ser concentrado se llevó a precipitación para la eliminación de proteínas contaminantes con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido, en una relación de 314g por litro de filtrado de cultivo, luego se colocó en agitación a 4°C por dos horas. Posteriormente se centrifugó y se separó el precipitado del sobrenadante, y este último se llevó a dializar exhaustivamente contra agua destilada. Se tomó una alícuota del filtrado concentrado y el resto se liofilizó.

#### 4.2.3 Desarrollo de la electroforesis en gel SDS-PAGE en gradiente 8-18%.

## 4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL FILTRADO CONCENTRADO DE CULTIVO DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

### 4.1 Determinación de proteínas totales (Método Bradford).

La determinación de proteínas se realizó mediante El Método de Bradford, al igual que en el punto 2.1.

### 4.2 Electroforesis en gel SDS-PAGE en gradiente 8-18%T en condiciones desnaturalizantes.

#### 4.2.1 Preparación del gel de corrimiento en gradiente 8-18%T, 2.7%C.

Una vez terminada la electroforesis se desensamblaron las placas de vidrio. Para el análisis de las diferentes bandas proteicas del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*, se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli (6, 15, 20), con un gel de empaquetamiento al 4% T, 2.7% C, y un gel de corrimiento en gradiente 8-18% T, 2.7% C. La preparación de este último se efectuó en base a los datos presentados en la tabla 2. Se utilizó un formador de gradiente (BIO-RAD) y una bomba peristáltica Microperpex 2132 (LKB) para preparar el gel, el cual se dejó polimerizar durante 1 h colocando agua destilada sobre la superficie del gel formando una interfase SDS. Enseguida el gel se colocó en la solución oxidante por 5 minutos y en agitación, para después lavar 3 veces con

#### 4.2.2 Preparación del gel de empaquetamiento 5% T, 2.7% C.

Antes de colocar el gel de empaquetamiento se secó con papel filtro y se colocó el peine de teflón con los carriles deseados. La preparación de este gel se efectuó en base a los datos presentados en la tabla 3.

Después de polimerizado el gel, se sacó el peine y se lavaron los pozos con agua destilada.

#### 4.2.3 Desarrollo de la electroforesis en gel SDS-PAGE en gradiente 8-18%.

El gel se montó en el sistema de electroforesis Mini-Protean II (BIO-RAD) y se aplicó el amortiguador de corrimiento en la cámara. El gel se precorrió a 50 V por 20 minutos con ayuda de una fuente de poder modelo 1000-500 (BIO-RAD). Antes de aplicar el gel, las muestras fueron tratadas con amortiguador de muestra 4X (apéndice B) y se sometieron a ebullición por 2 minutos. Las muestras se aplicaron cuidadosamente en cada carril con una pipeta automática. La electroforesis se realizó a 80 V hasta que el frente de corrida alcanzó al gel de corrimiento, y entonces se aumentó el voltaje a 150 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel (tablas 2 y 3).

#### 4.2.4. Tinción de Coomassie (Weber K & Osborn M).

Una vez terminada la electroforesis se desensamblaron las placas de vidrio y el gel se colocó en un recipiente con solución de azul de Coomassie por 30 minutos. Posteriormente el gel se destiñó con solución desteñidora (apéndice B) por 1-3 horas.

#### 4.2.5. Tinción con $\text{AgNO}_3$ (Merril C. R.).

El gel recién corrido se sumergió en solución fijadora por 20 minutos, y luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos con solución de lavado para eliminar el SDS. Enseguida el gel se colocó en la solución oxidante por 5 minutos y en agitación, para después lavar 3 veces con

agua destilada por 10 minutos. Posteriormente el gel se colocó en la solución de  $\text{AgNO}_3$  y se irradió durante 5 minutos con luz intensa y se mantuvo 25 minutos a la luz normal. Las bandas se visualizaron al ser reveladas con solución reveladora deteniendo la reacción con ácido acético 1% (apéndice B).

## 5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

5.2.2. Se utilizó la técnica de zimograma para hacer el seguimiento de la actividad caseinolítica. Se usaron dos variantes de zimograma, una mediante la técnica descrita por Pérez Montfort y col (25), y la otra desarrollada en este laboratorio para observar la actividad enzimática total de las muestras (zimograma de punto).

### 5.1 Zimograma de punto del filtrado concentrado del cultivo C. Rivas.

#### 5.1.1. Preparación del gel sustrato.

La preparación se efectuó de acuerdo a los datos presentados en la tabla 1.

#### 5.1.2. Desarrollo del zimograma de punto.

Se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra sobre un gel-sustrato de poliacrilamida con caseína al 0.114% p/v (Tabla 1).. Se incubó a 37°C durante 90 minutos en cámara húmeda. Después se tiñó el gel con solución de azul de Coomassie R-250 0.1% p/v. Después se destiñó y se observaron los puntos donde hubo hidrólisis como zonas sin teñir, y de esta manera se detectó la actividad caseinolítica.

## **5.2. Zimograma de contacto del filtrado concentrado del medio C. Rivas.**

### **5.2.1. Preparación del gel al 12% sin SDS y sin 2-mercaptoetanol.**

Para no alterar la actividad caseinolítica de las muestras durante la electroforesis, se usaron sin tratamiento con SDS, 2-mercaptoetanol o calor. Los geles fueron lineales y en forma discontinua (24). La preparación y la electroforesis se hizo conforme a los datos de las tablas 4 y 5.

### **5.2.2. Desarrollo de la electroforesis del gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturalizantes.**

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 V por 2 horas y media o hasta que el frente del colorante alcance 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 (apéndice B).

Se utilizaron marcadores de peso molecular conocido (SIGMA Chemical Co. MW-ND Kit)  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), albúmina de huevo (45 KDa) albúmina de suero bovino (66 KDa). Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en amortiguador Tris-HCl 0.1 M con  $\text{CaCl}_2$  10mM pH 7.4 a temperatura ambiente por 15 minutos para estabilizar el pH.

### **5.2.3. Preparación del Gel-Sustrato para zimograma de contacto.**

Se preparó un gel al 7.5% T de Acrilamida-Bisacrilamida que contiene caseína como sustrato, el cual se preparó según se indica en el punto 5.1.1.

### **5.2.4. Desarrollo del zimograma de contacto del filtrado concentrado del medio C. Rivas.**

La migración de la proteasa extracelular en el gel preparativo, se cortó la banda correspondiente con ayuda de una hoja de bisturí y el gel se fragmentó en trozos.

El gel obtenido en la sección 5.2.2. se retiró del amortiguador y se empalmó sobre el gel-sustrato a manera de sandwich y ambos geles se incubaron en una cámara húmeda por 3 horas a 37°C. Después de la incubación los geles se separaron y se tiñeron con azul de Coomassie. (30).

## 6. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

### 6.1 Electroforesis preparativa en gel PAGE al 12% sin SDS.

Se preparó un gel al 12%, sin SDS y sin  $\beta$ -mercaptoetanol de 3mm de grosor con un gel concentrador al 5% y como amortiguador de corrimiento Trisma base 50 mM, glicina 384 mM. Se aplicó un volumen equivalente a 3 mg de proteínas del filtrado y la electroforesis se lleva a cabo según se describió previamente. (24).

### 6.2 Identificación de la actividad caseinolítica.

Para identificar la posición en la que migra la proteasa o proteasas en el gel preparativo, se utilizó la técnica de zimograma de contacto. Una vez concluida la electroforesis del gel preparativo, se cortaron verticalmente los extremos izquierdo y derecho, así como una pequeña sección central, estas se colocaron sobre un gel-sustrato para llevar a cabo el zimograma, mientras que las porciones intactas del gel se congelaron inmediatamente a -20°C. Se tiñó el gel-sustrato y las tiras del gel preparativo con Azul de Coomassie, se observó luego de desteñir el gel la inhibición de la banda de hidrólisis de la proteasa sobre el gel-sustrato.

### 6.3 Elución Mecánica.

Luego de determinar el sitio de migración de la proteasa extracelular en el gel preparativo, se cortó la banda correspondiente con ayuda de una hoja de bisturí y el gel se fragmentó en trozos

pequeños y se colocaron en un vaso de precipitado de 10 ml al que se le agregaron 3 ml de agua destilada y se dejó agitando a 4°C durante 18 h. El sobrenadante que se recuperó, se dializó contra agua destilada por 12 h. El dializado se colocó en viales de vidrio en alícuotas de 15 ml, los cuales fueron liofilizados. (Liofilizadora FREEZE MOBILE VIRTIS).

#### 6.4 Determinación de la actividad caseinolítica de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

Del sobrenadante que se recuperó, se tomó una alícuota a la cual se le determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford, y su actividad enzimática se determinó mediante un zimograma de punto.

#### 6.5 Determinación del Grado de pureza de la Proteasa Extracelular de *N. brasiliensis* en un gel PAGE con SDS 8-18%, teñido con AgNO<sub>3</sub>.

Parte de la alícuota tomada del eluido se utilizó para determinar el grado de pureza mediante un gel PAGE en condiciones desnaturizantes en gradiente 8-18%, el cual se tiñó con Coomassie y posteriormente con nitrato de plata de acuerdo a las técnicas previamente explicada.

### 7. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

Para determinar el peso molecular de la proteasa, se utilizó la electroforesis en gel 12% (midiendo el Rf) y la cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-100).

## 7.1 Determinación del Peso Molecular mediante electroforesis en gel 12% en condiciones desnaturalizantes.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%T en condiciones no desnaturalizantes, usando como buffer de corrimiento Tris-OH 0.025 M, 0.12 M glicina a un pH 8.3 sin SDS. Posteriormente se realizó una curva de los Rf de diferentes proteínas contra sus pesos moleculares conocidos, las cuales se trataron en las mismas condiciones que la muestra. Las proteínas empleadas como marcadores de peso molecular son:  $\beta$ -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). Marcadores proteicos (MW-ND-500 Kit SIGMA Chemical Company) (30).

## 7.2 Cromatografía de filtración en gel (SEPHADEX G-100).

Se utilizó una columna de cromatografía de 22 cm de longitud X300 mm de diámetro con llave de teflón (Wheaton Scientific 265134); la cual se empaquetó con Sephadex G-100 (Farmacia) en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M, pH 7.4.

Se reguló la velocidad de flujo a 0.5 ml por minuto y se recolectaron fracciones de 2ml. 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 estuvo 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 PM (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 citrocromo 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 eluido fue mayor. Se realizó una curva tipo, en la cual se graficó  $V_e/V_o$  (abscisa) y PM (ordenada) en papel semilogarítmico.

Para determinar el PM de la proteasa del filtrado, se pasaron a través de la columna 20mg/ml del eluido y se recolectaron fracciones de 2ml. A las fracciones obtenidas se les determinó la absorbancia a 280 nm y también el contenido de proteínas por el método de Bradford; posteriormente fueron liofilizadas.

El  $V_e/V_o$  de las fracciones en las que se encontró la actividad enzimática y mayor concentración de proteínas, se extrapolo en la curva estándar y de esta manera se determinó el PM de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis*. (21, 30).

Tabla 6. Rendimiento de masa bacteriana de *N. brasiliensis* HJEG-1 en dos medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	g de masa bacteriana húmeda	g de masa bacteriana seca
C. Rivas	42.9	4.5
BHI (Difco)	25.2	2.2

Con este resultado encontramos que en el medio de cultivo de C. Rivas la masa bacteriana fue mayor casi en un 100% comparada con la del medio BHI.

## 2. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MAYOR RENDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR.

### 2.1 Cuantificación de proteínas totales en extractos y filtrados de cultivo de *N. brasiliensis* HJEG-1. (Método Bradford).

El contenido de proteínas totales de los extractos celulares y filtrados de cultivos de ambos medios empleados se muestra en la Tabla 7.

## VI. RESULTADOS

Tabla 7. Rendimiento de proteínas totales de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en dos medios de cultivo diferentes.

### 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CELULAR CRUDO DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

El rendimiento de la masa bacteriana de *N. brasiliensis* en 1280 ml del medio de cultivo BHI y en 1280 ml de medio de cultivo a base de peptona de colágena, se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento de masa bacteriana de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en dos medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	g de masa bacteriana húmeda	g de masa bacteriana seca
C. Rivas	42.9	4.5
BHI (Difco)	25.2	2.2

Con este resultado encontramos que en el medio de cultivo de C. Rivas la masa bacteriana fue mayor casi en un 100% comparada con la del medio BHI.

### 2. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MAYOR RENDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR.

#### 2.1 Cuantificación de proteínas totales en extractos y filtrados de cultivo de *N. brasiliensis* HUJEG-1. (Método Bradford).

El contenido de proteínas totales de los extractos celulares y filtrados de cultivos de ambos medios empleados se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7. Rendimiento de proteínas totales de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en dos medios de cultivo diferentes.**

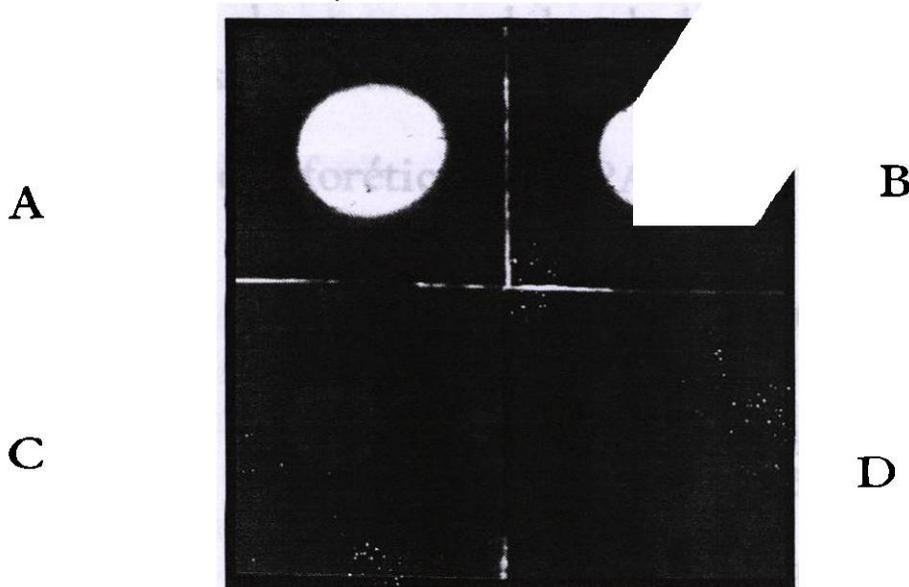
MEDIO	FUENTE	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS
Medio a base de peptona de colágena.	Extracto crudo celular.	690 $\mu\text{g/ml}$
	Filtrado de cultivo.	500 $\mu\text{g/ml}$
BHI (Difco).	Extracto crudo celular.	625 $\mu\text{g/ml}$
	Filtrado de cultivo.	470 $\mu\text{g/ml}$

Se puede observar que el rendimiento de proteínas totales en los dos medios de cultivo fue mayor en el extracto celular que en el filtrado de cultivo al comparar ambos medios de cultivo con la misma fuente.

## 2.2 Determinación de la Actividad Enzimática:

En la determinación de la actividad enzimática utilizando caseína como sustrato en el zimograma se puede observar (Fig. 2) que tanto en el extracto celular como en el filtrado de *N. brasiliensis* cultivada en el medio a base de peptona de colágena, el tamaño de la zona hidrolizada resulta superior al obtenido en condiciones similares con el medio de cultivo BHI.

**Fig. 2. Zimograma: nto.**



**A) Extracto crudo celular (C. Rivas). B) Filtrado de cultivo (C. Rivas).  
C) Extracto crudo celular. (BHI). D) Filtrado de cultivo (BHI).**

#### **4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.**

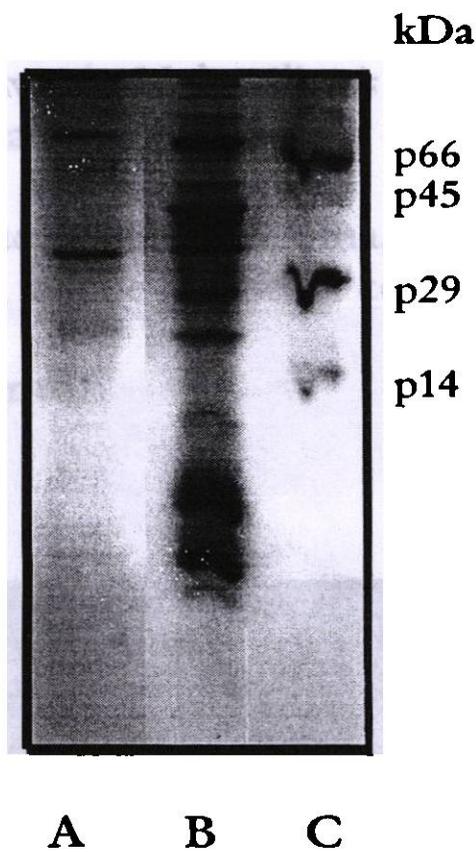
##### **4.1 Determinación de Proteínas Totales (Método Bradford):**

El contenido de proteínas totales según el método Bradford en la muestra del medio de cultivo concentrado fue de 500  $\mu\text{g/ml}$ , dado que se tienen 110 ml por cosecha, el contenido global en esta es de 55 mg.

## 4.2 Patrón electroforético.

Una alícuota de esta, se analizó electroforéticamente, comparándose con el extracto celular de la bacteria en C. Rivas. El resultado obtenido se presenta en la Figura 3.

**Fig. 3. Análisis electroforético SDS-PAGE en gradiente 10-18%**



**Carril A:** Filtrado de cultivo. (C. Rivas). **Carril B:** Extracto Celular. (C. Rivas). **Carril C:** Marcadores.

En el carril A se observaron tres bandas proteicas: la primera de peso molecular arriba de 66 KDa, la segunda de peso molecular de 61 KDa y la tercera de peso molecular de aproximadamente 35 KDa.

En el carril B donde se colocó el extracto celular se observó mayor número de bandas proteicas, lo que indica que el extracto es mucho más rico en proteínas. En el carril C se observan los marcadores de peso molecular.

## 5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS FILTRADOS DE CULTIVO DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

### 5.1 Zimograma de punto de los filtrados de cultivo (BHI y C. Rivas).

La actividad enzimática sobre el sustrato a base de caseína fue mayor en el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* cultivada en el medio a base de peptona de colágena como se observa en la sección A de la Figura 4.

En el gel sustrato que contiene caseína, la hidrólisis se observa como un halo transparente, ya que la caseína contenida fue degradada.

Fig. 4. Zimograma de punto.



A

B

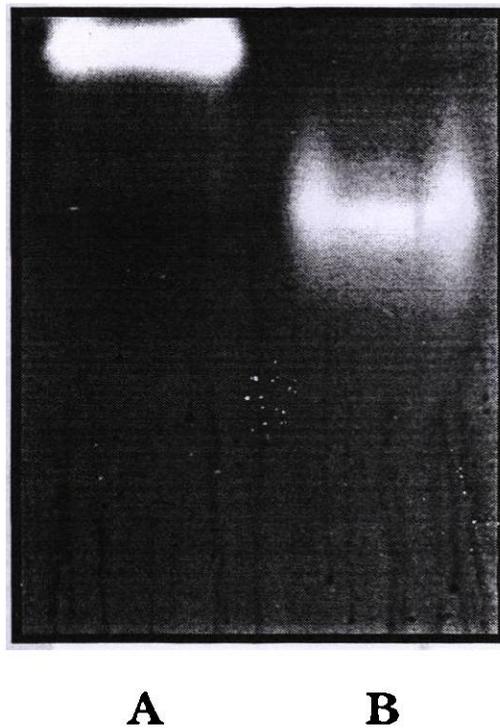
A) Filtrado de cultivo C. Rivas.

B) Filtrado de cultivo BHI.

## 5.2 Zimograma de contacto:

En el zimograma de contacto que se muestra en la fig. 5 resulta evidente que el área de lisis producida por la actividad caseinolítica obtenida del filtrado de cultivo tiene una posición diferente al área de lisis obtenida con el extracto celular. La diferencia es de 2 cm de distancia entre las dos bandas. La diferencia indica que la proteasa del filtrado con respecto a la proteasa del extracto celular no tiene las mismas características ni de peso molecular, ni de actividad enzimática.

**Fig. 5. Zimograma de contacto.**



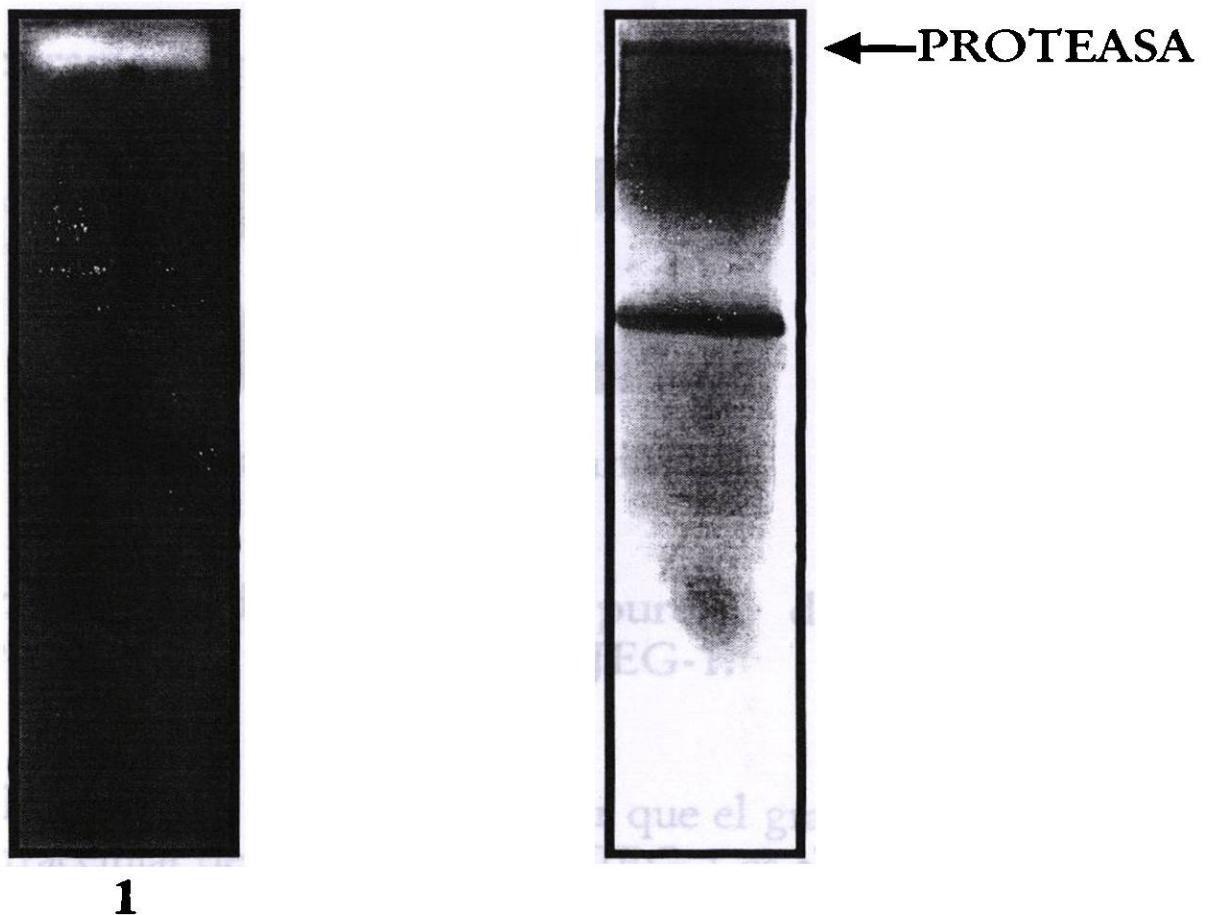
- A) Filtrado de cultivo (medio a base de peptona de colágena).
- B) Extracto crudo celular (medio a base de peptona de colágena).

## 6. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

### 6.1 Electroforesis Preparativa.

En la sección 2 de la fig. 6 se observa la banda de la proteasa en la parte superior de la tira del gel preparativo, además de una banda proteica muy concentrada y otra banda muy marcada, y en la sección 1 se muestra la actividad caseinolítica de la proteasa en la tira del zimograma de contacto.

Fig. 6. Electroforesis Preparativa



1. Tira del zimograma de contacto.
2. Tira del gel, contraparte del zimograma

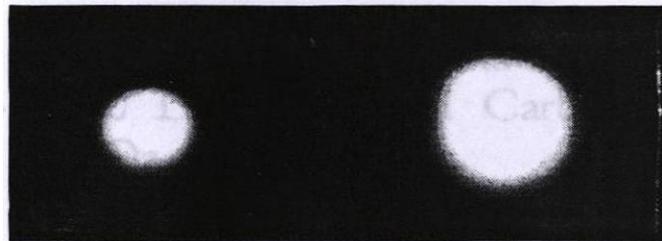
## 6.2 Determinación de proteínas (Método Bradford):

El contenido de proteínas del eluido extraído fue de: 1050  $\mu\text{g/ml}$ , aproximadamente la tercera parte de las proteínas del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* HUJEG-1, que se colocaron en el gel para la electroforesis preparativa.

## 6.3 Determinación de la Actividad Enzimática:

Se observa claramente en la figura 7 el zimograma donde el eluido (5 $\mu\text{l}$  y 10 $\mu\text{l}$ ) mostró actividad de hidrólisis sobre la caseína, lo que prueba que la proteasa purificada conserva su actividad caseinolítica.

Fig. 7. Zimograma de punto

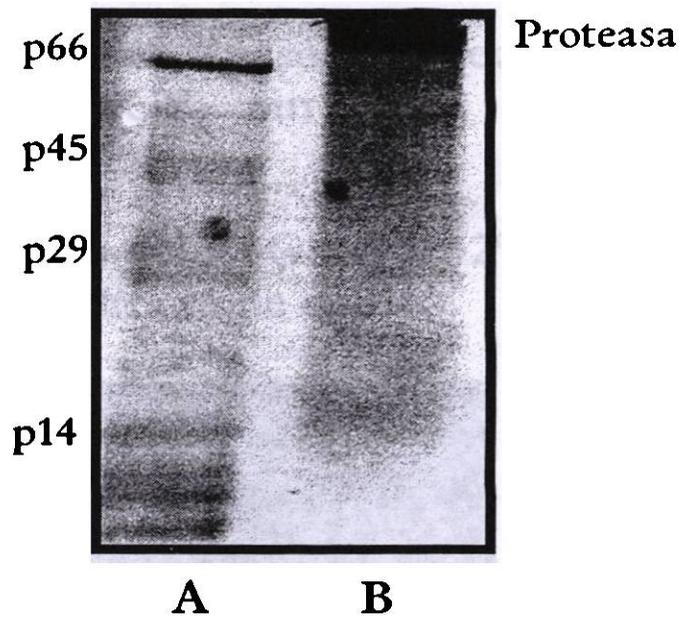


Proteasa extracelular purificada.

## 6.4 Determinación del grado de pureza de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

En el gel de la fig. 8 se puede observar que el grado de pureza de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1 es alto, ya que en el carril B la banda se observa en muy concentrada y se observan otras bandas muy discretas lo que indica que están presentes en muy bajas concentraciones.

**Fig. 8. Electroforesis analítica. Gel SDS-PAGE en gradiente 8-18%.**

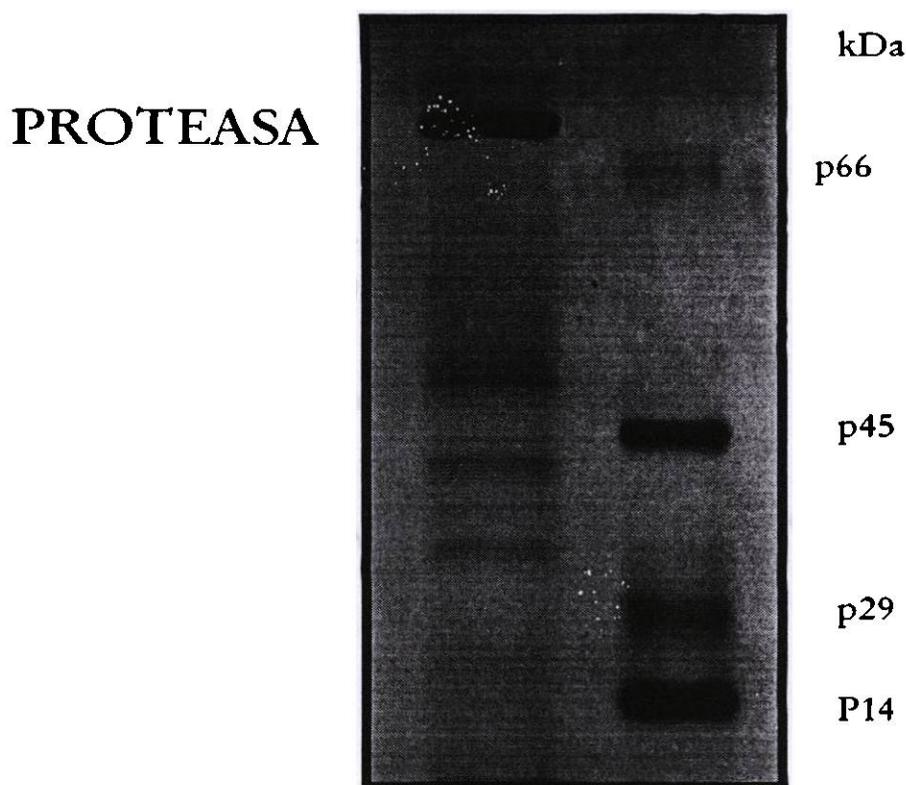


**A) Marcadores:** Albúmina Sérica Bovina PM 66 000 Da, Albúmina de Huevo PM 45 000 Da, Anhidrasa Carbónica 29 000 Da y  $\alpha$ -Lactoalbúmina 14 200 Da. **B) Eluido.**

## 7. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA PROTEASA EXTRACELULAR PURIFICADA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

### 4.1 Determinación del peso molecular mediante una electroforesis PAGE sin SDS en condiciones no desnaturizantes.

Fig. 9. Electroforesis en gel PAGE A al 12% en condiciones no desnaturizantes del filtrado de cultivo.

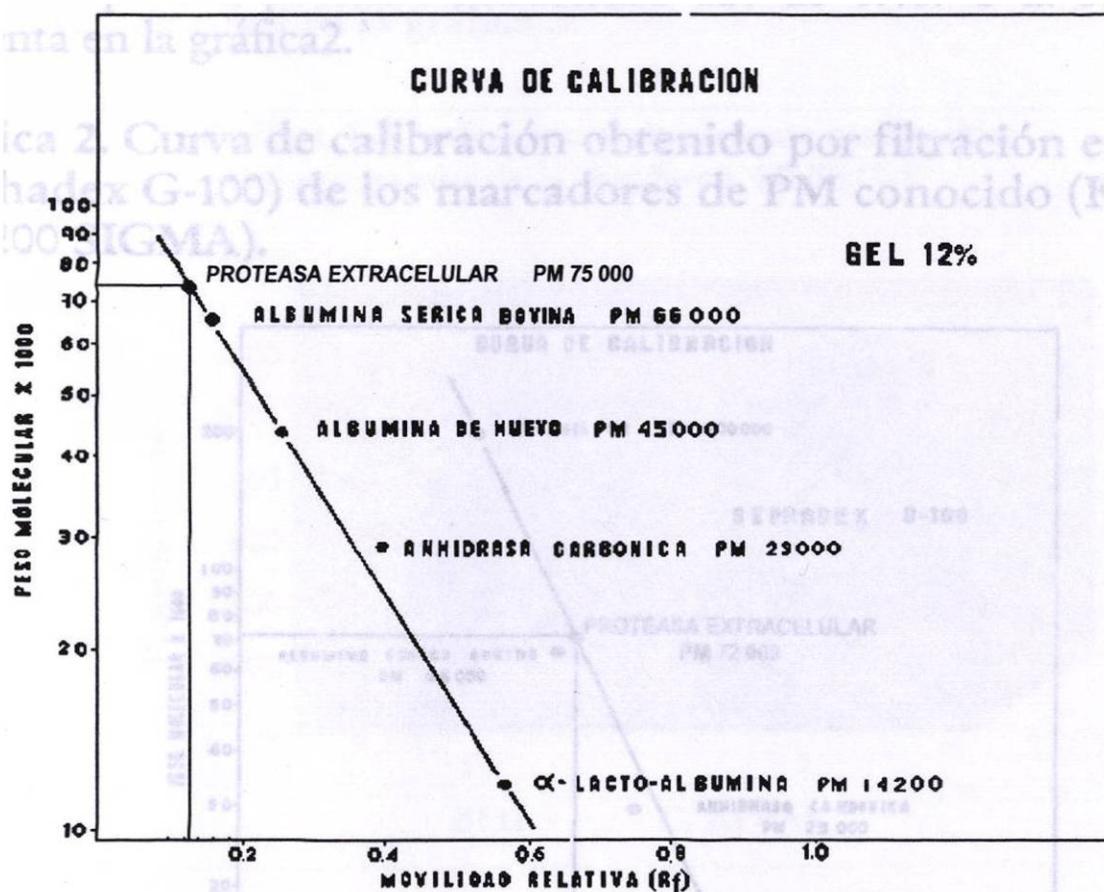


A) Filtrado de cultivo.  
C) Marcadores.

En el carril A de la fig. 9 se muestra la banda de la proteasa en la parte superior del gel, lo que indica que la proteasa tiene un peso molecular por arriba de los 66 000 Da, de acuerdo con los estándares de peso molecular del carril B.

A partir de la curva de calibración obtenida de los pesos moleculares de 4 marcadores: Albúmina Sérica Bovina PM 66 000 Da, Albúmina de Huevo PM 45 000 Da, Anhidrasa Carbónica 29 000 Da y  $\alpha$ -Lactoalbúmina 14 200 Da. Se determinó el Rf de la banda de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis*, el cual fue de 0.122. Gráfica 1.

**Gráfica 1. Curva de calibración obtenida por electroforesis en gel 12% en condiciones no desnaturalizantes, de las proteínas de PM conocido (Kit MW-ND-500 SIGMA).**

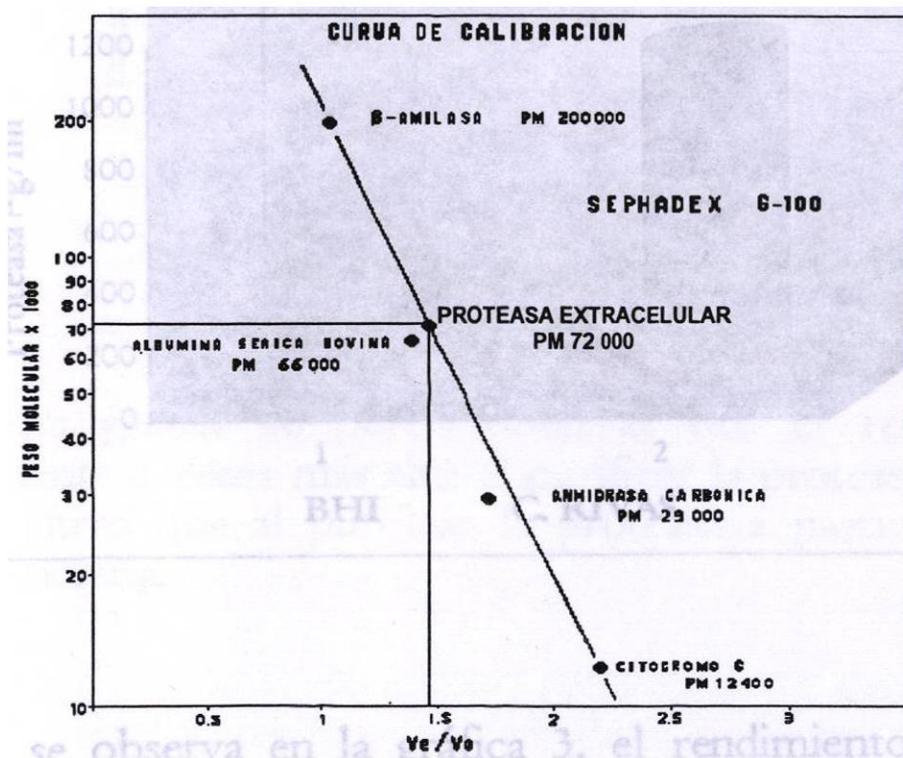


De acuerdo a la curva de calibración de la gráfica 1., el peso molecular de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* es de 75 000 Da.

## 7.2 Determinación del peso molecular de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1 por Filtración en gel.

De la filtración en gel (Sephadex G-100) de las proteínas de peso molecular ya conocido:  $\beta$ -amilasa PM 200 000 Da, Albúmina Sérica Bovina PM 66 000 Da, Anhidrasa Carbónica PM 29 000 Da y Citocromo C PM 12 400 Da. El valor del  $V_0$  de la columna fue de 34ml y el  $V_e$  de la proteasa fue de 49.7ml, por lo que el  $V_e/V_0$  obtenido para la proteasa extracelular fue de 1.46. Y la curva de se presenta en la gráfica2.

Gráfica 2. Curva de calibración obtenido por filtración en gel (Sephadex G-100) de los marcadores de PM conocido (Kit MW-GF-200 SIGMA).

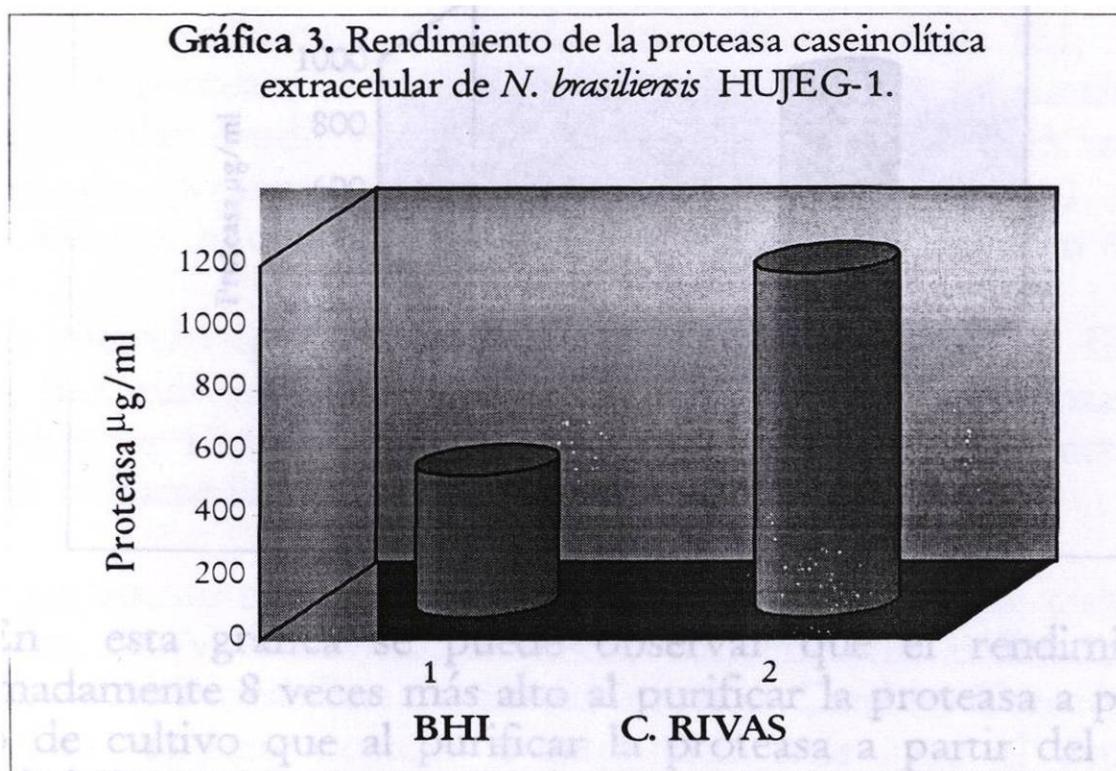


El Peso Molecular obtenido para la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1, de acuerdo a esta curva de calibración es de 72 000 Da, peso aproximado al que se obtuvo mediante electroforesis analítica.

## 8. RENDIMIENTO DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1 A PARTIR DEL FILTRADO DEL MEDIO DE CULTIVO C. RIVAS.

### 8.1 Comparación entre los dos medios de cultivo: el medio BHI y el medio a base de peptona de colágena (C. Rivas).

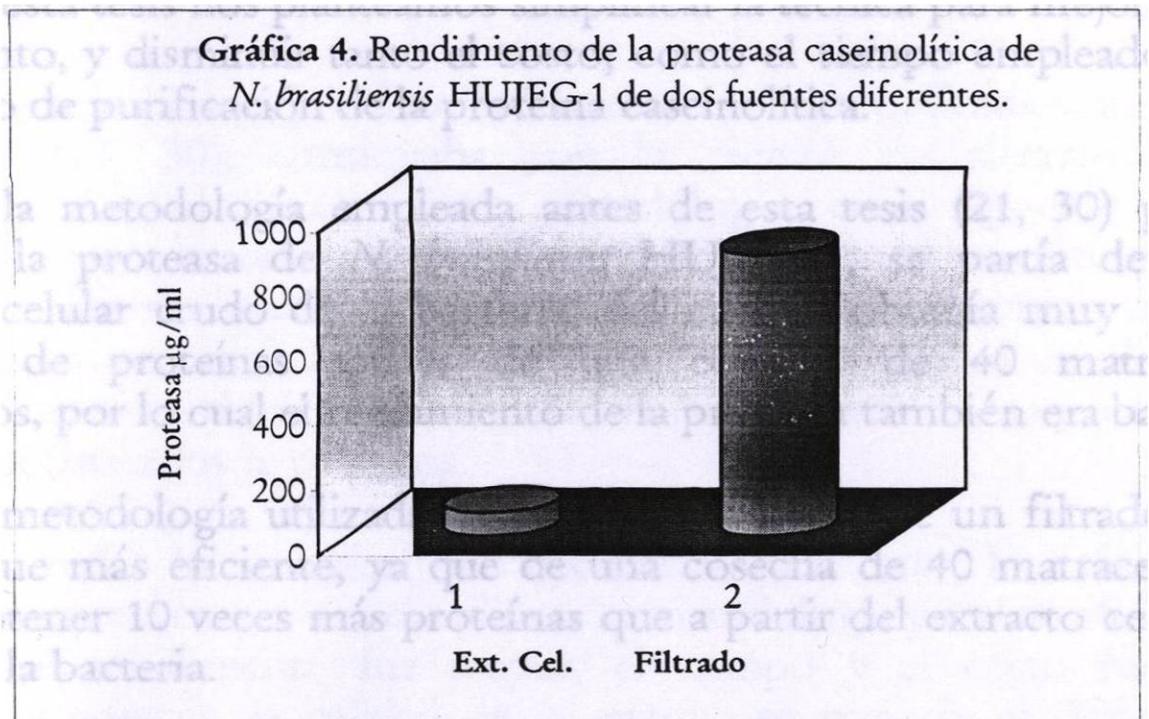
Los resultados obtenidos del rendimiento de purificación de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* a partir de los dos medios de cultivo se muestran en la gráfica 3.



Como se observa en la gráfica 3, el rendimiento a partir del medio de cultivo a base de peptona de colágena (C. Rivas) es mayor que el obtenido a partir del medio convencional (BHI), por más del doble.

## 8.2 Rendimiento a partir del Extracto Crudo Celular y del Filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* HUJEG-1 cultivada en medio a base de peptona de colágena (C. Rivas).

Se compararon los rendimientos de proteasa obtenidos tanto a partir del extracto celular, como del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*, los resultados se muestran en la Gráfica 4.



En esta gráfica se puede observar que el rendimiento es aproximadamente 8 veces más alto al purificar la proteasa a partir del filtrado de cultivo que al purificar la proteasa a partir del extracto celular de la bacteria.

## VII. DISCUSIÓN

La metodología utilizada para aislar y purificar proteasas de *N. brasiliensis* hasta la fecha se realizaba de acuerdo a técnicas que implicaban un costo elevado, y el rendimiento obtenido resultaba bajo (21, 30).

En esta tesis nos planteamos simplificar la técnica para mejorar el rendimiento, y disminuir tanto el costo, como el tiempo empleado en el proceso de purificación de la proteína caseinolítica.

En la metodología empleada antes de esta tesis (21, 30) para purificar la proteasa de *N. brasiliensis* HUIJEG-1, se partía de un extracto celular crudo de la bacteria, del cual se obtenía muy poca cantidad de proteínas totales de una cosecha de 40 matraces inoculados, por lo cual el rendimiento de la proteasa también era bajo.

La metodología utilizada en esta tesis, a partir de un filtrado de cultivo, fue más eficiente, ya que de una cosecha de 40 matraces se logró obtener 10 veces más proteínas que a partir del extracto celular crudo de la bacteria.

Además, anteriormente se utilizaba como medio de cultivo para la cosecha de *N. brasiliensis*, el medio convencional utilizado para el crecimiento de Nocardias: medio de Infusión Cerebro-Corazón (BHI), que resulta ser muy costoso y esto hacía más caro el proceso de purificación de la proteína caseinolítica.

Al emplear el medio de cultivo recientemente diseñado por C. Rivas (medio a base de peptona de colágena), como medio usado para la cosecha de *N. brasiliensis*, se demostró que en este medio la bacteria aumenta su producción de proteínas caseinolíticas, lo que favoreció el aumento en el rendimiento de la proteasa.

La metodología utilizada antes de esta tesis (21, 30), empleaba una técnica de semipurificación muy compleja y costosa (cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa), y que además, requería mucho tiempo.

Con la técnica de semipurificación que se utilizó en este trabajo a partir de la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50 % de saturación se ahorro tiempo, resultando ser además, menos costosa que la técnica anterior.

Luego de la semipurificación, la metodología utilizada antes de esta tesis (21, 30), continuaba con la técnica de electroforesis preparativa, al igual que esta nueva metodología, en el siguiente paso se diferenciaron bastante, ya que anteriormente la obtención de la proteína se llevaba a cabo por electroelución del gel obtenido en la electroforesis preparativa, y en esta nueva metodología se emplea la elución mecánica, técnica sumamente sencilla la cual no requiere de aparatos sofisticados ni costosos.

Por todo lo anterior, se demuestra que con las técnicas empleadas en esta tesis, se simplificó la metodología para purificar la proteasa, el rendimiento fue mayor, el tiempo y el costo fueron menores, y además, la calidad de la enzima se mejoró, al darle un tratamiento más sencillo.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La técnica simplificada de Precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% y Electroforesis Preparativa, es la combinación ideal para la purificación de la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1.
2. El mayor rendimiento de proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se obtiene a partir del filtrado de cultivo del medio a base de peptona de colágena (C. Rivas).
3. El medio de cultivo a base de peptona de colágena (C. Rivas) es mejor que el medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) medio convencional para producir Proteasas.
4. El rendimiento obtenido por medio de la metodología diseñada en este trabajo, es cuatro veces mayor que el obtenido con la metodología establecida anteriormente.
5. El peso molecular obtenido para la proteasa extracelular de *N. brasiliensis* HUJEG-1 oscila entre los 72 000 y 75 000 Da.

## IX. LITERATURA CITADA

1. Angeles, A.M., Sugar 1987, "*Identification of a common immunodominant protein in culture filtrates of three Nocardia species and use in etiologic diagnosis of mycetoma*", J. Clinical Microbiology, 25: 2278-2280.
2. Arenas, R., 1988, "*Atlas, Diagnóstico y tratamiento*" Dermatología, 1ª. Edición, Edit. McGraw-Hill, México. pp 415-421.
3. Beaman, B. L. and L. Beaman, 1994, "*Nocardia species: Host-Parasite Relationships*". Rev. Clin. Microbiol. 7: 213-264.
4. Bradford M., 1976, "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*". Analisis Biochemistry. 72: 248-254.
5. Buchanan, R. E. and W. E. Gibbons, 1974, "*Bergey's, Manual of determinative Bacterology*", 8<sup>th</sup>. Ed., Edit. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 559.
6. Chambach A., and D., Roadbard 1987. "*Quantitative and preparative polyacrilamide gel electrophoresis, in gel electrophoresis of proteins, a practical approach*", pp 93-143, Edited By Hames B.D. and Rickwood D. IRL Press Oxford U.K.
7. El-Zaatari, F. A., et al, 1986, "*Monoclonales antibodies against isoelectrically focused Nocardia asteroides proteins characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer Blot Method*", Mol. Immunol. 21: 673-677.
8. Folb, P.I., A. Timme and A. Horowitz, 1977, "*Nocardia infections congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains*"., Infect. Immun., 18: 459-466.

9. Gebhardt, P. L., 1972, "*Microbiology*", 4<sup>a</sup>. Ed., Edit. Interamericana, México, pp 338-339.
10. González-Ochoa, 1945, "*Estudio comparativo entre Actinomyces mexicanus, Nocardia brasiliensis y Nocardia asteroides*", Rev. Inst. Salub. y Enferm. Trop. Mexico City., 5: 155-162.
11. González-Ochoa, A. y F. Baranda, 1953, "*Una prueba cutánea para el diagnóstico de micetoma actinomicótico por Nocardia brasiliensis*". Rev. Del Inst. de Salub. y Enf. Trop., tomo XIII: 189-198.
12. González-Ochoa, A. M., A. H. Shibayama, D. Felix and M. Anaya., 1962, "*Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis*". Excerpt. Med. Int. Congr. Series 55: 542-551.
13. González-Ochoa, A., 1975, "*Geografía de las micosis profundas*", Rev. Inv. Salud Pública. 35: 85-96.
14. Harrington M. G., 1990, "*Elution of proteins from gels in guide to protein Purification, Methods in Enzymology*". Vol 182, pp 488-495. Edited by Deutscher M. P., Academic Press. San Diego, CA. USA.
15. Hames, B. D., 1987, "*An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Gel Electrophoresis of Proteins, a practical approach*", Edited by Hames B. D. and Rickwood D. IRL Press. Oxford, U.K., pp 1-91.
16. Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J.S. Butel y L.N. Ornston, 1990. "*Microbiología Médica*", 13<sup>a</sup>. Edición en español, pp 313-314. Manual Moderno, México, D. F.
17. Jiménez, T., A. M. Díaz, H. Zlotnik, 1990, "*Monoclonales Antibodies to Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis antigens*", J. Clin. Microbiol. 28: 87-91.

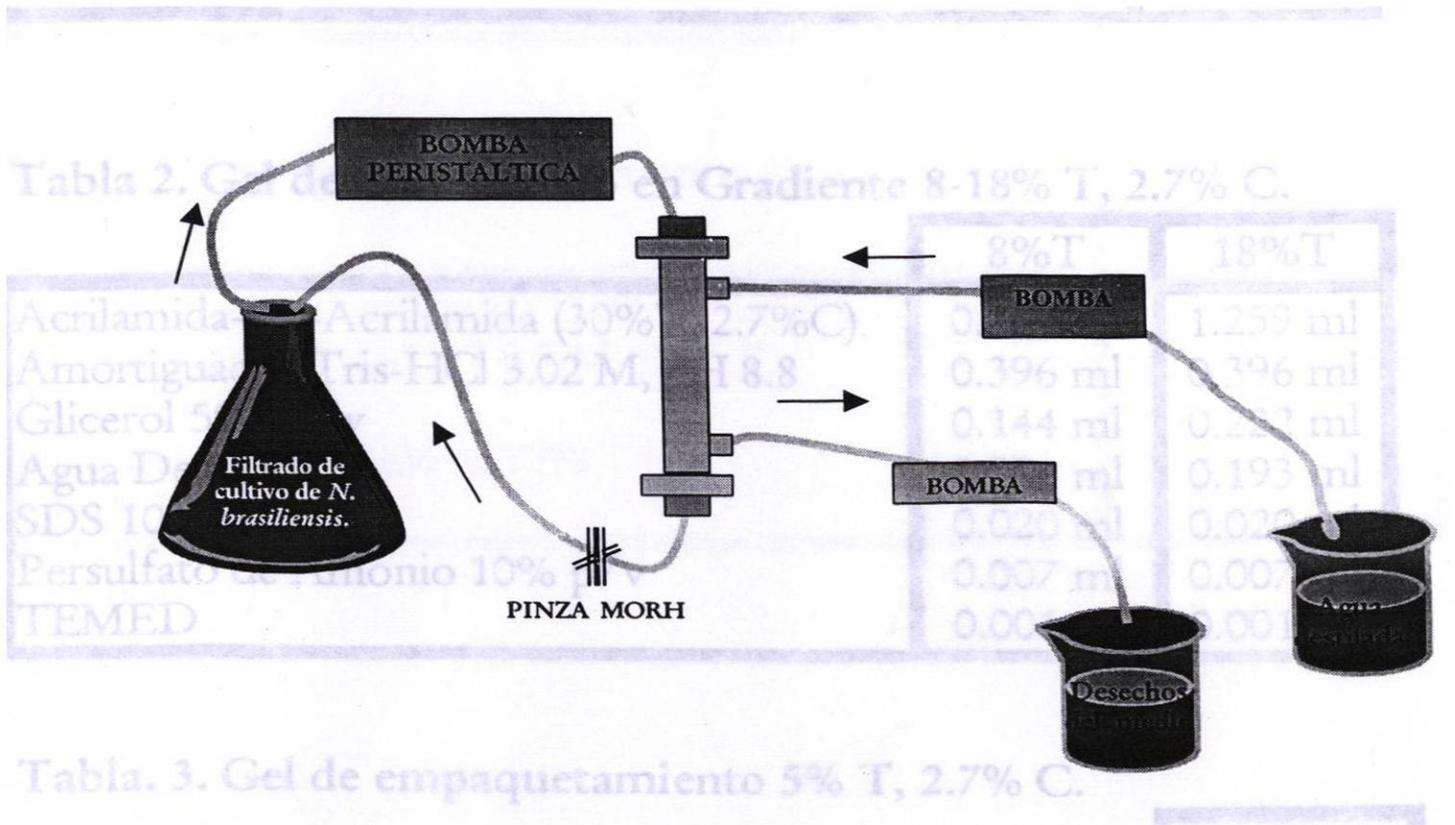
18. Kwapinski, J. B., H. P. R. Seeliger, 1965, "*Investigations on the antigenic structure of actinomycetales. IX Serological Classification of the nocardia with the polisaccharide fractions of their cell walls Mycopathol*". 25: 173-182.
19. Kenneth, S. W. And P. Lane, 1988, "*Antibodies*", A Laboratory manual, Cold Spring. Edit. Mcgraw-Hill, pp 934-941.
20. Laemli, V. K., 1970, "*Cleavege of structural proteins during the assembly of bacteriophage T<sub>4</sub>*", Nature 227:680-685.
21. Licón Trillo, A., 1997. "*Estudio de la inmunogenicidad de las proteasas de Nocardia brasiliensis y su efecto inductor de protección en el micetoma experimental en ratones BALB/c*". Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
22. Melendro, E.I., M.F. Contreras, C. Ximénez, A. M. García, "*Resistence caused by Nocardia brasiliensis in mice; cross protection against Lysteria monocytogenes*". Archs. Allergy Appl. Immun. 57: 74-81.
23. Mahgoub, E. S. and I.G. Murray., 1973, "*Mycetoma*". Heinemann. London.
24. Merril, D.R., M. L. Dunau and D. Goldman, 1981. "*A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels*", Anal. Biochem. 110: 201-207.
25. Pérez- Monfort, R., et al, 1987, "*Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica*", Mol. Biochem. Parasitol. 26: 87-98.

26. Ortiz-Ortiz, J., Sullivan López and O. W. Weigle, 1979, "*B-lymphocyte activation with an extract of Nocardia brasiliensis infection in mice depleted of antigen specific B-cell.*", J. Immunol. 129: 1688-1693.
27. Rico, G. A., et al, 1982, "*Enhanced resistance to Nocardia brasiliensis infection in mice depleted of antigen specific B-cell*". J. Immunol. 129: 1688-1693.
28. Roe, S., 1992. "*Separation based on structure. In Protein Purification methods*", pp 175-244. Edited by Harris E. L. V. And Angal S. IRL Press Oxford. U.K.
29. Salinas, C.M., L. Vera, O. Welsh and M. Rodríguez, 1990, "*Human antibody responses to Nocardia brasiliensis antigens*", In press.
30. Salinas-Carmona, M. C., L. I. Pérez, O. Welsh, M. Rodríguez, M. G. Rinaldi, 1992, "*Identification of intracellular proteasas fom Nocardia brasiliensis*", J. Mycol. Med. 2:1-6.
31. Salinas-Carmona, M. C., O. Welsh, S. M. Casillas, 1993, "*Enzyme linked immunosorbent assay for Serological Diagnosis of Nocardia brasiliensis and clinical correlation with mycetoma infection*". J. Clin. Microbiology 31:2901-2906.
32. Sandoval Trujillo, H., "*Actinomicetos*", Edit. Universidad Autónoma Metropolitana, 1993, pp 345-432.
33. Saúl, A., 1995, "*Micosis Profundas en lecciones dermatológicas*", México, D. F., Ed. F. Méndez Cervantes, pp 127-168.
34. Scopes , R.K., 1988, "*Protein Purification, Principles and Practice 2*", Edit. Springer-Verlag. New York, NY. USA.

35. Tsuboi, R., T. Yamaguchi, K. Mitsuda and H. Ogawa., 1989. "*Extracellular proteinase production and pathogenicity of Nocardia*". Arch Dermatol. Res 281: 78-80.
36. Tsukamura, M. 1970, "*Relationship between Mycobacterium and Nocardia*", Japan J. Microbiol. 14: 187-195.
37. Vera Cabrera, L., M. C. Salinas Carmona, O. Welsh and M. A. Rodríguez, 1992. "*Isolation and Purification of two immunodominant antigens from Nocardia brasiliensis*". J. Clin. Microbiol. 30: 1183-1188.
38. Williams, T., M. R. Sharpe, J. H. Holt, 1989. "*Bergey's, Manual of sistematic Bacterology*", Vol. 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Mol., pp 2333-2362.
39. Welsh-Lozano, O., 1991, "*Mycetoma Curren Concepts in Treatment*", Int. J. Dermatol. 30(6):387-398
40. Welsh, O., E. Saucedo, J. González end J. Ocampo, 1978, "*Amikacin alone and in combination with Trimetoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma*", J. Am. Acad. Dermatology, 17: 443-448.
41. Zlotnik and Bukcley, 1980. "*Experimental production of actinomycetoma in BALB/c mice* ", Infect. Immunol. 29(3):1141-1145

## X. APÉNDICES.

## APÉNDICE A. METODOLOGÍA: FIGURAS Y TABLAS



**Fig. 1.** Proceso de ultrafiltración utilizado para concentrar y ultrafiltrar el medio de cultivo inoculado con *N. brasiliensis* HUJEG-1.

**Tabla 1. Gel-Sustrato 7.5% T, 2.7% C, Caseína 1.14 mg/ml.**

Acrilamida-Bis-Acrilamida (30% T, 2.7% C)	1.500 ml
Amortiguador Tris-HCl 0.075 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4	1.500 ml
Agua Destilada	2.910 ml
Caseína	6.840 mg
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.030 ml
TEMED	0.003 ml

**Tabla 2. Gel de Corrimiento en Gradiente 8-18% T, 2.7% C.**

	8%T	18%T
Acrilamida-Bis-Acrilamida (30%T, 2.7%C).	0.720 ml	1.259 ml
Amortiguador Tris-HCl 3.02 M, pH 8.8	0.396 ml	0.396 ml
Glicerol 50% v/v	0.144 ml	0.222 ml
Agua Destilada	0.874 ml	0.193 ml
SDS 10% p/v	0.020 ml	0.020 ml
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.007 ml	0.007 ml
TEMED	0.001 ml	0.001 ml

**Tabla. 3. Gel de empaquetamiento 5% T, 2.7% C.**

	5%T
Acrilamida-Bis-Acrilamida (30% T, 2.7 % C)	0.499 ml
Amortiguador tris_HCl 1 M, pH 6.8	0.375 ml
Agua Destilada	1.980 ml
SDS 10% p/v	0.030 ml
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.105 ml
TEMED	0.003 ml

**Tabla 4. Gel de corrimiento 12%T.**

	12%T
Acrilamida-Bisacrilamida (30% T y 2.7% C)	6.000 0 ml
Amortiguador tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.870 0 ml
Agua destilada	5.050 0 ml
Persulfato de amonio 10%	0.007 5 ml
TEMED	0.007 5 ml

**Tabla 5. Gel de empaquetamiento 4%T.**

	4%T
Acrilamida-Bis-Acrilamida (30% T, 2.7% C)	1.300 ml
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.500 ml
Agua destilada	6.200 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.005 ml
TEMED	0.010 ml

**APÉNDICE B:  
REACTIVOS Y SOLUCIONES**

❖ **Acrilamida-bisacrilamida 30%T, 2.7%C. (SIGMA)**

- Acrilamida 29.2 g
- Bisacrilamida 0.8 g
- Disolver en 80 ml de agua destilada
- Agitar 18 h a 4°C
- Filtrar y aforar a 100ml
- Mezclar con amberlita por 1 h en agitación a 4°C
- Filtrar.

❖ **Albúmina Sérica Bovina 1mg/ml (SIGMA)**

❖ **Acido acético 0.1 %(MERCK)**

❖ **Acido clorhídrico 1 N. (MERCK)**

❖ **Amberlita XAD-7. (SIGMA)**

❖ **Azul de Coomassie R-250 0.1%(SIGMA)**

- Azul de Coomassie 0.1 g
- Solución desteñidora 100 ml

❖ **Azul dextrana. (SIGMA)**

❖ **Bicarbonato de sodio (SIGMA)**

❖ **Bradford (reactivo)**

- Azul de Coomassie G-250 60 mg
- Acido perclórico al 3 % 1 l
- Filtrar

- ✧ **Buffer de muestra 4X.**
  - SDS 1.0 g
  - 2-Mercaptoetanol 10% 1.0 ml
  - Sacarosa 5 g
  - Azul de bromofenol 0.005g
  - Disolver en Buffer Tris HCl 0.5 M, pH 6.8
  
- ✧ **Buffer de corrimiento c/SDS 1X**
  - Tris 125 mM 3.02 g
  - Glicina 192 mM 14.41 g
  - SDS 0.1 % 1.0 g
  - Aforar a 1 l de agua bidestilada
  
- ✧ **Citocromo C (SIGMA)**
  
- ✧ **Cloruro de Bario (MONTERREY)**
  
- ✧ **Etanol: Eter etílico (MERCK)**
  - Soluciones 1:1, 1:2 y 1:3 v/v.
  
- ✧ **Glicerol 50%. (SIGMA)**
  
- ✧ **Glicina (SIGMA)**
  
- ✧ **Hidróxido de potasio 5 % (MERCK)**
  
- ✧ **Duodecilsulfato de sodio 10%. (SIGMA)**
  
- ✧ **Marcadores de peso molecular stock No SDS-7L Dalton Marck (SIGMA)**
  
- ✧ **NaOH 1 N. (MERCK)**

- ✧ **Nitrato de Plata 0.012 M. (MERCCK)**
  - AgNO<sub>3</sub> 0.509 g en 250 ml de agua destilada.
- ✧ **(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (MERCCK)**
  - Solución saturada
  - Sólido.
- ✧ **PBS 0.1 pH 6.8**
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.22 g
  - KCl 0.2 g
  - NaCl 8.0 g
  - Aforar a 1 l de agua destilada.
- ✧ **Peróxido de hidrógeno. (MONTERRERY)**
- ✧ **Persulfato de amonio 5%. (SIGMA)**
- ✧ **Sephadex G-100 (SIGMA)**
- ✧ **Solución de lavado.**
  - Etanol 10 %
  - Acido acético 5 %
- ✧ **Solución desteñidora**
  - Metanol 40 %
  - Acido acético 10 %
- ✧ **Solución fijadora**
  - Metanol 50 %
  - Acido acético 12 %
- ✧ **Solución oxidante**
  - Dicromato de potasio 3.4 mM
  - Acido nítrico 3.22 mM

❖ **Solución reveladora**

- Carbonato de sodio 2.965 g
- Formaldehído 0.05 ml
- Aforar a 100 ml con agua destilada.

❖ **Solución Salina 0.85% p/v, Lab. PISA.**

❖ **TEMED. (SIGMA)**

❖ **Tris HCl 1 M pH 6.8**

- Tris HCl 6.055 g
- 100 ml de agua destilada
- Ajustar pH

❖ **Tris HCl 3 M 8.8**

- Trisma Base 18.16 g
- 100 ml con agua destilada
- Ajustar pH

## APÉNDICE C: ABREVIATURAS

❖ AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de plata.
❖ BHI	Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusión).
❖ BSA	Albúmina Sérica Bovina (Bovin Serum Albumin).
❖ °C	Grados Centígrados.
❖ %C	Por ciento de agente entrecruzador (bis-acrilamida).
❖ cm	Centímetro(s)
❖ Da	Daltones.
❖ ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).
❖ g	Unidad de gravedad.
❖ g	Gramo(s).
❖ HCL	Ácido Clorhídrico.
❖ HNO <sub>3</sub>	Ácido Nítrico.
❖ h	Horas.
❖ Ig G	Inmunoglobulina G.
❖ K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Dicromato de Potasio.
❖ KDa	Kilodaltones.
❖ M	Molar.

❖ mg	Miligramo(s).
❖ min	Minuto(s).
❖ ml	Mililitro(s).
❖ mm	Milímetro(s).
❖ mM	Milimolar.
❖ µg	Microgramo(s).
❖ µl	Microlitro(s).
❖ µm	Micrómetro(s).
❖ N	Normal.
❖ nm	Nanómetro(s).
❖ PBS	Solución Salina amortiguadora con Fosfatos.
❖ pH	Potencial de Hidrógeno.
❖ PM	Peso Molecular.
❖ p/v	Peso sobre volumen.
❖ SDS	Lauril Sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate).
❖ SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil – Sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).
❖ seg	Segundo(s).
❖ %T	Porcentaje de Acrilamida Total.
❖ TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.
❖ Tris	Tris(hidroximetil)aminometano.

- ❖  $V$  Voltios.
- ❖  $v/v$  Volumen sobre volumen.
- ❖  $V_0$  Volumen vacío.
- ❖  $V_e$  Volumen de elución.
- ❖  $V_e/V_0$  Volumen de elución sobre volumen vacío.

