



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

ESTUDIO DE LA RELACIÓN HUÉSPED PARÁSITO EN INFECCIONES  
DERMATOLÓGICAS.

**TÍTULO:**

Obtención de proteínas de secreción de *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*.

**Asesores:** Maestro en ciencias Alejandro Palma Ramos 15941

Doctora Violeta Karen Espinosa Antúnez 42345

**Alumna:** González Berrocal Ana Victoria **Matricula:** 2202029732

Calle Lucerna Sur #232 Santa Cecilia Tepetlapa, Xochimilco C.P.16880

Número de celular 557433489

**Lugar de realización:**

Laboratorio 14 de inmunología, edificio N. (UIDIS) de la UAM-X

**Fecha de inicio y terminación:** 21 de diciembre del 2023/ 21 de junio del 2024.

Octubre, 2024.

Doc. Violeta Karen Espinosa Antúnez

Mtro. Alejandro Palma Ramos

## Contenido

Introducción .....	3
Planteamiento del problema .....	4
Justificación .....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos .....	4
Antecedentes. ....	5
Micetoma .....	5
Actinomicetos.....	5
Métodos de identificación para <i>A. madurae</i> y <i>N. brasiliensis</i> .....	6
Morfología visual.....	6
Análisis Microscópico.....	7
Aislamiento microbiológico. ....	7
Pruebas bioquímicas.....	8
Frecuencia de casos clínicos de micetoma a nivel mundial y en estados de la República mexicana.....	9
Diagnóstico.....	10
Tratamiento .....	11
Medios de cultivo solidos para el aislamiento e identificación. ....	12
Medios de cultivo simples para el análisis de proteínas .....	12
Métodos de obtención y purificación de proteínas.....	12
Purificación de proteínas por la técnica de salting-out. ....	13
Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE. ....	13
Metodología.....	14
1.- Crecimiento de cepas de <i>N. brasiliensis</i> y <i>A. madurae</i> en medios enriquecidos. ....	14
2.- Crecimiento de <i>N. brasiliensis</i> y <i>A. madurae</i> en medios de cultivo simples (Luria y Czapek).....	14
3.- Precipitación y purificación de las proteínas del medio de cultivo simple. ....	14
4.- Cuantificación de proteínas.....	14
6.-Electroforesis SDS-PAGE para proteínas. ....	15
Resultados y discusión.....	15
1.- Crecimiento de cepas de <i>N. brasiliensis</i> y <i>A. madurae</i> en agar BHI.....	15

2.- Crecimiento de <i>N. brasiliensis</i> y <i>A. madurae</i> en medios de cultivo simples (Luria y Czapek).....	16
3.- Cuantificación de proteínas de secreción.....	17
4.- Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de secreción sin marcador de pesos moleculares.....	18
5.- Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de secreción con marcador de pesos moleculares.....	20
Discusión .....	20
Conclusión.....	21
Metas alcanzadas.....	21
Recomendaciones.....	21
Referencias bibliográficas .....	21
Anexos .....	24
Agar BHI: .....	24
Caldo Luria (LB).....	24
Caldo Czapek.....	24
Solución de acrilamida-bisacrilamida.....	24
<i>Buffer</i> Tris-HCl 1.5M pH 8.8.....	24
<i>Buffer</i> Tris-HCl 0.5M pH 6.8.....	25
Dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS) .....	25
Persulfato de amonio (APS) al 10%.....	25
<i>Buffer</i> de corrida 10X.....	25
Azul de Coomasie .....	25
Solución desteñidora .....	25
Metodología para Obtención de proteínas de secreción y Electroforesis SDS-PAGE...	26
Obtención de proteínas de secreción en los medios de cultivo simples para cada cepa bacteriana.....	26
Preparación del gel separador y concentrador.....	26

## Introducción

El micetoma es una enfermedad crónica granulomatosa que afecta el tejido subcutáneo de cualquier parte del cuerpo, las zonas anatómicas más afectadas son las extremidades inferiores como el pie, generando inflamación, dolor y fístulas que drenan un material seroso o purulento, es inducida por una inoculación traumática con astillas, espinas, u objetos contaminados con tierra y materia orgánica. El micetoma es causado por dos tipos de agentes infecciosos, hongos (eumicetoma) y bacterias actinomicetos (actinomicetoma). Los actinomicetos son bacterias aerobias mesófilas, grampositivas que forman filamentos ramificados, en México el más frecuente es el género *Nocardia brasiliensis* causando el 65.58% de los casos y seguido del género *Actinomadura madurae* causando 10% de los casos de micetoma.

La identificación de la especie infectante consiste en un diagnóstico en laboratorio con un análisis microscópico directo del líquido filante de las lesiones del micetoma con KOH al 10% o solución salina, en el caso de *A. madurae* pueden ser visibles granos negros ovals. El diagnóstico histopatológico de los granos puede ser visualizados con tinción de Hematoxilina Eosina. El tratamiento del actinomicetoma depende la etiología de la infección, se basa principalmente con los antibióticos trimetoprim-sulfametoxazol sólo o combinado generalmente con amikacina dependiendo de los casos, el esquema es exitoso en el 95% de los casos sin embargo amikacina puede causar efectos secundarios y es un tratamiento largo. El objetivo de este trabajo fue obtener las proteínas de secreción de *N. brasiliensis* y *A. madurae* para posteriormente ser empleadas como posibles moléculas profilácticas, para la estimulación de la respuesta adaptativa en el padecimiento del actinomicetoma o de diagnóstico molecular (pruebas de ELISA), para estos microorganismos. La purificación de dichas macromoléculas se llevó a cabo inoculando a *N. brasiliensis* y *A. madurae* en medios de cultivo simple (Luria y Czapek), después del tiempo de incubación se purificaron las proteínas liberadas al medio por el método de salting out, se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop a 280 nm. Por último, se realizó una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE para determinar el patrón y pesos moleculares de las proteínas obtenidas los resultados obtenidos fueron al menos 14 bandas de *N. brasiliensis* secretadas en el caldo Czapek y en el caso de *A. madurae* se puede ver aproximadamente 12 bandas en caldo Luria y en caldo Czapek se puede ver 1 banda por último, comparando con el patrón de pesos moleculares se encontraron bandas de 61, 26 y 24 kDa las cuales fueron observadas en la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.

## Planteamiento del problema

El actinomicetoma es una infección que presenta un tratamiento complicado con la combinación de antibióticos durante varios años y que no logra ser erradicado el agente etiológico del tejido cutáneo, debido a que se ha reportado recurrencia en la infección cuando se deja de administrar los antibióticos. Otro de los desafíos del padecimiento es la identificación del agente etiológico responsable de la infección, ya que se requiere de métodos invasivos como son la extracción de biopsia o aspirado de fistulas para su posterior análisis.

Por lo que es importante contar con antígenos para brindar tratamiento profiláctico estimulando la respuesta inmunológica y el diagnóstico molecular (ELISA), para este síndrome.

## Justificación

En actinomicetoma se ha observado que el tratamiento es muy complejo en la práctica clínica, ya que consta de una terapia con antibióticos, el más empleado es el trimetoprim-sulfametoxazol o combinado con otros como son amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, rifampicina o DDS (diamino-difenil-sulfona), durante un periodo prolongado (años), y sin lograr erradicar definitivamente del agente etiológico. En cuanto a la caracterización del microorganismo causal de la infección se basa en la toma de biopsias de las lesiones o aspirado de fistulas para posteriormente ser analizadas por histología, por ende, lo hace un método invasivo e incómodo para el paciente.

Por lo tanto, en el presente proyecto se obtendrán las proteínas de secreción de *N. brasiliensis* y *A. madurae* para posteriormente ser empleadas como moléculas con uso profiláctico para estimular la respuesta inmunológica o para el diagnóstico molecular en este síndrome.

## Objetivo general

Purificar proteínas de secreción como posibles inmunógenos de *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*.

## Objetivos específicos

- Cultivar *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae* en medios de cultivo simples
- Purificar proteínas de secreción de *Nocardia brasiliensis* en medios de cultivo simples.

- Purificar proteínas de secreción de *Actinomadura madurae* en medios de cultivo simples.
- Cuantificar proteínas utilizando espectrofotómetro NanoDrop a 280 nm.
- Determinar el patrón proteico por método de electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE.

## **Antecedentes.**

### **Micetoma**

El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica que afecta piel y tejido subcutáneo que se caracteriza por un aumento de volumen causando una deformación en la parte afectada, orificios fistulosos y secreción de exudado seroso o purulento, que sale de los granos (Arenas, R. & Torres, E., 2014), es muy frecuente en regiones tropicales y subtropicales paralelo al trópico de cáncer, por ello se les denomina cinturón de micetoma donde se incluyen países como: Arabia Saudita, Argentina, Brasil, Colombia, India, México, Nigeria, Senegal, Somalia, Sudán, Venezuela y Yemen, entre otros (López *et al.*, 2013) el hábitat para desarrollarse tiene características especiales como estaciones de lluvia definidas de junio a octubre, temperaturas entre 20 y 40 °C, el concepto micetoma fue utilizado por primera vez en 1860 por Van Dyke Carter, en 1912 Circero describe el primer caso de micetoma en México (Serrano J. & Sandoval A., 2003), caracterizada por la triada de tumefacción de la zona afectada, fistulización y producción de agregados coloniales de agente etiológico (granos o gránulos) (Vera, L. & Molina, C., 2021). Los granos causados por bacterias, actinomicetos se le denomina actinomicetoma o por hongos se le denomina eumicetoma (Palma *et al.*, 2017).

### **Actinomicetos**

Los actinomicetos son bacterias grampositivas, aerobias que se desarrollan en suelos con pH ácidos y alcalinos, la temperatura apropiada para su crecimiento y reproducción es de 20 °C a 42 °C (mesófilas) y forman filamentos ramificados, presentan diferentes periodos de incubación en el hospedero, puede ser días, semanas o meses, tienen un mayor número de casos en México, *N. brasiliensis* 65.58%, seguida de *A. madurae* con 7.93%, otras especies identificadas con menos frecuencia fueron *N. asteroides*, entre otras como se muestra en la tabla 1 (Rochín *et al.*, 2020).

**Tabla 1** Principales agentes o variantes de actinomicetos presentes en México (Rochín *et al.*, 2020).

Agente	n.º	%
<i>Nocardia brasiliensis</i>	2,489	65.58
<i>Actinomadura madurae</i>	301	7.93
<i>Streptomyces somaliensis</i>	39	1.02
<i>Nocardia asteroides</i>	27	0.71
<i>Actinomadura pelletieri</i>	11	0.29
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	7	0.18
<i>Nocardia harenae</i>	2	0.05
<i>Nocardia transvalensis</i>	1	0.02
<i>Nocardia sp</i>	531	13.99
Actinomicetos	388	10.23
Total	3,796	100.00

## Métodos de identificación para *A. madurae* y *N. brasiliensis*.

### Morfología visual

Las diferencias morfológicas de los actinomicetomas presentes a simple vista causados por *A. madurae* y *N. brasiliensis* son: para *A. madurae* presenta granos voluminosos, abollonados o gibosos, duros, con pocas fístulas que en ocasiones cuesta trabajo encontrar porque llagan a medir de 1 a 10 mm de diámetro, sus bordes cartográficos, largas franjas alrededor de ellos y afecta principalmente la planta y los bordes del pie (figura 1), aunque puede encontrar otras partes del cuerpo (Lavalle *et. al.*, 2000).



**Figura 1.** Mictetoma causado por *A. madurae* en un paciente campesino de 54 años con una evolución de 15 años (Lavalle *et. al.*, 2000).

Para *N. basiliensis* se identifica por un aumento de volumen, deformidad anatómica y fístulas que drenan material purulento, filante con presencia de granos que confluyen formando una placa de 10x20 cm, bordes mal definidos, superficie irregular (figura 2), afecta principalmente el tercio interior de la pierna y pie, aunque puede afectar otras partes del cuerpo (Lavalle *et. al.*, 2000).



**Figura 2.** Actinomicetoma de un paciente, localizada en la extremidad inferior izquierda, agente causal *N. brasiliensis* (Rochín *et. al.*, 2020).

### **Análisis Microscópico.**

El examen directo se realiza tomando un grano del liquido filante o utilizando un sacabocado de la lesión, el cual se extiende sobre un portaobjetos para posteriormente colocarle yodopovidona (Lugol) a 40X (Vera, L. & Molina, C., 2021) Y se observa al microscopio en *N. brasiliensis* pequeños y arriñonados y de *A. madurae* grandes y cartográficos el tamaño y forma del (Los granos de *A. madurae* y los eumicéticos se ven a simple vista).

### **Aislamiento microbiológico.**

Se toma una muestra exprimiendo un orificio fistuloso para obtener el exudado e inocularlo en medio de cultivo BHI o Dextrosa Sabouraud, el periodo de incubación, también varía, algunas colonias aparecen después de 7 a 10 días, la morfología macroscópica sobre medios de cultivo, se observan colonias con las siguientes características: Las colonias de *N. brasiliensis* son duras y puede variar el color que puede ser blanco, amarillo o naranja (figura 3), *A. madurae* desarrolla colonias cerosas blancas-amarillas o rosas (figura 4) (Vera, L. & Molina, C., 2021).





**Figura 3.** Colonia de *N. brasiliensis* color amarillento, con aspecto de palomita de maíz en agar Dextrosa Sabouraud (Rochín *et. al.*, 2020).



**Figura 4.** Colonia de *A. madura* color blanco, aspecto rugoso y cerebriformes en agar Dextrosa Sabouraud (Jerez *et. al.*, 2012)

### **Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias para su identificación, algunas pruebas son técnicas rápidas debido a que evalúan la presencia de una enzima y su lectura varía entre segundos u horas. Otras pruebas tienen como requisito para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 horas; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos, cuando se trata de una prueba de reacciones enzimáticas la incubación suele ser de 2-6 horas (Olmos *et. al.*, 2010), un ejemplo de esta prueba es la hidrólisis de caseína, prueba de urea, licuefacción de gelatina y descomposición de sustratos como hipoxantina, tirosina, adenina, xantina y el análisis de ácido micólicos de la pared celular para identificar a *N. brasiliensis* y *A. madurae* (Vera, L. & Molina, C., 2021) (tabla 2)

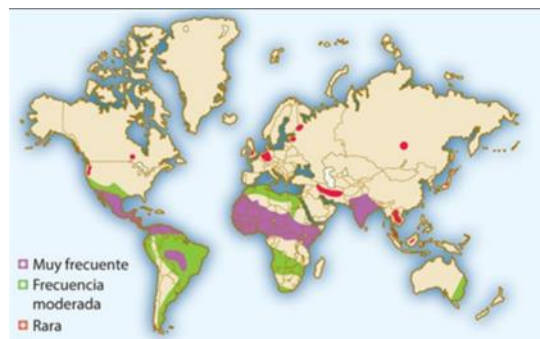
**Tabla 2** Características fisiológicas de los actinomicetos (Arenas, R. & Torres, E., 2014)

Hidrólisis de								
Especie	Caseína	Xantina	Hipoxantina	Tirosina	Fusión de gelatina	Producción de ureasa	Utilización de almidón	Forman ácido a partir de:
<i>N. brasiliensis</i> *	+	-	+	+	+	+	-	Glicerol Inositol Manitol
<i>N. asteroides</i> **	-	-	-	-	-	+	-	Glicerol Ramnosa
<i>N. caviae</i> †	-	+	+	-	-	+	-	Glicerol
<i>S. somaliensis</i>	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>A. pelletieri</i>	+	-	+	+	+	-	-	Trehalosa
<i>A. madurae</i>	+	-	+	+	+	-	+	Arabinosa Celobiosa Glicerol Manitol Xilosa Ramnosa Adonitol

Crecimiento a 45 °C. \*, negativa; \*\*, positiva; †, *N. otitidis caviarum*.

## Frecuencia de casos clínicos de micetoma a nivel mundial y en estados de la República mexicana.

Sudan reporta más casos de micetoma en el mundo, México es el segundo país en reportar más casos de micetoma (Figura 5) (Suliman *et al.*, 2018). En el 2012 se llevó a cabo un estudio multicéntrico en los centros de diagnóstico micológico, se analizaron 3,933 casos en los últimos 54 años. El análisis mostró que el 75.6% de los casos se presenta en el sexo masculino con un rango de edad de 16 a 50 años y el 24.4% al sexo femenino. La ocupación laboral con mayor predominio se presenta en campesinos 58.41%, seguido de amas de casa 21,79%. El principal agente causal es *N. brasiliensis* 65.58% (Vera, L. & Molina, C., 2021). Seguido por *A. madurae*, el cual representa el 10% de los casos y predomina en el sexo femenino (2:1) (Palma *et al.*, 2017). El sitio anatómico con mayor recurrencia del micetoma es el pie 79.2%, seguido por las manos 6.6%, es decir la prevalencia es en las extremidades inferiores (Vera, L. & Molina, C., 2021).



**Figura 5.** Frecuencia del Micetoma a nivel mundial (Arenas, R. 2014).

Dentro del territorio mexicano las condiciones ambientales del estado de Morelos permiten que se desarrolle con mayor facilidad *N. brasiliensis*, en el caso de *A. madurae* se encuentra con mayor prevalencia en Puebla, Guanajuato (Arenas, R., 2014) Michoacán, Jalisco, Querétaro, etc. (Tabla 3 y Figura 6).

**Tabla 3** Prevalencia de *A. madurae* en los estados de la república mexicana (Lavalle *et. al.*, 2000).

Guanajuato	23	(32.3%)
Puebla	9	(12.6%)
Oaxaca	8	(11.24%)
Michoacán	7	(9.8%)
Hidalgo	6	(8.4%)
Querétaro	3	(4.2%)
Jalisco	3	(4.2%)
Coahuila	2	(2.8%)
Sinaloa	2	(2.8%)
Guerrero	2	(2.8%)
Estado de México	1	(1.4%)
Ags, Chis, D.F., Dgo.		
N.L., Ver, Zac.	7	(9.8%)



**Figura 6** Distribución geográfica de *A. madurae* en la república mexicana (Lavalle *et. al.*, 2000).

### Diagnóstico

Para el diagnóstico en el caso de *Nocardia spp.* los granos pueden ser visibles a simple vista. En el caso de *Actinomyces spp.* el análisis histológico se pueden observar clavos en la periferia de los granos. El diagnóstico y determinación del agente etiológico se realiza con el análisis directo y cultivo de la secreción (Rochín

*et. al.*, 2020), para aislar los actinomicetos generalmente se utiliza agar Dextrosa Sabouraud y agar Sangre (Vera, L. & Molina, C., 2021).

Su diagnóstico puede ser confiable a través de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), sin embargo, es una técnica costosa, poco accesible para las zonas endémicas y no estandarizada. Las técnicas de diagnóstico más empleadas y accesibles son rayos x, ecografías, resonancias magnéticas y tomografías computarizadas, que permiten evaluar de manera eficaz las lesiones y planificar la gestión clínica (OMS, 2022).

## **Tratamiento**

La respuesta inmune humoral no es protectora. Debido a su cronicidad, las lesiones pueden pasar a una transformación neoplásica que conlleva a la aparición de cáncer de piel. (Suliman *et al.*, 2018). Se desconocen los mecanismos de patogénesis de los actinomicetos, pero se ha relacionado al cemento (exopolisacárido autoproducido), que envuelve a los granos formados por los agentes causales como mecanismo de patogenicidad, debido a que impide que el sistema inmune innato actúe sobre el agente etiológico, es decir que lleve a cabo el proceso de fagocitos (Palma *et. al.*, 2005). Por ello el tratamiento del micetoma depende del origen, ya sea bacteriana o fúngica, de la localización y extensión. En el caso del micetoma bacteriano el tratamiento consiste en una terapia combinada de antibióticos, las opciones terapéuticas incluyen el uso de sulfas como trimetoprim-sulfametoxazol y en dado caso que sea extenso o de alto riesgo se combina con antimicrobianos como amikacina, aunque puede causar efectos secundarios. Linezolid (1200 mg diarios), se recomienda amoxicilina-clavulanato en algunos casos para mujeres embarazadas (Vera, L. & Molina, C., 2021). El tratamiento es largo, produce efectos secundarios y costoso, además que es poco accesible en zonas endémicas (OMS, 2022). Por ello es necesario buscar alternativas farmacéuticas.

Los géneros *Actinomadura* y *Nocardia* producen metabolitos con diversas propiedades biológicas, como antibióticos o citostáticos y enzimas involucradas en la síntesis de péptidos con actividad biológica en organismos eucariotas (Vera, L. & Molina, C., 2021). En el caso *N. brasiliensis* como lo reporto Vera, L. (1990), seis proteínas fueron reconocidas por más del 50% de los pacientes, tres de estas con pesos moleculares aproximados de 61, 24 y 26 kilodaltones (kDa), se presentaron con mayor frecuencia en los pacientes con micetoma, además de presentar menor reacción cruzada, por ello fueron seleccionadas para ser aisladas y purificadas. Los sueros de algunos pacientes reconocieron débilmente las proteínas de 61, 26 y 24 kDa por lo tanto se encontraron tres antígenos para brindar un posible tratamiento profiláctico estimulando la respuesta adaptativa, ya que es una herramienta valiosa para la relación hospedero-parásito en el padecimiento del micetoma.

### **Medios de cultivo solidos para el aislamiento e identificación.**

La muestra de exudado, la cual contiene los gránulos se inoculan en medios de cultivo para aislar e identificar las colonias bacterianas, los medios sólidos son los de excelencia; los más empelados para infecciones dermatológicas son: 1) Agar de Infusión Cerebro Corazón (BHI), apropiado para bacterias y hongos, presenta un alto contenido en nutrientes como son la infusión de cerebro de ternera, corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y 2) Agar Dextrosa Sabouraud, es recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos asociados con infecciones cutáneas (piel o pelo), tiene un pH ácido entre los nutrientes que presenta son: peptona, la triptona y la glucosa que favorecen el desarrollo de estos microorganismos y evita el crecimiento de bacterias de la microbiota de la piel (LABORATORIOS BRITANIA, 2011).

### **Medios de cultivo simples para el análisis de proteínas**

Los medios líquidos (caldos) se suelen ocupar para generar una gran cantidad de biomasa bacteriana. El caldo Luria es un medio de cultivo para crecimiento microbiano comúnmente se emplea para *Escherichia coli* ya que es rico en nutrientes como: péptidos, aminoácidos, vitaminas hidrosolubles y carbohidratos (Rocardo, R., 2020). Caldo Czapek-Dok se utiliza en hongos (principalmente *Candida albicans*), y algunas bacterias, la principal característica que deben tener es que utilizan el nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno, es útil para procedimientos microbiológicos del suelo (Condalab, 2021). Ambos medios de cultivo se han empleado para purificar proteínas que secretan los microorganismos al medio extracelular, ya que son medios de cultivo simples y las proteínas liberadas son únicamente del microorganismo y no presentes en los medios de cultivo como nutrientes.

### **Métodos de obtención y purificación de proteínas**

Métodos de obtención de proteínas dependen de las características fisicoquímicas como pH de la molécula, los métodos más comunes son: la purificación por peso molecular (cromatografía de filtración en gel), por carga (cromatografía de intercambio iónico), por hidrofobicidad (precipitación por sales o solventes, cromatografía de interacción hidrofóbica o fase reversa), por afinidad a un ligando (cromatografía de afinidad). Para cuantificar las proteínas se utilizan las técnicas colorimétricas y no colorimétricas. Esta última se basa en el fundamento de la ley de Beer y Lambert utilizando un espectrofotómetro (Ramírez *et al.*, 2021).

La purificación de proteínas es una serie de procesos que permiten aislar una proteína específica de una mezcla compleja, es importante identificar la proteína para la caracterización de la función, la técnica de purificación depende de las propiedades, ya que presentan un grupo amino ( $+NH_2$ ), un grupo carboxilo ( $-COOH$ ) y una cadena lateral que determina sus características; las técnicas más comunes

son purificación por peso molecular (cromatografía de filtración de gel), por carga (cromatografía de intercambio iónico) y por hidrofobicidad (Precipitación por sales o solventes) por mencionar algunas técnicas (Ramírez *et. al.*, 2021).

### **Purificación de proteínas por la técnica de salting-out.**

Es una alternativa recurrente en la purificación de proteínas cuando se trata de extractos muy complejos o cuando se manejan volúmenes grandes de la muestra. La técnica se basa en la solubilidad de una proteína que depende de los residuos de aminoácidos ionizados, regiones polares e hidrofóbicas. Altas concentraciones de sales en especial sulfato de amonio causan una fuerza iónica alta por ello se usan para precipitar proteínas, por las moléculas de agua en la capa de solvatación, hasta que la proteína pierde la interacción con la capa de solvatación a esto se le llama salting out. Las proteínas precipitadas se recuperan por centrifugación (precipitado y sobrenadante) posteriormente se dializan con un amortiguador (Ramírez *et. al.*, 2021).

### **Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.**

La electroforesis es una técnica que se utiliza para la separación, identificación y purificación de proteínas basada en el peso molecular. En un principio se utilizaron geles de almidón, pero se reemplazó por geles de poliacrilamida. El principio que utiliza una electroforesis se fundamenta en la atracción de cargas eléctricas. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su peso molecular. Este método consiste en preparar una placa de gel de poliacrilamida que contienen dodecilsulfato de sodio, se le denomina técnica SDS-PAGE por sus siglas en inglés Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis. Las placas se forman por la co-polimerización de la acrilamida, se utiliza un agente N,N-metilen bis-acrilamida en presencia de un catalizador ion persulfato en forma de persulfato de amonio y un iniciador como TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina). La polimerización depende de la temperatura se recomienda tener una temperatura mayor a 20 °C para prevenir una polimerización incompleta. El porcentaje total de acrilamida y bis-acrilamida determina el rango de separación del gel, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 12%. La electroforesis desnaturizante se conoce como SDS-PAGE, debido al detergente aniónico SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) y agentes reductores (2-mercaptoetanol, DTT) que se une a las proteínas, desnaturizándolas y proporcionándoles carga negativa para asegurar una pérdida de su estructura tridimensional, la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula. El buffer de carga sirve como amortiguador que brinda peso, densidad y color a la muestra, para facilitar su depósito en el pozo y evitar su salida del gel, además de monitorear el corrimiento de la muestra en el gel. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo al peso molecular de la proteína, se puede determinar el peso aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de peso molecular conocido (Pérez *et al.*, 2015). El marcador de peso molecular son una

mezcla de proteínas de tamaño conocido para determinar por comparación el tamaño de las moléculas contenidos en la muestra (Lopez, D. & Sandoval, A., 2013), se tiñen las proteínas con azul de Coomassie para su visualización y fijación en el gel.

## **Metodología.**

### **1.- Crecimiento de cepas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en medios enriquecidos.**

Se creció a *N. brasiliensis* ATCC 19296 y *A. madurae* STCC 3043 en agar BHI, a partir de cepas conservadas en glicerol, una vez inoculadas en el agar, se incubaron a 37°C durante 5 días o hasta observar crecimiento. Se prosiguió a describir las características macroscópicas de las bacterias, es decir morfología colonial.

### **2.- Crecimiento de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en medios de cultivo simples (Luria y Czapek).**

De las cepas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en agar BHI se inocularon los caldos Luria y Czapek con dos asadas del crecimiento de cada microorganismo en BHI, se incubaron a 37°C durante 2 semanas y después de 1-3 meses a temperatura ambiente hasta observar un aumento de la biomasa bacteriana. Para el crecimiento en caldo Luria el aumento de la población se observó al mes, contrario al caldo Czapek que fue de a los 3 meses.

### **3.- Precipitación y purificación de las proteínas del medio de cultivo simple.**

Se separó la biomasa de *N. brasiliensis* y *A. madurae* del caldo Luria y Czapek por centrifugación a 3000 rpm/35min. Posteriormente se precipitaron las proteínas secretadas al caldo Luria y Czapek por la técnica de salting out, agregando el 75% de sulfato de amonio del volumen total cada caldo y se dejó en refrigeración por 24 horas (4°C). Pasado el tiempo se centrifugo a 8,500rpm/45min, el pellet formado se resuspendió con solución salina fisiológica y se dializó utilizando las membranas de colodión con 10 nm de poro (la membrana se trató con agua desionizada hirviendo por 10 minutos), se colocaron las membranas en un recipiente con agua desionizada y se realizaron dos cambios de agua después de las 24 horas. Ver anexos para más información.

### **4.- Cuantificación de proteínas**

Se descongelaron las proteínas de secreción de los caldos Luria y Czapek contenidas en los microtubos 1.5 mL, y se cuantificaron empleando un espectrofotómetro NanoDrop a una longitud de onda de 280 nm, el blanco de calibración fue agua desionizada y se identificó que el espectro mostrara dos picos que corresponden a las proteínas y se anotó la concentración mostrada en mg/mL.

## 6.-Electroforesis SDS-PAGE para proteínas.

Se preparó el gel separador al 10% y el gel concentrador al 4%, las proteínas de secreción purificadas de los medios de cultivo Luria y Czapek de *N. brasiliensis* y *A. madurae*, se colocaron en microtubos de 0.5mL con 15 $\mu$ L de proteínas con 5  $\mu$ L buffer de carga, posteriormente se calentaron en agua en ebullición durante 6 min y pasado el tiempo de calentamiento se cargaron en los pozos del gel, el primer carril se empleó para el marcador de pesos moleculares *dual color* (BioRad). Las condiciones de corrimiento fueron 80 V por 30 min y posteriormente 100 V durante 2 h aproximadamente. Una vez finalizado el corrimiento se tiñó el gel con azul de Coomassie durante 30 min. y se destiñó con solución desteñidora para visualizar las bandas proteicas, Por último, se secó el gel por calor y vació para su conservación. La preparación del gel y reactivos se muestran en el anexo.

## Resultados y discusión.

### 1.- Crecimiento de cepas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en agar BHI.

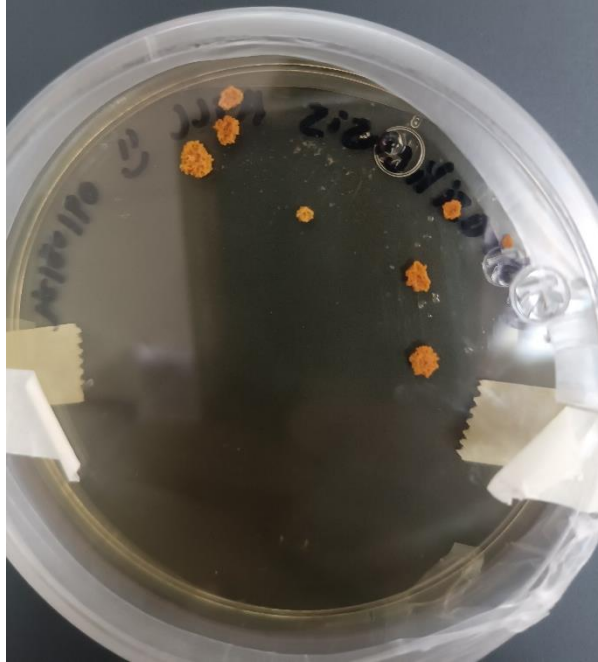
El crecimiento de *A. madurae* en agar BHI mostró colonias blanquecinas con una ligera coloración rosa, pequeñas de consistencia seca y adheridas fuertemente al agar con superficie irregular, borde ondulado y sin brillo.



**Figura 7** Colonias de *A. madurae* crecidas en Agar BHI.



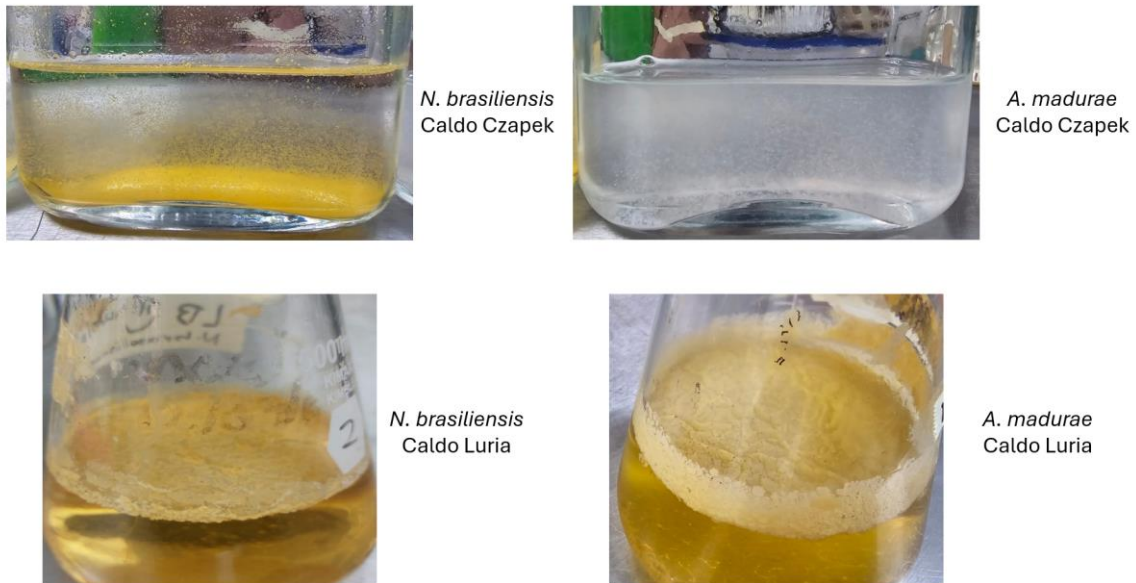
El crecimiento de *N. brasiliensis* en agar BHI presentó colonias con coloración naranja, pequeñas con consistencia seca y adherida fuertemente al agar, bordes rugosos, el aspecto de palomita de maíz se observó después de varios días de inoculación. Las morfologías observadas en ambos microorganismos sobre el agar BHI corresponder a las descritas en los antecedentes.



**Figura 8.** Colonias de *N. brasiliensis* crecidas en agar BHI.

## **2.- Crecimiento de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en medios de cultivo simples (Luria y Czapek).**

Las bacterias *A. madurae* y *N. brasiliensis* inoculadas en caldo Czapek y Luria mostraron aumento de biomasa con la presencia de pigmentos y diferentes morfologías a las crecidas en agar. En el caso de *A. madurae* inoculada en caldo Czapek la biomasa mostró una coloración rosa-blanco, así como el pigmento en el medio de cultivo, se observó un crecimiento del microorganismo en forma de pequeños gránulos; y en el caldo Luria la biomasa presentó una coloración blanca-amarillo, con crecimiento sobre la superficie, consistencia rugosa y dura. En *N. brasiliensis* inoculada en caldo Czapek la biomasa presentó una coloración naranja, así como el medio de cultivo, con crecimiento en forma de pequeños gránulos; y en el caldo Luria la biomasa fue blanco-amarillo con crecimiento sobre la superficie de aspecto rugoso y consistencia dura.



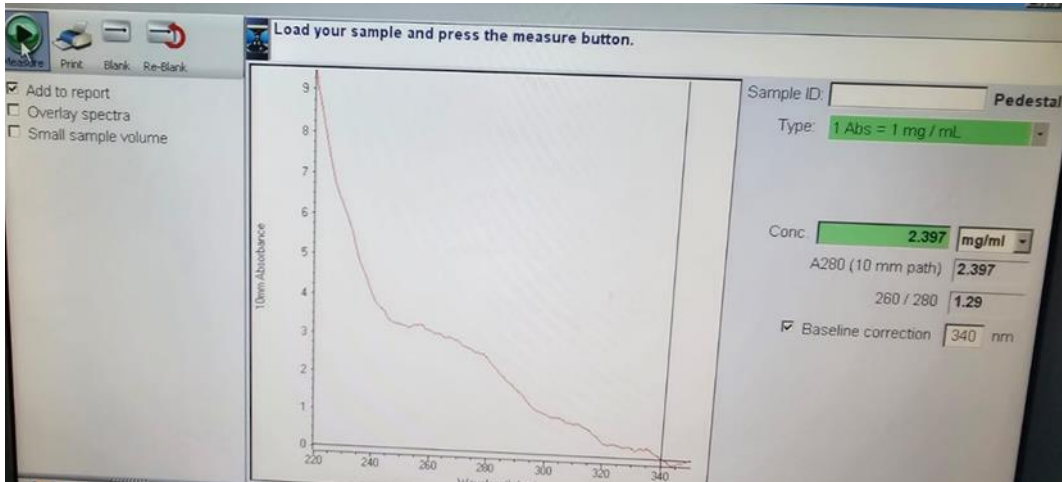
**Figura 9.** Inoculación de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en caldo Czapek y Luria. Los caldos Czapek se llevaron a cabo en botellas de vidrio para que tuvieran mayor espacio de crecimiento, volumen de 240 mL. Los caldos Luria se inocularon en matraces Erlenmeyer con 150 mL de medio de cultivo.

### 3.- Cuantificación de proteínas de secreción.

Las concentraciones de las proteínas de secreción purificadas se cuantificaron empleando el equipo NanoDrop, también se determinó su integridad por el espectro obtenido durante la lectura de las muestras, al observar dos picos que indican plegamientos correctos de las proteínas, la unidad de concentración fue en mg/mL, todas se obtuvieron por arriba del 1mg/mL a excepción de las de *N. brasiliensis* inoculadas en caldo Luria. Las concentraciones de las proteínas purificadas para cada uno de los microorganismos en los diferentes medios de cultivo se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4** Concentración de las proteínas secretadas medios simples (Caldo Czapek y Luria) de *N. brasiliensis* y *A. madurae* utilizando el espectrofotómetro NanoDrop.

Proteínas de secreción			
<i>Nocardia brasiliensis</i>		<i>Actinomadura madurae</i>	
Caldo Luria	Caldo Czapek	Caldo Luria	Caldo Czapek
0.0845 mg/mL	4.189 mg/mL	6.662 mg/mL	1.639 mg/mL
	3.397 mg/mL	6.578 mg/mL	1.135 mg/mL



#### 4.- Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de secreción sin marcador de pesos moleculares.

Se visualizaron los patrones de proteínas de secreción de las muestras de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en medios de cultivo Luria y Czapek por medio de la técnica de electroforesis SDS-PAGE (Figura 10, 11 y 12).

Primero se analizó el patrón proteico de secreción de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en el caldo Luria, debido a que su crecimiento fue más rápido que en el caldo Czapek. Para *A. madurae* se observa un patrón proteico de aproximadamente 15 bandas con diferentes pesos moleculares, para *N. brasiliensis* se mostraron 3 bandas con ligera intensidad (Figura10).

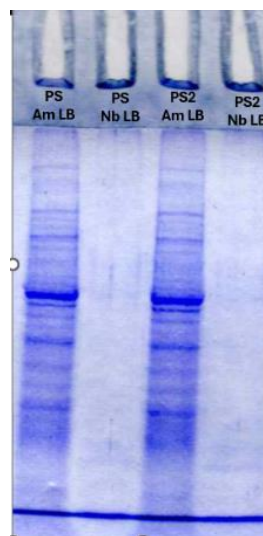


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de secreción de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en caldo Luria. Carril 1- Proteínas de secreción 1 de *A. madurae*, Carril 2- Proteínas de secreción 1 de *N. brasiliensis*, Carril 3- Proteínas de secreción 2 de *A. madurae* y Carril 4- Proteínas de secreción 2 de *N. brasiliensis*. Actinomicetos crecidos en caldo Luria. Geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie.

El patrón proteico de secreción de *A. madurae* y *N. brasiliensis* inoculadas en caldo Czapek se muestra en la Figura 11. Para *N. brasiliensis* se observaron aproximadamente 12 bandas con diferentes pesos moleculares y en el caso de *A. madurae* se observan 3 bandas una con mayor intensidad que las otras dos. También se comparó el patrón de proteínas purificadas del caldo Luria, en el caso de *A. madurae* se observa mayor número de bandas cuando está inoculada en caldo Luria que en Czapek. Para *N. brasiliensis* no se mostró comparación de bandas debido que la concentración proteica fue muy baja y casi indetectable en el gel de poliagrilamida como se mostró en la Figura 10 y en el caldo Czapek se observó la presencia de varias proteínas de secreción.

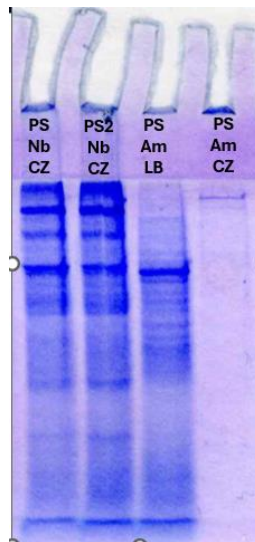
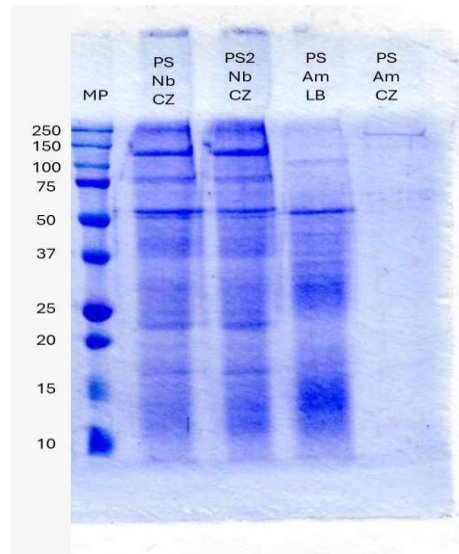


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de secreción de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en caldo Czapek. Carril 1- Proteínas de secreción 1 de *N. brasiliensis*, Carril 2- Proteínas de secreción 2 de *N. brasiliensis*, Carril 3- Proteínas de secreción de *A. madurae* purificado en caldo Luria y Carril 4- Proteínas de secreción de *A. madurae* purificado en caldo Czapek. Actinomicetos inoculados en caldo Czapek. Geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie.

## 5.- Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de secreción con marcador de pesos moleculares

En la figura 12 se puede observar que en el caso de *N. brasiliensis* las proteínas de secreción en el medio Czapek se tienen bandas de 250, 75, 61, 50, 24, 26, 15, 10 kDa. Y *A. madurae* presenta bandas de 250, 100, 61, 50, 30, 26, 24, 15 kDa de las proteínas de secreción en medio Luria y por último en medio Czapek se puede observar una banda de 150 kDa.



**Figura 4.** Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de secreción de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en caldo Luria y Czapek. Carril 1- Marcador de Pesos moleculares Dual color Bio Rad. Carril 2- Proteínas de secreción 1 de *N. brasiliensis* purificadas en caldo Czapek, Carril 3- Proteínas de secreción 2 de *N. brasiliensis* purificadas en caldo Czapek, Carril 4- Proteínas de secreción de *A. madurae* purificadas en caldo Luria y Carril 5- Proteínas de secreción de *A. madurae* purificadas en caldo Czapek. No se muestran las proteínas de *N. brasiliensis* en caldo Luria debido a que no se obtuvieron como se muestra en la Figura 10. Geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie.

## Discusión

En fuentes bibliográficas indican que los actinomicetos, pueden modificar su morfología dependiendo del medio y la temperatura en la que se desarrollan, algo que se pudo demostrar con claridad en esta investigación, ya que *N. brasiliensis* en caldo Luria como un color blanco-amarillento y en caldo Czapek amarillo, para el caso de *A. madurae* en caldo Czapek tuvo un aspecto rosa y en caldo Luria un pigmento blanco.

El autor Lucio Vera (1990), menciona que en el caso de *N. brasiliensis* se observó que las proteínas 61, 26 y 24 kDa, estimulan la producción de anticuerpos en

personas infectadas, sin embargo, no sé encontró más información en la literatura para el caso de *A. madurae* por lo que es importante realizar una investigación más exhaustiva en el laboratorio, ya que México es el país que presenta más casos de micetoma por su zona tropical, afectando principalmente a los campesinos, sin poder tener un tratamiento eficaz ya que el tratamiento que se prescribe es prologado, costoso y produce efectos secundarios.

## Conclusión

El medio en el que se encuentra mejor concentración de proteínas secretadas para el caso de *N. brasiliensis* fue Czapek y el caso de *A. madurae* fue Luria.

## Metas alcanzadas

La incubación de los actinomicetos en medios líquidos simples tardo un mes con caldo luria y tres meses con caldo Czapek, se obtuvo una buena cantidad de biomasa y de proteínas secretadas al medio.

Se logro precipitar las proteínas por salting out y cuantificarlas utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop) a 280 nm, en la electroforesis si se pudieron observar las bandas liberadas al medio.

## Recomendaciones

Utilizar los péptidos de 61, 26 y 24 kDa en la técnica de western blot para identificar cuáles son reconocidos por los anticuerpos del paciente y poderlos utilizar posteriormente como indicador de la presencia del microorganismo.

Estudiar los aspectos pirogénicos y tóxicos de estas proteínas.

## Referencias bibliográficas

Arenas, R., & Torres, E. (2014). Micología médica ilustrada. McGraw. México. Hill Book Co.

Condalab (2021). Czapek-Dok Modified Broth. Recuperado el 18 de noviembre del 2023 de <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1041-14466-caldo-czapek-dox-modificado.html>

Fernández, A., García, C., Saéz, J. & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recuperado el 05 de noviembre del 2024 de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>



Guevara, B. (2017). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. Organización Mundial de la Salud. (2022). Micetoma. Recuperado el 16 de noviembre del 2023 de <https://www.who.int/es/newsroom/factsheets/detail/mycetoma#:~:text=su%20gesti%C3%B3n%20cl%C3%ADnica.,Tratamiento,combinaci%C3%B3n%20de%20anti%20mic%C3%B3ticos%20y%20cirug%C3%ADa>

Jerez, R., Schafer, F., Fich, F., García, P., León, P. & González, S. (2012). Micetoma actinomicótico por *Actinomadurea madurae*. Revista chilena de infectología, 29(4), 459-463.

LABORATORIOS BRITANIA. (2011). Sabouraud Glucosado Agar. Recuperado el 04 de Octubre del 2024 de: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5af08a08a7afe.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5af08a08a7afe.pdf)

Lavalle, P., Padilla, M., Pérez, J., Rivera, I. & Reynoso S. (2000). Micetomas por *Actinomadurea madurae* en México. Rev Cent Dermatol Pascua, 9(1), 19-24.

López, R., Méndez, L., Bonifaz, A., Arenas, R., Mayorga, J., Welsh, O., Vera, L., Padilla, M., Contreras, C., Chávez G., Estrada, R., Hernández, F. & Manzano, P. (2013). Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. Gaceta Médica de México, 149, 586-592.

Palma, R., Castrillón, L., Castañeda, J., Muñoz, A., Mendoza, F. & Padilla, C. (2017). Fagocitosis de *Actinomadurea madurae* por macrófagos peritoneales murinos: estudio realizado por microscopía electrónica de transmisión. Rev Cent Dermatol Pascua, 26(3), 85-91.

Palma, R., Castrillón, L., Padilla, C. (2005). Caracterización histoquímica de micetoma por *Actinomadurea madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Madurella mycetomatis*. Rev Mex Dermatología, 49, 51-58.

Pérez, M., Soriano, J., Ponce, E. & Díaz, M. (2015). Electroforesis d<sub>z</sub> en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. NACAMEH. 9(2), 77-96.

Ramírez, S., Miranda, B. & Rodríguez, C. (2021). Purificación de proteínas. Mens. Bioquímico. 45. 35-47.

Ricardo, R. (2020). Caldo de cultivo: definición, medio y características. Recuperado el 17 de noviembre del 2023, de <https://estudyando.com/caldo-decultivo-definicion-medio-y-caracteristicas/>

Rochín, M., Zumara, M., Rodríguez, S. & Muñoz, V. (2020). Micetoma actinomicético, presentación de un caso. Revista Médica de la UAS, 10(2), 89-94.

Serrano, J. & Sandoval, A. (2003). El micetoma revisión. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 23, 70-79.

Suliman, H., Bakhiet, S. & Fahal, A. (2018). Mycetoma Research Centre. Recuperado el 20 de noviembre del 2023, de <https://www.gaffi.org/wp-content/uploads/Mycetoma-briefing-paper-final-September-2018.pdf>

Vera, L. & Molina C. (2021). Piel de Madura, Maduromicosis. Recuperado el 15 de noviembre del 2023, de <https://www.ammmac.org.mx/micetoma/>

Vera, L. (1990). Aislamiento y purificación de dos antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis*. Tesis de doctor en ciencias con especialidad en microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León.



## **Anexos**

### **Agar BHI:**

Disolver 52 g del medio en 1 L de agua desionizada. Calentar con agitación suave hasta completar disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente entre 45-50 °C y vaciar en placas Petri estériles.

### **Caldo Luria (LB)**

Triptona: 10.0 g  
Extracto de levadura: 5.0 g  
Cloruro de sodio: 5.0 g  
Agua deionizada c.b.p. 1000 mL

Se esteriliza a 15 libras de presión durante 15 minutos.

### **Caldo Czapek.**

Nitratol de sodio 3g  
Sacarosa 30g  
Fosfato dipotásico 1g  
Cloruro de potasio 0.5g  
Sulfato de hierro 0.01g  
Agua desionizada c.b.p. 1000mL

Se esteriliza a 15 libras de presión durante 15 minutos.

### **Solución de acrilamida-bisacrilamida**

Acrilamida: 29.2 g  
Bisacrilamida: 0.8 g  
Aforar a 100 mL

Se filtra la solución y se almacena a 4 °C

### **Buffer Tris-HCl 1.5M pH 8.8**

Tris base: 18.15 g  
Agua desionizada: 80 mL

Se ajusta el pH a 8.8 con HCl, se afora a 100 mL y se almacena a 4 °C.

### **Buffer Tris-HCl 0.5M pH 6.8**

Tris base: 6.0 g

Agua desionizada: 60 mL

Se ajusta el pH a 6.8 con HCl, se afora a 100 mL y se almacena a 4 °C.

### **Dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS)**

SDS: 10 g

Agua desionizada c.b.p: 100 mL

### **Persulfato de amonio (APS) al 10%**

APS: 100 mg

Agua desionizada c.b.p: 1 mL

### **Buffer de corrida 10X**

Tris base: 30.3 g

Glicina: 144.0 g

SDS: 10 g

Agua desionizada c.b.p: 1000 mL

Para el corrimiento del gel se utiliza al 1X, diluir 1:10

### **Azul de Coomasie**

Azul de Coomasie R250: 0.5 g

Metanol: 200 mL

Ácido acético glacial: 50 mL

Agua desionizada c.b.p: 500 mL

Para teñir el gel se deja interactuando con el colorante durante 30 minutos.

### **Solución desteñidora**

Metanol: 80 mL

Ácido acético glacial: 20 mL

Agua desionizada: 100 mL

## **Metodología para Obtención de proteínas de secreción y Electroforesis SDS-PAGE.**

### **Obtención de proteínas de secreción en los medios de cultivo simples para cada cepa bacteriana.**

Pasado el tiempo de incubación de los medios de cultivo Luria Y Czapek se centrifugaron a 7,000 rpm/15 min. Los sobrenadantes se separaron de la biomasa para su posterior tratamiento. A los sobrenadantes se les añadieron sulfato de amonio al 75% de saturación, con agitación baja y constante hasta observar la disolución de los cristales de sulfato de amonio, las muestras se dejaron reposando durante la noche a 4 °C. Pasado este periodo se centrifugaron a 8,000 rpm/45 min, los sobrenadantes se retiraron y los precipitados obtenidos se resuspendieron en 2 mL de solución salina al 9%; estas muestras fueron introducidas en membranas para diálisis (la cual fue activada previamente en agua desionizada hirviendo durante 10 min.), y se dializaron contra 1 L de agua desionizada durante 24 horas con dos cambios cada 24 horas. Terminado el tiempo de diálisis las muestras se retiraron de la membrana de diálisis y se colocaron en microtubos de 1.5 mL, para centrifugarlos a 14,000 rpm/5 min, los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron en microtubos de 1.5 mL nuevos a -20°C, hasta su uso.

### **Preparación del gel separador y concentrador.**

Se preparó un gel separador al 10% agregando 4.1 mL de agua desionizada en un tubo cónico de 50 mL, después se adicionaron 3.3 mL de la solución de acrilamida al 30%, 2.5 mL del *buffer* tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 100 µL de SDS y finalmente 10 µL de la solución de TEMED y 100 µL de persulfato de amonio al 10%. 4.5 mL de dicha mezcla se agregó entre los dos cristales, posteriormente se adicionaron 200 µL de isopropanol para alinear el borde del gel. El gel concentrador se preparó al 4%: En otro tubo cónico de 50 mL se agregaron 6.1 mL de agua desionizada, 1.3 mL de la solución de acrilamida al 30%, 2.5 mL del *buffer* tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 100 µL de SDS y para polimerizar la solución se agregaron 10 µL de TEMED y 100 µL de persulfato de amonio al 10%. Antes de agregar la solución se eliminó el isopropanol posteriormente se agregó la mezcla hasta el borde del cristal pequeño y se insertó el peine de 10 pozos. Una vez listo el gel se montó en la cámara de corrimiento agregando *buffer* de corrida 1X en las dos cámaras.