



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE SISTEMAS
BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Línea de investigación

ESTUDIO DE LA RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO EN INFECCIONES
DERMATOLÓGICAS.

Título:

Obtención de proteínas de pared celular de *Nocardia brasiliensis* y
Actinomadura madurae.

Asesores: Dra. Laura Estela Castrillón Rivera 8140
Dra. Violeta Karen Espinosa Antúnez 42345

Alumna: León Moya María Alinary

Matricula: 2202036326

Lugar de realización:

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

Fecha de inicio y terminación: 20 de mayo 2024 / 21 de noviembre de 2024


Dra. Laura Estela Castrillón Rivera


Dra. Violeta Karen Espinosa Antúnez

Introducción	3
Antecedentes	4
Micetoma	4
Actinomicetoma.	5
Actinomicetos	6
Patogenia	8
Diagnóstico	9
Cultivos	9
Biopsias.	9
Métodos de identificación de A. madurae y N. brasiliensis.	10
Análisis microscópico.	10
Cultivos.	12
Pruebas Bioquímicas.	12
Tratamiento.	13
Caracterización proteica.	13
Métodos de obtención y purificación de proteínas.	15
Justificación	18
Planteamiento del problema	18
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Metodología.	20
Inoculación de N. brasiliensis y A. madurae en medios de cultivo líquidos.	20
Purificación de proteínas de pared.	20
Cuantificación de proteínas.	21
Determinación de patrones y pesos moleculares en electroforesis SDS-PAGE	21
Resultados y Discusión.	21
Activación de cepas de N. brasiliensis y A. madurae.	21
Crecimiento de N. brasiliensis y A. madurae en medios de cultivo líquido.	23
Cuantificación de proteínas.	25
Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de pared de N. brasiliensis y A. madurae.	26
Conclusión	29
Metas alcanzadas	30
Recomendaciones	30
Referencias bibliográficas	30
Anexos	33

Introducción

Los actinomicetos son un grupo amplio de bacterias Gram positivas, aerobias y mesófilas que presentan un crecimiento en forma de filamentos ramificados. Se encuentran habitando principalmente el suelo forestal y participan en la degradación de materia orgánica. Algunos de ellos son agentes causales del actinomicetoma, infección dérmica de tipo crónica, localizada, progresiva e inflamatoria, clínicamente se caracteriza por lesiones en forma de nódulos, abscesos y fístulas que drenan un material seroso o purulento, en la epidermis se forman granos, que son agregados del agente causal rodeados de exopolisacárido autoproducido. (Navarro *et al*, 2022) (Bonifaz, 2015). Esta enfermedad infecciosa es prevalente en personas que trabajan en el campo (agricultores, jardineros, etc.), la vía de entrada de estos microorganismos al tejido subcutáneo es por medio de la implantación a través de un traumatismo, con objetos presentes en el suelo como son astillas, espinas, clavos, piedras, etc., las áreas anatómicas más afectadas son las extremidades expuestas como son los pies, manos y piernas, la progresión de la infección compromete a tejidos blandos, articulaciones y huesos (Bonifaz *et al*, 2022). En México, el 80% de los casos reportados de actinomicetoma son inducidos por el agente causal *Nocardia brasiliensis* y el 10% corresponden a *Actinomadura madurae*.

Para que un caso clínico sea considerado actinomicetoma debe haber una herida previa y después la formación de una úlcera en la piel, la mayoría de las veces la herida puede estar contaminada con microorganismos presentes en el ambiente que no tienen ninguna relación con el agente causal y por ende dificultan el diagnóstico. Por lo tanto, el diagnóstico del actinomicetoma se basa principalmente en la demostración de los granos en el tejido subcutáneo y el aislamiento e identificación del agente causal a partir de los granos en medios de cultivo (Serrano *et al*, 2007). 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 NaOH al 10%, en el caso de *A. madurae* los granos son visibles, coloración negra y forma oval, en el caso de *N. brasiliensis* los granos son pequeños con forma arriñonada difícil de observar al microscópico, por lo cual se requiere del aislamiento del agente causal para su identificación. El diagnóstico histopatológico de los granos se lleva a cabo cuando no hay emisión de granos por medio de las fístulas, los cortes histológicos se tiñen con hematoxilina-eosina analizando la forma de los granos, así como la respuesta inmunológica. El tratamiento del

actinomycetoma depende la etiología de la infección, se basa principalmente con los antibióticos trimetoprima-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 el tratamiento con antibióticos es prolongado por meses o un año. Por lo tanto, en el presente proyecto se obtuvieron las proteínas de pared de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en diferentes medios de cultivo (BHI, Luria-Bertani y Czapek), para determinar el patrón proteico presente en la pared de dichos actinomycetos, para posteriormente ser empleados como posibles moléculas profilácticas, para la estimulación de la respuesta adaptativa en el padecimiento del actinomycetoma o de diagnóstico molecular por medio de la prueba de ELISA, para estos microorganismos.

Antecedentes

Micetoma

El micetoma es una infección crónica e inflamatoria causada por hongos y bacterias. Se manifiesta después de que el patógeno se introduce por cortes en el tejido subcutáneo, dando lugar a lesiones nodulares y estructuras granulares (Figura 1). Esta afección se caracteriza por un aumento de volumen, endurecimiento y deformación en la zona afectada, junto con la presencia de material purulento (Cárdenas, *et al.* 2020) (Santiago-Tellez *et al.*, 2019).

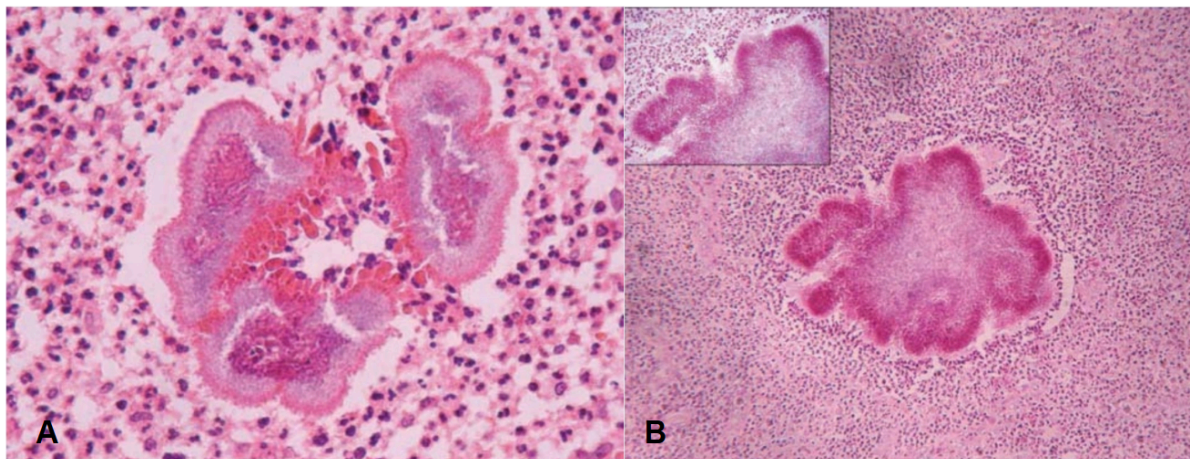


Figura 1. Biopsia A) grano de *Nocardia sp* B) grano de *Actinomadura madurae* (Hematoxilina y eosina, 40x). (Bonifaz, 2015)

suelo, esta ubicación en el medio ambiente natural se refleja en la presentación de casos clínicos que en su mayoría ocurren en el pie, por heridas causadas por astillas, espinas, clavos, piedras etc. Una vez presente en el tejido subcutáneo las proteínas presentes en la pared celular del agente causal desempeñan un papel crucial en la adherencia a las células presentes en el tejido, así como la evasión de la respuesta del sistema inmunológico (Hao *et al*, 2022).



Figura 3. Presentación clínica de actinomicetomas en extremidades inferiores. (A) Actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis* con múltiples nódulos y granulación superficial. (B) Actinomicetoma causado por *Actinomadura madurae* con lesiones nodulares y deformidad visible. (Bonifaz, 2015)

Actinomicetos

Son las bacterias responsables de los actinomicetomas, presentan un crecimiento en forma de filamentos hasta formar micelio. Los principales géneros causantes de actinomicetomas son *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces* (Tabla 1) (Bonifaz, 2015).

Tabla 1: Principales actinomicetos productores de actinomicetoma “Bonifaz, 2015”.

Género	Especie
<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i> <i>brasiliensis</i> <i>mexicana</i> <i>otitidiscaviarum</i> <i>trasvalensis</i>
<i>nocardiosis</i>	<i>dassonvillei</i>
<i>Actinomadura</i>	<i>madurae</i> <i>pelletieri</i> <i>vinaceae</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>somaliensis</i> <i>sudanensis</i>

En México, se reporta una alta incidencia de actinomicetomas, con más de 4,000 casos documentados. Aproximadamente el 80% de estos casos son causados por *Nocardia brasiliensis* y el 10% por *Actinomadura madurae* (Lopez-Martinez et al, 1992).

Actinomadura madurae es una bacteria aerobia, grampositiva, con filamentos y micelio no tabicado. Su micelio aéreo tiene hifas y esporas en cadenas cortas o largas, de superficie lisa o a veces verrugosa. La pared celular de esta bacteria contiene ácido meso-diaminopimélico y grandes cantidades de galactosa (Bonifaz et al, 2022).

Nocardia brasiliensis es una bacteria grampositiva, filamentosa, parcialmente ácido-alcohol resistente y con capacidad intracelular facultativa (Ji et al, 2018). En comparación con *N. brasiliensis*, el actinomicetoma causado por *A. madurae* tiende al producir menos lesiones inflamatorias y clínicamente se asemeja más al eumicetoma, desarrollando un proceso fibrótico significativo con la formación de granos macroscópicos. La infección por *A. madurae* es más común en mujeres, a diferencia de otras infecciones causadas por hongos y otros actinomicetos, posiblemente debido a la influencia hormonal (Ji et al, 2018) (Licón-Trillo et al, 2003).

Patogenia

La patogenicidad de un microorganismo es la habilidad del agente microbiano para causar una infección, la virulencia es el grado de patogenicidad de los microorganismos, es decir es el grado de daño que puede causar a un hospedero. La patogenicidad y por ende la virulencia de los microorganismos se relaciona principalmente con las proteínas presentes en la pared celular, dichas proteínas son factores de virulencia, que le permiten al microorganismo adherirse a las células del hospedero, evadir los mecanismos de acción del sistema inmunológico, adquirir nutrientes, secreción de proteínas, azúcares, toxinas, etc. (Hao *et al*, 2022). En el caso de los actinomicetos son considerados patógenos primarios, debido a que causan infecciones en individuos inmunocompetentes. (Arenas *et al*, 2022).

Los actinomicetos ingresan al cuerpo humano a través de cortes en la piel, causados por objetos afilados como astillas de madera o espinas. Una vez en el tejido subcutáneo del hospedero, proliferan hasta formar granos, desencadenando respuestas inflamatorias locales y sistémicas. La infección comienza con una etapa de adaptación del microorganismo en el sitio de la lesión, con un tiempo de incubación variable que puede durar meses o años. Esto conlleva al crecimiento lento del agente infeccioso, formando masas compactas de micelio denominados "granos", pequeños e indoloros (Lavalle *et al*, 2000). A medida que el microorganismo prolifera, el cuerpo genera las primeras reacciones inflamatorias con la acumulación de neutrófilos, liberación de citocinas y de diversas enzimas (Siddig *et al*, 2021) (Castrillón-Rivera *et al*, 2020).

La infección avanza al tejido subcutáneo, creando un líquido purulento o serosanguinolento, hinchazón y la presión del nódulo. Eventualmente, esto rompe la barrera cutánea, formando senos de drenaje y expulsión de granos. Si no se da un tratamiento adecuado, puede ocurrir una reinfección, extendiéndose a tejidos circundantes no infectados hasta alcanzar músculos, tejido conjuntivo y óseo (Hao *et al*, 2022; Trujillo, 2020).

Diagnóstico

Cultivos

Los granos, también llamados microcolonias son la fuente de material para la realización del cultivo, como condición, deben estar vivos y libres de contaminantes. También se pueden utilizar las secreciones filamentosas de la zona afectada para el cultivo. El proceso puede llevarse a cabo en medios como el micosel, dextrosa Sabouraud o medios nutritivos, como la infusión cerebro-corazón (en caldo o gelosa), incubándose generalmente entre 2 a 3 semanas a una temperatura de 30 o 37°C, o incluso en una atmósfera con CO₂. En el caso de *Nocardia brasiliensis*, las colonias que se desarrollan tienen un color blanco-amarillento, son secas y se asemejan a las palomitas de maíz. Esta bacteria es Gram-positiva y presenta una resistencia variable al ácido-alcohol. Además, *Nocardia brasiliensis* es capaz de hidrolizar la caseína y licuar la gelatina, características que la distinguen de otros actinomicetos responsables del micetoma. También es relevante el cultivo a distintas temperaturas y el análisis de la actividad proteolítica, el uso de azúcares y de compuestos nitrogenados (Serrano, 2003).

Biopsias.

Tanto los granos como las muestras de tejidos (biopsias), se analizan bajo el microscopio óptico utilizando técnicas histopatológicas. Las muestras, una vez fijadas en solución de formaldehído al 10% e incluidas en parafina, pueden ser teñidas con hematoxilina-eosina (HE) u otros métodos. Estas observaciones permiten identificar la respuesta tisular frente a la infección causada por el agente etiológico del actinomicetoma o eumicetoma, además de describir características del "grano", como su forma y tamaño. A través de la observación de los granos, es posible diferenciar el agente causante (a nivel de género), determinando si se trata de un actinomiceto o un eumiceto. Sin embargo, esta técnica no reemplaza al cultivo (Serrano, 2003).

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

Análisis microscópico.

Tinción Gram.

Esta técnica de tinción diferencia a las bacterias de acuerdo con la composición de su pared celular (Tortora,2007), como ya se ha mencionado las bacterias *A. madurae* y *N. brasiliensis* son grampositivas (Figura 4).

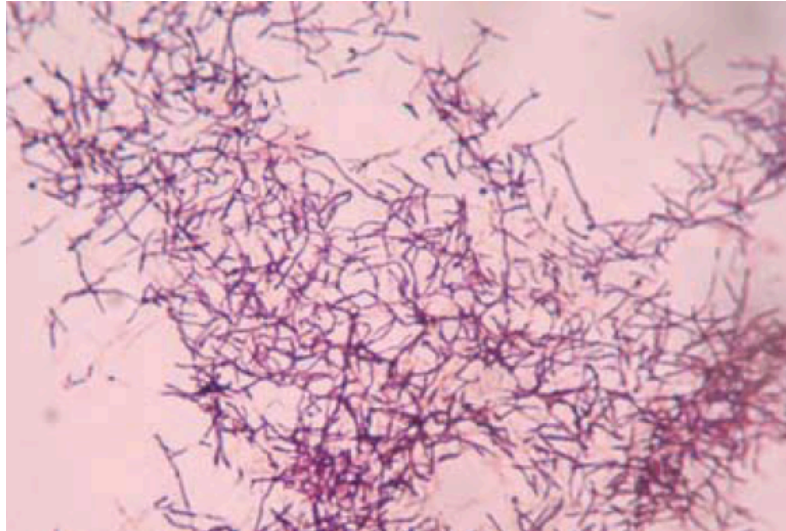


Figura 4. *Actinomadura madurae* (60x Gram). (Bonifaz, 2015)

Lugol.

Se utiliza para observar los granos provenientes de actinomicetomas, principalmente como un contraste para observar las características morfológicas. (Figura 5) (Bonifaz, 2015)



Figura 5. Grano de *Actinomadura madurae* (100x Lugol). (Bonifaz, 2015)

Ziehl-Neelsen.

Esta tinción permite el reconocimiento de las estructuras de organismos con características ácido-alcohol resistente tales como *A. madurae* y *N. brasiliensis* (Figura 6). (Bonifaz, 2015)

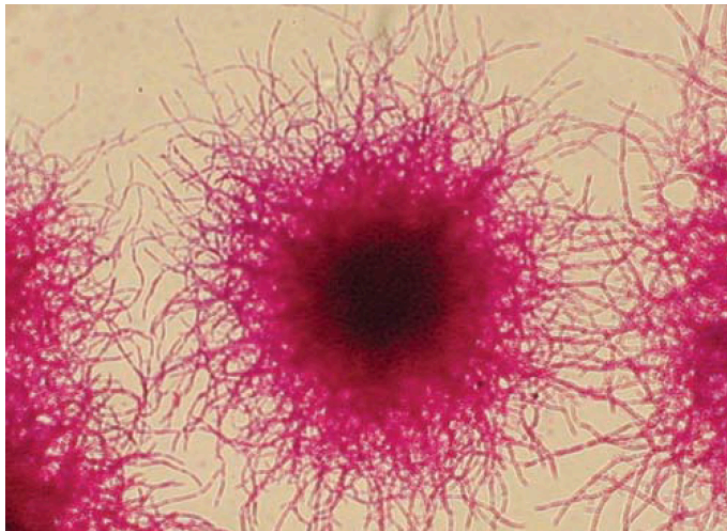


Figura 6. *Nocardia brasiliensis* (100x, Ziehl Neelsen). (Bonifaz, 2015)

Ácido Peryódico de Schiff (PAS).

Las muestras histológicas recolectadas de actinomicetomas han dado positivo a la tinción de PAS, por lo que este método demuestra ser viable para la identificación de los actinomicetos (Figura 7). (Lo-Muzio, 2014)

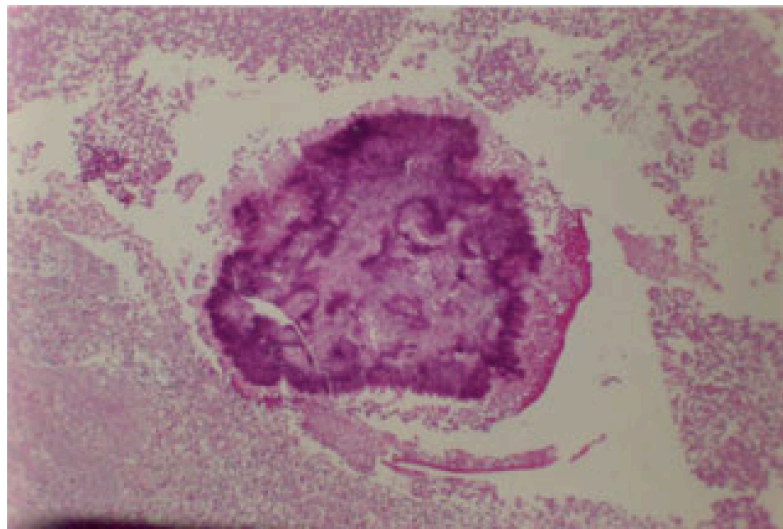


Figura 7. Corte de un actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, (ácido peryódico de Schiff. 40X.) (Ramos *et al*, 2005)

Cultivos.

Agar Lowenstein-Jensen.

Este agar selectivo es principalmente usado para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, pero debido a que la exigencia nutritiva es similar a la de *A. madurae* es también posible para que se use en la determinación de la bacteria (Bonifaz, 2015).

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 (LABORATORIOS BRITANIA, 2011).

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 del microbiota de la piel (LABORATORIOS BRITANIA, 2011).

Agar Sangre

El medio de cultivo se enriquece con infusión de músculo cardiaco y peptona, componentes que le confieren un alto valor nutritivo, adecuado para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos aquellos con requerimientos nutricionales elevados. La adición de un 5–10 % de sangre ovina desfibrinada estéril favorece el crecimiento de bacterias fastidiosas y permite una adecuada visualización de las reacciones hemolíticas.

Pruebas Bioquímicas.

Estas pruebas son utilizadas para diferenciar a las bacterias de acuerdo con sus actividades enzimáticas (Tortora, 2007). En la Tabla 2 se enlistan las pruebas bioquímicas para las bacterias *A. madurae* y *N. brasiliensis*.

Tabla 2: Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *N. brasiliensis* y *A. madurae*. (Arenas, R *et al* ,2014)

Bacteria	Prueba bioquímica					
	Xantina	Tirosina	Fusión de gelatina	Hipoxantina	Ureasa	Caseína
<i>N. brasiliensis</i>	-	+	+	+	+	+
<i>A. madurae</i>	-	+/-	+/-	+	-	+

+positiva, -negativa y +/-prueba positiva o negativa.

Tratamiento.

En el caso de los tratamientos de actinomicetoma, se han utilizado con éxito varios antibióticos, como trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, rifampicina, dapsona, tetraciclina, ciprofloxacina y sulfato de estreptomina, aunque se recomienda combinar estos fármacos para aumentar la eficacia y prevenir la resistencia antibiótica de los actinomicetos (Salinas-Carmona *et al*, 1997).

La duración del tratamiento suele ser prolongada, generalmente entre 3 meses y 1 año, dependiendo del grado de afectación. En situaciones que requieren cirugía, se aconseja el uso de antibióticos apropiados. Este enfoque es adecuado para lesiones localizadas o para pacientes que no responden a la terapia antimicrobiana. Es importante tratar el actinomicetoma, ya que puede tener consecuencias graves, como deformidades, discapacidades o en casos extremos el fallecimiento del paciente (Bonifaz *et al*, 2022).

Caracterización proteica.

El tratamiento del actinomicetoma ha evolucionado con el tiempo; sin embargo, aún enfrenta importantes desafíos, como la resistencia a los antibióticos y la necesidad de terapias prolongadas. En este contexto, el estudio de las proteínas presentes en la pared celular de las bacterias causantes, como *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*, representa una estrategia clave para mejorar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Las técnicas microbiológicas convencionales suelen ser lentas y no permiten distinguir con precisión estas infecciones de otras de origen cutáneo, como las causadas por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*. Además, la estrecha relación de *N. brasiliensis* con *Mycobacterium tuberculosis*, junto con la

falta de antígenos purificados específicos, da lugar a reactividad cruzada con sueros de pacientes con lepra o tuberculosis, dificultando el diagnóstico certero. Por ello, avanzar en la caracterización proteica podría conducir a la identificación de biomarcadores más específicos, facilitando tanto el diagnóstico oportuno como el desarrollo de terapias más eficaces (Ji *et al*, 2018).

Parte de los estudios de identificación de proteínas ubicadas en la pared celular de los actinomicetos, se dan por la recolección de muestras histológicas, ya sea de pacientes con micetomas o de animales de laboratorio.

Uno de los estudios más relevantes en la caracterización proteica de *Nocardia brasiliensis* fue realizado en 1992 por Vera-Cabrera *et al.*, cuyo objetivo principal fue describir el proceso de obtención y purificación de proteínas a partir de cultivos de la bacteria aislados de pacientes con micetoma utilizando métodos fisicoquímicos clásicos. En dicho estudio, se identificaron dos proteínas específicas, denominadas P61 y P24 por su peso molecular (61 kDa y 24 kDa, respectivamente). Estas proteínas sólo fueron reconocidas por sueros de pacientes infectados con *N. brasiliensis* y no por individuos sanos ni por pacientes con otros tipos de micetoma, lo que permitió sugerir su uso como marcadores serológicos para diagnóstico específico.

La relevancia de estas proteínas no se limitó únicamente a su valor diagnóstico: también observaron que ambas eran capaces de inducir una respuesta de anticuerpos en el hospedero, a lo que sugieren un papel en los mecanismos de inmuno-patogenicidad durante la infección. En consecuencia, el enfoque del estudio también estuvo orientado a ampliar el conocimiento sobre cómo interactúa *N. brasiliensis* con el sistema inmune humano, y a identificar posibles blancos antigénicos clave para futuras investigaciones terapéuticas.

En estudios más recientes, los investigadores Ji *et al* en 2018, utilizaron un enfoque molecular distinto, basado en técnicas de DNA recombinante, para identificar epítomos inmunodominantes de la proteína P61. A través de la generación de siete anticuerpos monoclonales (mAbs), se logró mapear tres epítomos específicos dentro de la secuencia de la proteína. Mediante análisis estructurales y técnicas de mapeo por modelado tridimensional (SWISSMODEL y PyMOL), se confirmó que estos epítomos se localizan en la superficie externa de la proteína, lo que los convierte en candidatos ideales para el desarrollo de pruebas diagnósticas. Aunque algunos epítomos mostraron baja reactividad por separado, su combinación en péptidos más largos permitió una mejor detección por sueros infectados, lo cual resalta la

importancia de considerar la estructura tridimensional en el diseño de herramientas serológicas. Este enfoque permite avanzar hacia el desarrollo de pruebas ELISA específicas y con menor riesgo de reacciones cruzadas con otras bacterias similares.

Además, otros trabajos como el de Vázquez et al. han reportado la presencia de estas mismas proteínas (P61 y P24), junto con la identificación adicional de una proteasa asociada a la patogenicidad. En este estudio, realizado en un modelo murino (ratones BALB/c), infectado experimentalmente con *N. brasiliensis*, las proteínas fueron obtenidas mediante técnicas de electroforesis y análisis de extractos de tejido infectado. Se destacó la participación de la proteasa en la destrucción de tejido óseo y su posible implicación en la severidad de las lesiones, lo que sugiere un papel relevante no solo en el diagnóstico, sino también en la comprensión de los mecanismos de patogenicidad.

Métodos de obtención y purificación de proteínas.

La purificación de proteínas consiste en procedimientos destinados a aislar una proteína específica a partir de una mezcla. La elección del método de purificación depende de las propiedades fisicoquímicas de cada proteína, ya que estas poseen un grupo amino y un grupo carboxilo y una cadena lateral que influye en su comportamiento. Entre las técnicas más comunes se encuentran la cromatografía de filtración en gel (basada en el peso molecular), la cromatografía de intercambio iónico (basada en las cargas de la cadena lateral de las proteínas) y la precipitación con sales o solventes (basada en la hidrofobicidad) (Ramírez *et al*, 2021). La aplicación de estos métodos permite asignar actividades biológicas específicas a proteínas que anteriormente no podían ser estudiadas bioquímicamente, lo que favorece su aprovechamiento en áreas como la investigación, el diagnóstico y la terapia (Janson, 2011).

Tabla 3. Métodos de obtención de proteínas (Grabski, 2009) (Janson, 2011)
(Kwon *et al*, 2015).

<u>Método</u>	<u>Fundamento</u>
Métodos físicos	
Sonicación	La sonicación se basa en las fuerzas de corte creadas por las vibraciones ultrasónicas de alta frecuencia generadas por la resonancia (15–25 kHz) de una sonda, Las ondas de presión acústica generadas provocan el colapso de microburbujas formadas, y su implosión genera ondas de choque con suficiente energía para romper las paredes celulares, lo que provoca la liberación del contenido celular al medio.
homogeneización mecánica	Disrupción celular mecánica mediante licuadoras, homogeneizadores o perlas de vidrio. La técnica bead milling emplea agitación con perlas para romper células, siendo su eficiencia dependiente de la concentración celular, tamaño y tipo de perlas, proporción con la suspensión, tiempo e intensidad del proceso.
Congelación	Este método consiste en congelar las células utilizando un baño de hielo seco con etanol o mediante un congelador, seguido por su descongelación a temperatura ambiente o a 37 °C. Durante este proceso, la formación de cristales de hielo provoca la ruptura de la membrana celular, aumentando su permeabilidad y favoreciendo la liberación del contenido intracelular.
Métodos químicos	
Lisis enzimática	Algunas células poseen, a parte de la membrana plasmática, una pared celular rígida que confiere a las células forma, protección y rigidez. Estas paredes pueden ser digeridas con enzimas específicas
Detergentes	Para extraer proteínas unidas a membranas o agregadas por interacciones hidrofóbicas, se utilizan detergentes o agentes caotrópicos. Los detergentes solubilizan las membranas al romper interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína, gracias a su estructura anfipática con una cabeza polar y una cola hidrofóbica

Tabla 4. Métodos de purificación de proteínas. (Janson, 2011) (Ramírez *et al*, 2021) (Roca *et al*, 2003)

Método	Fundamento
Salting out	<p>Constituye una opción frecuentemente empleada en la purificación de proteínas, especialmente ante extractos altamente complejos o cuando se trabajan con grandes volúmenes de muestra. Los iones anti caotrópicos promueven la precipitación proteica al aumentar el efecto hidrofóbico, mientras que los caotrópicos lo reducen y favorecen la solubilidad. Es recomendable trabajar a baja temperatura para evitar la desnaturalización de proteínas</p>
Electroforesis SDS-PAGE	<p>La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), es una técnica ampliamente utilizada para la separación de proteínas en función de su tamaño y/o carga, basada en su migración a través de una matriz porosa bajo un campo eléctrico. A diferencia de los geles de agarosa, los de poliacrilamida permiten obtener poros más pequeños y controlados, lo que favorece la resolución de biomoléculas de bajo peso molecular, como muchas proteínas. El tamaño de poro depende de la concentración total de acrilamida y del agente entrecruzante (usualmente bisacrilamida), y puede ajustarse para formar geles homogéneos o con gradientes</p> <p>La técnica SDS-PAGE, una variante desnaturalizante, utiliza el detergente aniónico SDS para romper las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, formando complejos proteína-SDS cuya migración depende únicamente del peso molecular. Esta separación puede complementarse con la reducción de puentes disulfuro mediante agentes como DTT o 2-mercaptoetanol, mejorando la linealidad entre peso molecular y movilidad. La PAGE puede realizarse en geles en columna o en láminas delgadas, y permite el análisis simultáneo de múltiples muestras. Posterior a la corrida, las proteínas deben fijarse al gel mediante agentes como ácido tricloroacético o ácido acético para evitar su pérdida y facilitar su visualización mediante tinciones específicas. La estabilidad y claridad de los geles de poliacrilamida, junto con su baja electroendosmosis, los convierten en una matriz ideal para análisis bioquímicos de alta resolución</p>

Justificación

En el síndrome del actinomicetoma se ha observado que el tratamiento y el diagnóstico son procedimientos muy complejos de llevar a cabo en la práctica clínica. El tratamiento consta de una terapia con antibióticos, el más empleado contra el padecimiento es el trimetoprima-sulfametoxazol o combinado con otros como son amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, rifampicina o DDS (diamino-difenil-sulfona), durante varios 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 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 presentes en la pared celular de *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae* para posteriormente ser empleadas como moléculas con uso profiláctico para estimular la respuesta adaptativa en el padecimiento del actinomicetoma o de diagnóstico molecular (pruebas de ELISA), para dichos microorganismos.

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 completamente el agente etiológico del tejido cutáneo, debido a que se ha reportado la recurrencia de la infección cuando se dejan 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 que es la extracción de biopsia para su posterior análisis. Por lo que es importante contar con antígenos para brindar tratamiento profiláctico estimulando la respuesta inmunológica y de diagnóstico molecular (ELISA), para este síndrome.

En este contexto, la identificación de proteínas inmunorreactivas o antígenos específicos es fundamental tanto para el desarrollo de herramientas de diagnóstico menos invasivas, como para el diseño de posibles estrategias profilácticas. Para

lograrlo, es necesario optimizar las condiciones de cultivo bacteriano que permitan una adecuada expresión de proteínas de interés.

El uso de medios de cultivo simples y complejos permite evaluar cómo diferentes condiciones nutricionales influyen en la expresión del perfil proteico de estas bacterias. Esta comparación puede ser clave para identificar proteínas de pared celular relevantes desde el punto de vista inmunológico, ya que ciertos antígenos pueden expresarse de forma diferencial dependiendo del medio utilizado. Por ello, el estudio propone analizar los patrones proteicos obtenidos en ambos tipos de medios, con el fin de seleccionar los más adecuados para la obtención de posibles inmunógenos.

Objetivo General

Purificar proteínas de pared celular como posibles inmunógenos de *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*, evaluando el efecto del uso de medios de cultivo simples y complejos.

Objetivos Específicos

- 1) Obtener proteínas de pared celular de *Nocardia brasiliensis* por el método de sonicación.
- 2) Obtener proteínas de pared celular de *Actinomadura madurae* por el método de sonicación.
- 3) Cuantificar las proteínas purificadas por método colorimétrico y espectrofotométrico.
- 4) Determinar las diferencias en los patrones de expresión proteica de *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae* al ser cultivadas en medios de cultivo simples y complejos.
- 5) Determinar el patrón proteico por medio de Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.

Metodología.

Inoculación de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en medios de cultivo líquidos.

Se inocularon las cepas conservadas en glicerol de *N. brasiliensis* ATCC 19296 y *A. madurae* STCC 3043 en agar BHI, se incubaron a 37°C durante 5 días o hasta observar crecimiento.

Se describieron las características macroscópicas de las bacterias, además de realizar pruebas bioquímicas correspondientes a las especies.

De los cultivos realizados con *N. brasiliensis* y *A. madurae* agar BHI se inocularon los caldos Luria-Bertani, BHI y Czapek, 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.

Purificación de proteínas de pared.

Se separó la biomasa de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en condiciones de esterilidad de los caldos Luria, BHI y Czapek por centrifugación a 5,500rpm/35min. Los pellets formados se conservaron y se resuspendieron en aproximadamente 50mL de solución salina estéril, para realizar las suspensiones de los microorganismos, la cual se llevó a cabo disgregando las conformaciones filamentosas con el empleo de perlas de vidrio y agitación constante hasta observar una suspensión homogénea.

Las suspensiones bacterianas se sometieron a sonicación, durante 5 ciclos de 30 minutos con una amplitud del 70% (15 minutos de sonicado con 15 minutos de descanso), finalizados los procesos de sonicación se centrifugaron las muestras a 7,000rpm/20min para eliminar las células sin lisar y el sobrenadante se recolectó ya que contiene las macromoléculas liberadas. Esta metodología se lleva a cabo para los microorganismos crecidos en los diferentes medios de cultivo. Las proteínas obtenidas por el proceso de sonicación de *N. brasiliensis* y *A. madurae* se conservaron en tubos eppendorf estériles a una temperatura de -20 °C para sus posteriores análisis.

Cuantificación de proteínas.

Se identificaron las proteínas obtenidas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en BHI, LB y Czapek, la cuantificación se llevó a cabo por el método de espectrofotométrico empleando el equipo NanoDrop a una longitud de onda de 280 nm, el blanco de calibración fue solución salina y se identificó que el espectro mostrará dos picos que corresponden a las proteínas. Los resultados se registraron en unidades de mg/mL.

Determinación de patrones y pesos moleculares en electroforesis SDS-PAGE

Se llevó a cabo la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE para determinar el patrón proteico y pesos moleculares de las proteínas obtenidas. Primero se preparó el gel separador al 10% y el gel concentrador al 4%, las proteínas obtenidas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* de los medios de cultivo BHI, Luria y Czapek se colocaron en microtubos de 0.5mL con 15 mL de proteínas y 5 mL buffer de carga, posteriormente se calentaron en baño maría con agua a ebullición durante 6 min., pasado el tiempo de calentamiento se cargaron en los pozos del gel, en 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 vacío para su conservación.

Resultados y Discusión.

Activación de cepas de *N. brasiliensis* y *A. madurae*.

Las cepas almacenadas en glicerol a -20°C se inocularon en Agar BHI, las cuales mostraron las siguientes características:

El crecimiento de *N. brasiliensis* sobre gelosa BHI (Figura 8A), mostraron el crecimiento de pequeñas colonias que tomaron una coloración naranja, consistencia seca, textura rugosa, similar al aspecto de palomita de maíz.

El crecimiento de *A. madurae* sobre gelosa BHI (Figura 8B), mostró pequeñas colonias con un tono blanco-rosa, de consistencia seca, superficie rugosa, borde ondulado, opaca y adheridas fuertemente al agar. Las observaciones de las características de crecimiento en medios de cultivo corresponden con las reportadas en la literatura que son propias para las especies de dichos actinomicetos.

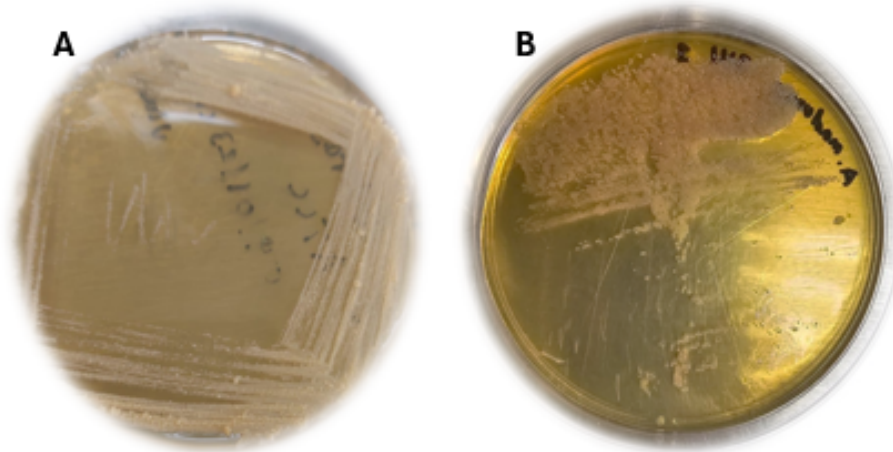


Figura 8. Activación de cepas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en agar BHI. A) Crecimiento de la cepa de *N. brasiliensis* ATCC19296 en BHI y B) Crecimiento de la cepa de *A. madurae* STCC3043 en BHI.

También se observaron las características microscópicas por medio de tinción Gram para *N. brasiliensis* y *A. madurae*, las cuales mostraron a ambas bacterias con coloración azul-morado que corresponden a bacterias Gram positivas, estructuras filamentosas y agregadas (Figura 9. A) *N. brasiliensis* y B) *A. madurae*).

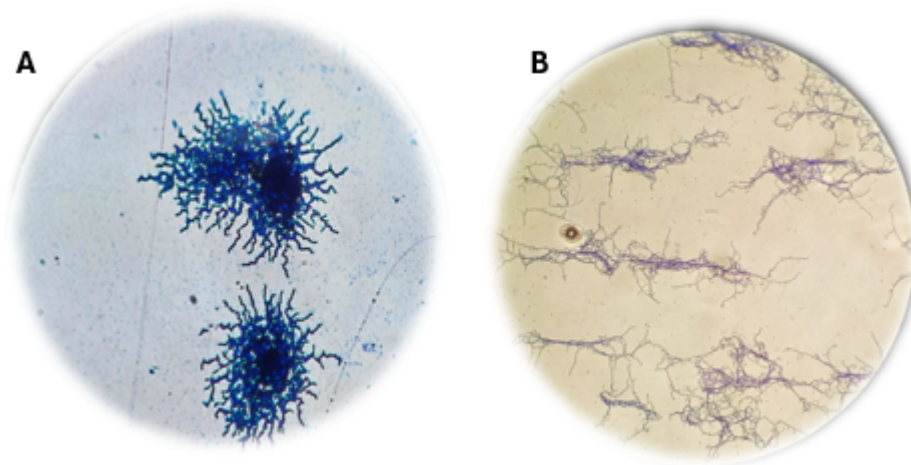


Figura 9. Tinción Gram. A) *N. brasiliensis* ATCC19296, B) *A. madurae* STCC3043.

Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas de hidrólisis de caseína y ureasa. La hidrólisis de caseína dio positivas para ambos microorganismos al observarse un halo de hidrólisis alrededor de la colonia (Figura 10. A) *N. brasiliensis* y B) *A. madurae*), lo cual indican que estos actinomicetos presentan enzimas que degradan la caseína en péptidos y aminoácidos. En el caso de la prueba bioquímica ureasa se observó que solo *N. brasiliensis* presentó una reacción positiva (color rosa mexicano), a diferencia de *A. madurae* al no mostrar un cambio de coloración siendo semejante al tubo control-caldo urea. Lo cual indica que *N. brasiliensis* produce la enzima ureasa que degrada la urea en amoníaco y dióxido de carbono (Figura 10. C I) Control, II) *A. madurae* y III) *N. brasiliensis*).

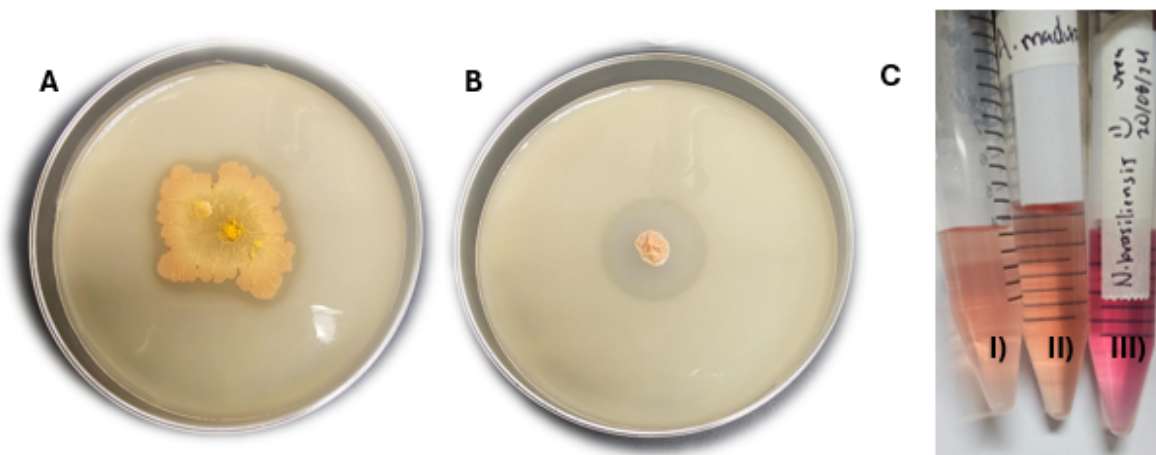


Figura 10. Prueba bioquímica hidrólisis de caseína. **A)** Hidrólisis de caseína por *N. brasiliensis* ATCC19296, **B)** Hidrólisis de caseína por *A. madurae* STCC3043 y **C)** Prueba de Ureasa. I) Control, II) *A. madurae* y III) *N. brasiliensis*

Crecimiento de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en medios de cultivo líquido.

Las bacterias *N. brasiliensis* y *A. madurae* inoculadas en caldo Czapek, BHI y LB mostraron diferentes morfologías a las crecidas en agar y entre los caldos.

La *N. brasiliensis* inoculada en caldo Czapek (Figura 11A), la biomasa presentó un crecimiento en pequeños gránulos, con una coloración naranja; en el medio LB y BHI (Figura 11. B) LB y C) BHI), la biomasa presentó un crecimiento sobre la superficie del medio, con conformación rugosa, seca y de color amarillento y adherencia en las paredes del matraz.

Respecto a *A. madurae* inoculada en caldo Czapek (Figura 11D), la biomasa mostró una conformación de pequeños gránulos con una coloración blanca y ligeramente rosa; en caldo LB (Figura 11E), la biomasa creció sobre la superficie, con una consistencia rugosa, seca y coloración amarillenta y adherencia a las paredes del matraz; en caldo BHI (Figura 11F), presentó un crecimiento en agregados de color blanco que se precipitaron al fondo del matraz.

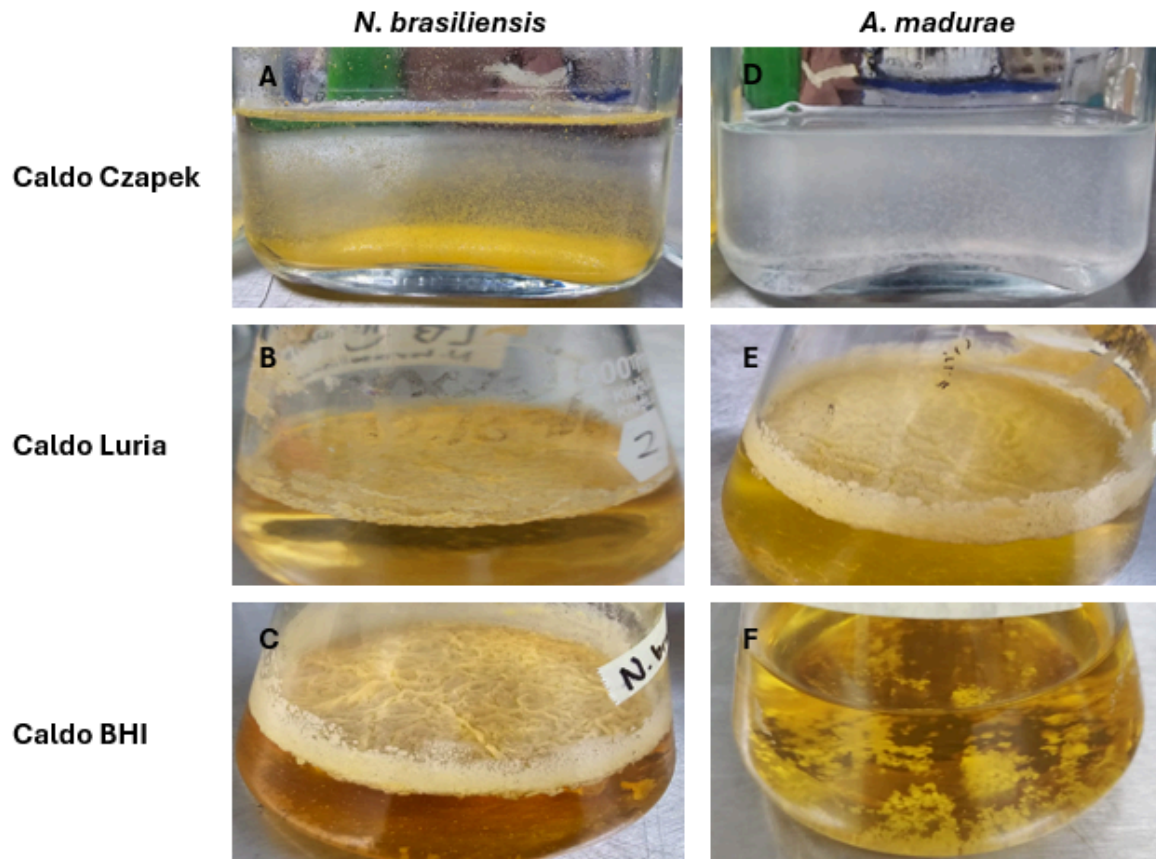


Figura 11. Crecimiento de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en caldos. **A)** Crecimiento de *N. brasiliensis* en caldo Czapek, **B)** Crecimiento de *N. brasiliensis* en caldo Luria, **C)** Crecimiento de *N. brasiliensis* en caldo BHI, **D)** Crecimiento de *A. madurae* en caldo Czapek, **E)** Crecimiento de *A. madurae* en caldo Luria y **F)** Crecimiento de *A. madurae* en caldo BHI.

Cuantificación de proteínas.

Se cuantificaron las concentraciones para cada una de las muestras de proteínas extraídas, se empleó el equipo Nanodrop (Figura 12A), configurado a una longitud de onda de 280nm, este equipo también permite visualizar el estado de las proteínas respecto con su plegamiento, un plegamiento correcto muestra la presencia de dos picos en el espectro como se muestra en la Figura 12B.

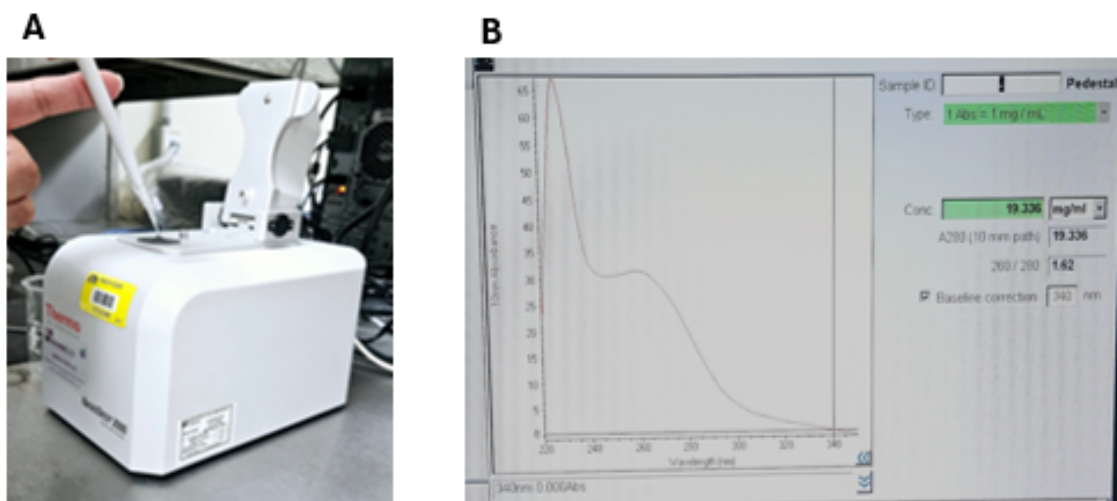


Figura 12. Cuantificación de proteínas por el método espectrofotométrico. **A)** Equipo espectrofotómetro NanoDrop (Thermo), **B)** Histograma de las proteínas y concentración a longitud de onda de 280nm proporcionadas por el software.

Las concentraciones de las proteínas de pared purificadas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en medio Czapek y Luria-Bertani se muestran en la Tabla 5, donde se pudo observar que la mayor concentración proteica se presentó en la muestra de *A. madurae* crecida en caldo LB.

Las concentraciones finales de las proteínas purificadas en los tres medios de cultivo (BHI, LB y Czapek), se muestran en la Tabla 6. Donde se pudo observar que ambas bacterias crecidas en medio BHI presentan las mayores concentraciones de proteínas extraídas, seguidas por el medio de LB siendo mayor su concentración en *A. madurae*, y en el medio Czapek se pudo observar que las concentraciones de proteínas en los primeros análisis eran semejantes para ambos microorganismos y disminuyó drásticamente la concentración en las muestras de proteínas de *A. madurae* crecida en caldo Czapek. Las diferencias de concentración en los diferentes

medios se pueden deber a los nutrimentos que presentan cada uno, ya que BHI es un medio de cultivo enriquecido formulado con nutrimentos complejos, el medio de cultivo LB no presenta tantos compuestos complejos el de mayor complejidad es el extracto de levadura y el medio de cultivo Czapek es un medio simple compuesto por una mezcla de sales y sacarosa como fuente de carbono.

Tabla 5: Concentración de proteínas de pared de *A. madurae* y *N. brasiliensis* en medios líquidos, LB y Czapek.

Proteínas de pared (mg/ml)		
Medio	<i>N. brasiliensis</i>	<i>A. madurae</i>
Czapek	15.20 mg/mL	13.13 mg/mL
Luria-Bertani	14.15 mg/mL	24.34 mg/mL

Tabla 6: Concentraciones finales de proteínas de pared de *A. madurae* y *N. brasiliensis brasiliensis* en medios líquidos BHI, LB y Czapek.

Proteínas de pared (mg/ml)		
Medio	<i>N. brasiliensis</i>	<i>B. madurae</i>
Czapek	12.59 mg/mL	2.73 mg/mL
Luria-Bertani	11.91 mg/mL	22.53 mg/mL
BHI	25.41 mg/mL	21.77 mg/mL

Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de pared de *N. brasiliensis* y *A. madurae*.

Se visualizaron los patrones de las proteínas de pared purificadas de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en diferentes medios de cultivo (BHI, LB y Czapek), por medio de la técnica de electroforesis SDS-PAGE (Figura 13 y 14).

Primero se obtuvieron las proteínas de pared de los microorganismos crecidos en caldo Luria-Bertani y Czapek, posteriormente analizaron los patrones proteicos de las proteínas purificadas por medio de la electroforesis SDS-PAGE. Para ambos microorganismos se observaron la presencia de varias bandas proteicas, las cuales no

presentaron degradación. En el caso de *N. brasiliensis* se observaron la presencia de 12 bandas proteicas purificadas del microorganismo crecido en medio Czapek y 9 bandas proteicas en caldo LB. Para *A. madurae* se observó un patrón proteico de 10 bandas obtenidas del microorganismo crecido en caldo LB y de 7 bandas en caldo Czapek (Figura 13). Los resultados obtenidos indican que *N. brasiliensis* presenta mayor contenido proteico cuando crece en caldo Czapek que cuando crece en caldo LB, contrario con lo observado con *A. madurae*, el cual presenta mayor concentración proteica en las muestras obtenidas en caldo LB diferente que en caldo Czapek, correlacionándose dichos patrones proteicos con las concentraciones leídas en el NanoDrop.

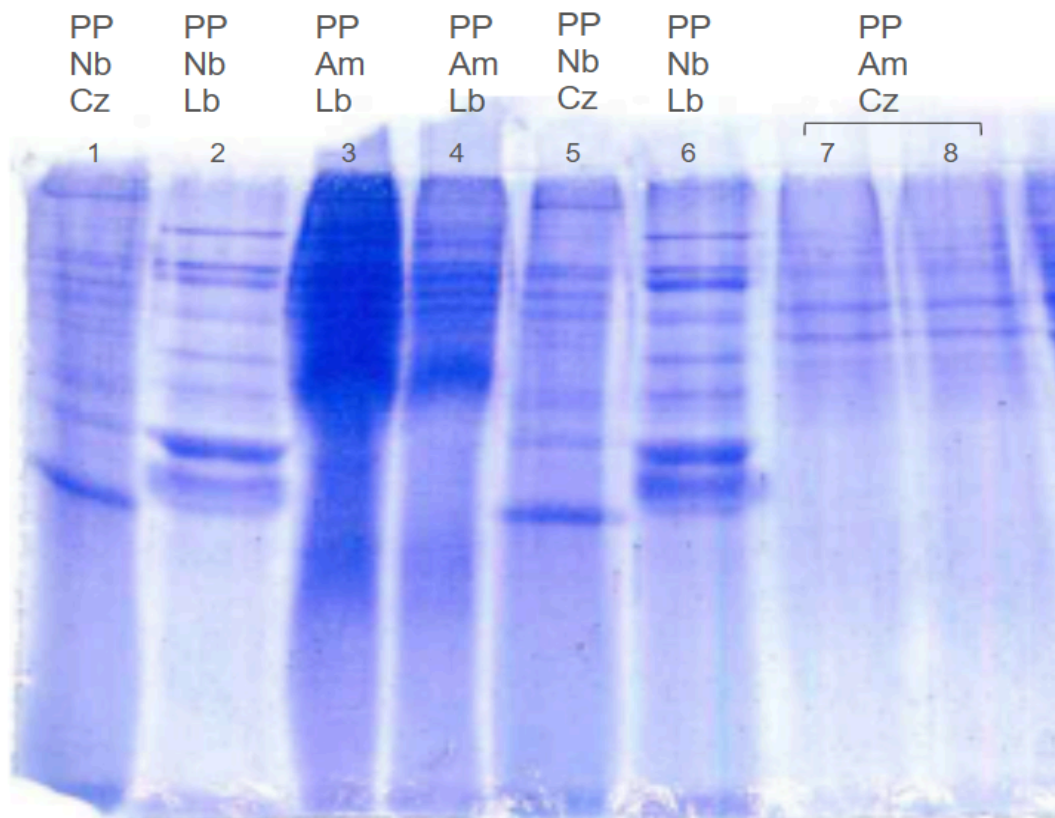


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de pared Caldo Czapek y Luria. **Carril 1 y 5)** Proteínas de pared de *N. brasiliensis* crecidas en caldo Czapek, **Carril 2 y 6)** Proteínas de pared de *N. brasiliensis* crecidas en caldo Luria, **Carril 3 y 4)** Proteínas de pared de *A. madurae* crecidas en caldo Luria, **Carril 7 y 8)** Proteínas de pared de *A. madurae* crecidas en caldo Czapek.

Por último, se obtuvieron las proteínas de pared de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en BHI. Posteriormente se analizaron los patrones proteicos por electroforesis SDS-PAGE de las muestras obtenidas para ambos microorganismos crecidas en los medios de cultivo BHI, LB y Czapek. En el caso de *N. brasiliensis* se observó la presencia de 20 bandas proteicas en las muestras del microorganismo crecido en BHI, 9 bandas en el medio de cultivo LB y 12 en el medio de cultivo Czapek, respecto a *A. madurae* se observó la presencia de 16 bandas en la muestra de proteínas purificadas del microorganismo crecido en medio de cultivo BHI, 10 bandas en el medio cultivo LB y 3 en el medio de cultivo Czapek (Figura 14), también se pudo presenciar la disminución de la concentración de proteínas en las primeras muestras obtenidas (caldo LB y Czapek), esto debido a la formación de agregados por el almacenamiento prolongado, así como la degradación de las mismas principalmente en las muestras de *A. madurae* crecida en caldo Czapek.

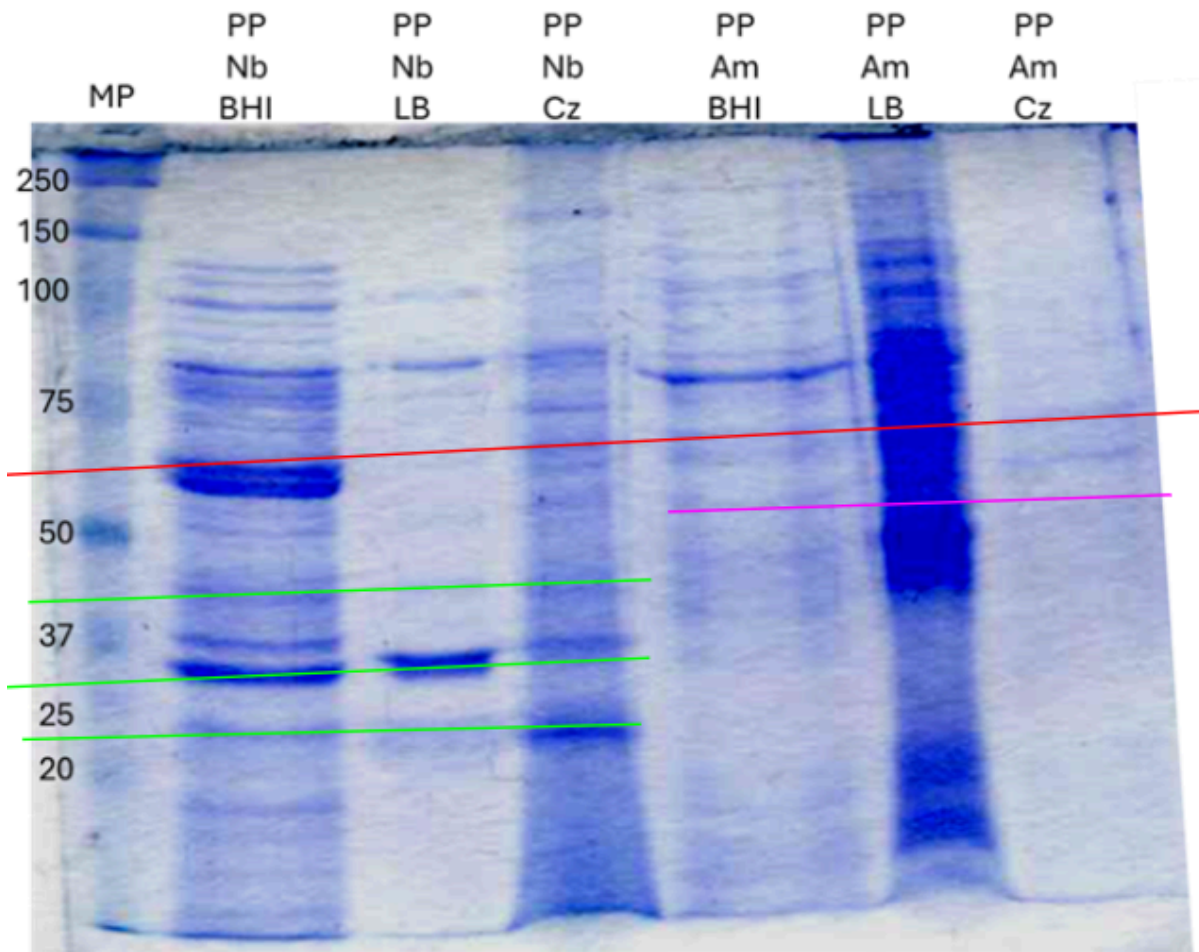


Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de pared Caldo Czapek, Luria y BHI. **Carril 1)** Proteínas de pared de *N. brasiliensis* crecidas en caldo Czapek, **Carril 2)** Proteínas de pared de *N. brasiliensis* crecidas en caldo Luria, **Carril 3)** Proteínas de pared de *N. brasiliensis* crecidas en caldo BHI, **Carril 4)** Proteínas de pared de *A. madurae* crecidas en caldo Czapek, **Carril 5)** Proteínas de pared de *A. madurae* crecidas en caldo Luria y **Carril 6)** Proteínas de pared de *A. madurae* crecidas en caldo BHI.

Si bien estudios previos habían identificado únicamente dos proteínas en *N. brasiliensis* -de aproximadamente 61 kDa y 24 kDa, marcadas con bandas roja y verde en la Figura 14-, en este estudio se observó que la expresión proteica varía significativamente según el medio de cultivo. En *N. brasiliensis*, a pesar de las diferencias generales entre medios, se identificaron cuatro proteínas comunes (61, 42, 31 y 24 kDa marcadas en la Figura 14 en color verde y rojo).

En *A. madurae*, también se observó un patrón dependiente del medio, siendo BHI el más permisivo para la expresión proteica (16 bandas), seguido de LB (10 bandas) y Czapek (3 bandas). A través de estas condiciones, únicamente la proteína de 61 kDa y 50 kDa (marcada con una línea rosa en la Figura 14), fue consistentemente compartida entre los tres medios, y además, la proteína de 61 kDa es la única detectada tanto en *A. madurae* como en *N. brasiliensis*.

Este hallazgo sugiere que, a pesar de pertenecer a grupos etiológicos similares, ambas especies presentan diferencias notables en sus perfiles proteicos, lo que refuerza la posibilidad de utilizar estas diferencias como base para el diseño de herramientas diagnósticas específicas. Las proteínas exclusivas de cada género podrían representar biomarcadores diferenciales útiles para distinguir entre actinomicetomas causados por distintas especies, y potencialmente, para optimizar estrategias terapéuticas dirigidas.

Además, otro factor a notar fue la presencia de proteínas de alto peso molecular, lo cual abre una nueva hipótesis sobre si alguna de ella corresponde a componentes como endotoxinas.

Conclusión

Se purificaron proteínas de pared de *N. brasiliensis* y *A. madurae* crecidas en diferentes medios de cultivo (BHI, LB y Czapek), las cuales presentaron mayor concentración proteica para ambos microorganismos crecidos en caldo BHI, seguidos por las muestras obtenidas del crecimiento en Luria-Bertani y menor concentración proteica en las muestras obtenidas del crecimiento en caldo Czapek. Además, se logró observar la presencia de las proteínas de 61 y 24kDa reportadas anteriormente como proteínas antigénicas, así como de alto peso molecular, abriendo nuevas líneas de investigación para posteriores análisis.

El uso de tres medios de cultivo con distinta complejidad nutricional (Czapek, Luria-Bertani y BHI) permitió analizar cómo varía la expresión proteica en *Nocardia*

brasiliensis y *Actinomadura madurae* bajo diferentes condiciones. El medio Czapek, considerado simple, simula un entorno con recursos limitados, semejante al ambiente natural saprofito donde normalmente habitan estas bacterias, favoreciendo la expresión de proteínas asociadas a su supervivencia ambiental. En contraste, LB y BHI son medios más complejos; lo cual asemeja a las condiciones ricas del hospedero durante una infección. Esto explicaría por qué el aislamiento clínico de estas bacterias es más exitoso en BHI, ya que promueve el crecimiento de cepas adaptadas a entornos infecciosos. Las diferencias observadas en los perfiles proteicos entre estos medios reflejan no sólo adaptaciones fisiológicas, sino también posibles variaciones en la expresión de proteínas de interés inmunológico.

Metas alcanzadas

Se logró aislar y cultivar ambas bacterias (*N. brasiliensis* y *A. madurae*) en los medios de cultivo BHI, Luria-Bertani y Czapek, estableciendo sus perfiles proteicos bajo diferentes condiciones y realizando una comparación que evidencia diferencias significativas en su expresión. Además, se logró correlacionar la concentración de proteínas leídas en el equipo NanoDrop con el patrón proteico.

Recomendaciones

Como propuesta futura, sería valioso complementar estos análisis con técnicas de identificación más específicas, como la espectrometría de masas, para conocer con mayor precisión la naturaleza de las proteínas obtenidas y así mismo puedan ser utilizadas como base para el desarrollo de pruebas inmunológicas dirigidas a la identificación o tratamiento.

Referencias bibliográficas

1. Arenas, R., & Torres, E. (2014). *Micología médica ilustrada*. McGraw. México. Hill Book Co
2. Bonifaz A. (2015) *Micología Médica Básica: Propiedades generales de los actinomicetos y Micetoma*. McGraw-Hill Medical. México. 725p
3. Bonifaz, A., Tirado-Sánchez, A., Vázquez-González, D., Fierro-Arias, L., Araiza, J., & González, G. M. (2022). Actinomycetoma by *Actinomadura madurae*. Clinical and therapeutic characteristics of 18 cases with two treatment

- modalities. *Journal of Dermatological Treatment*, 33(2), 954–958.
<https://doi.uam.elogim.com/10.1080/09546634.2020.1793887>
4. Cárdenas-de la Garza, J. s A., Cue llar-Barboza, O. W., Suarez-Sánchez, K. P., & De la Cruz-Valadez, E. (2020). Clinical characteristics and treatment of actinomycetoma in northeast Mexico: A case series. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(2), e0008123.
 5. Castrillón-Rivera L. E., Palma-Ramos A.,& Castañeda-Sánchez J. I.(2020). Actinomycetos: mecanismos de patogenicidad. *Dermatol Rev Mex.*; 64 (5): 536-570.
 6. Grabski A. C. (2009). Advances in preparation of biological extracts for protein purification. *Methods in enzymology*, 463, 285–303.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63018-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63018-4)
 7. Hao, X., Cognetti, M., Burch-Smith, R., O’Sullivan Mejia, E., & Mirkin, G. (2022). Mycetoma: Development of Diagnosis and Treatment. *Journal of Fungí*, 8(743).
 8. Izri, A., Aljundi, M., Billard-Pomares, T., Fofana, Y., Marteau, A., Ferreira, T. G., Brun, S., Caux, F., & Akhoundi, M. (2020). Molecular identification of *Actinomadura madurae* isolated from a patient originally from Algeria; observations from a case report. *BMC Infectious Diseases*, 20(1).
<https://doi.org/10.1186/s12879-020-05552-z>
 9. Janson, J.-C. (2011) Protein purification: principles, high resolution methods, and applications, Third edition, *Methods of biochemical analysis*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey
 10. Ji X., Sun N.L., Hou X.X., Xu S., Qiu T.X., Tang L., Li Q.H., Wang B.X. & Li J.Z. (2018). Screening and Identification of B-Cell Epitopes in the P61 Protein of *Nocardia brasiliensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:224.
doi:10.3389/fcimb.2018.00224
 11. Kwon, Y. C., & Jewett, M. C. (2015). High-throughput preparation methods of crude extract for robust cell-free protein synthesis. *Scientific reports*, 5, 8663.
 12. LABORATORIOS BRITANIA. (2011). Sabouraud Glucosado Agar. Recuperado el 17 de mayo del 2025 de:
https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5af08a08a7afe.pdf

13. Laboratorios Britania. (2021). *Sangre Agar Base*.
https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070906be_d89d.pdf Britania Lab
14. Lavallo, P., Padilla, M., Pérez, J., Rivera, I. & Reynoso S. (2000). Micetomas por *Actinomyces madurae* en México. *Rev Cent Dermatol Pascua*, 9(1), 19-24.
15. Licón-Trillo, Á., Castro-Corona, M. A., & Salinas-Carmona, M. C. (2003). Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 37(1), 37-44.
16. Lo-Muzio, L., Favia, G., Lacaita, M., De Lillo, A., Scully, C., Napoli, A., Lo Russo, L., & Maiorano, E. (2014). The contribution of histopathological examination to the diagnosis of cervico-facial actinomycosis: a retrospective analysis of 68 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(11), 1915–1918.
17. López-Martínez, R., Méndez-Tovar, L.J., Lavallo, P., Welsh, O., Saúl, A. & Macotela Ruiz, E. (1992) Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gac. Med. Mex.* 128, 477-481
18. Navarro LL, Robles A, Castrillón LE, Palma A, Luna J, Castañeda JI. La infección por *Nocardia brasiliensis* induce la muerte celular de macrófagos. *Dermatología Rev Mex.* 2022, 66(2):205-214.
19. Navarro, L.L., Robles, A., Castrillón, L.E., Palma, A., Luna, J. & Castañeda, J.I. (2022) La infección por *Nocardia brasiliensis* induce la muerte celular de macrófagos. *Dermatología Rev Mex.* , 66(2):205-214.
20. Ramirez, S., Miranda, B. & Rodriguez, C. (2021). Purificación de proteínas. *Mens. Bioquímico.* 45. 35-47
21. Ramos, A. P., Rivera, L. C., Desgarnes, C. P., & Fuentes, F. R. (2005) Caracterización histoquímica de micetomas por *Actinomyces madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Madurella mycetomatis*.
22. Roca, P., Roca, S. M. & Oliver, O. O. (2003). *Bioquímica: Técnicas y métodos*. Hélice
23. Salinas-Carmona, M. C., Castro-Corona, M. A., Sepúlveda-Saavedra, J., & Perez, L. I. (1997). Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant

antigens from *Nocardia brasiliensis*. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 4(2), 133–137.

24. Santiago-Téllez, A., Castrillón-Rivera, L. E., Palma-Ramos, A., Bello-López, J. M., Sainz-Espuñes, T., Contreras-Paredes, A., Luna-Herrera, J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2019). Keratinocyte infection by *Actinomadura madurae* triggers an inflammatory response. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 113(7), 392–398.
25. Serrano, JA, & Sandoval, AA. (2003). El micetoma. revisión. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 23(1), 70-79.
26. Siddig, E. E., van de Sande, W. W. J., & Fahal, A. H. (2021). Actinomycetoma laboratory-based diagnosis: a mini-review. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 115(4), 355–363. doi:10.1093/trstmh/traa176
27. Siddig, E. E., Nyuykongé, B., Ahmed, M. T., Hassan, R., Saad, E. S. A., Mhmoud, N. A., Bakhiet, S. M., Van De Sande, W. W. J., & Fahal, A. H. (2021). Human actinomycetoma caused by *Actinomadura mexicana* in Sudan: the first report. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 115(4), 406–410.
28. Tortora, G. J. (2007). Introducción a la microbiología. Panamericana.
29. Trujillo, A. (2020). Micetoma. En Micología Médica Básica. McGraw Hill.
30. Vera-Cabrera, L. U. C. I. O., Salinas-Carmona, M. C., Welsh, O., & Rodriguez, M. A. (1992). Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. Journal of clinical microbiology, 30(5), 1183-1188.
- 31.

Anexos

-Gelosa 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.

Nitrato 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

- Hidrólisis de Caseína:

Solución A: 10 g Leche descremada Svelty en polvo disuelta en 100 mL de agua destilada. Solución B: Agar aproximadamente 2 g disueltos en 100 mL de agua destilada.

Se colocaron las soluciones A y B en autoclave por separado, enfriando hasta aproximadamente 50°C, para mezclar A en B y vertiendo en placas de Petri estériles. La lectura de la prueba se realizó después de 2 semanas de la siembra del microorganismo en el medio.

La hidrólisis de la caseína se evidencia por un aclaramiento completo hasta la transparencia del medio originalmente blanco lechoso.

- Prueba de ureasa

Suspender 38.7 gramos del medio en un litro de agua destilada sin calentar, cuando el polvo esté disuelto se esteriliza por filtración. Vaciar en tubos estériles.

Inocular los tubos de caldo urea e incubar en condiciones aeróbicas a 37°C durante 1 semana.

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

- Obtención de proteínas de pared en los medios de cultivo para cada cepa bacteriana.

Se separó la biomasa de *N. brasiliensis* y *A. madurae* en condiciones de esterilidad de los caldos Luria, BHI y Czapek por centrifugación a 5,500 rpm/35 min. Los pellets formados se conservaron y se resuspendieron en aproximadamente 50 mL de solución salina estéril, para realizar las suspensiones de los microorganismos, la cual se llevó a cabo disgregando las conformaciones filamentosas con el empleo de perlas de vidrio y agitación constante hasta observar una suspensión homogénea.

Las suspensiones bacterianas se sometieron a sonicación, durante 5 ciclos de 30 minutos con una amplitud del 70% (15 minutos de sonicado con 15 minutos de descanso), finalizados los procesos de sonicación se centrifugaron las muestras a 7,000 rpm/20 minutos para eliminar las células sin lisar y el sobrenadante se recolectó ya que contiene las macromoléculas liberadas. Esta metodología se lleva a cabo para los microorganismos crecidos en los diferentes medios de cultivo. Las proteínas obtenidas por el proceso de sonicación de *N. brasiliensis* y *A. madurae* se conservaron en tubos eppendorf estériles a una temperatura de -20 °C para sus posteriores análisis.

- 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 L de SDS y finalmente 10 L de la solución de TEMED y 100 L de persulfato de amonio al 10%. 4.5 mL de dicha mezcla se agregó entre los dos cristales, posteriormente se adicionaron 200 L 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 L de SDS y para polimerizar la solución se agregaron 10 L de TEMED y 100 L 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.