

11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. DE MICROBIOLOGIA

5
20j

PERFIL ENZIMATICO DE TRICHOPHYTON RUBRUM.
PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL
DE UNA QUERATINASA.

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(MICOLOGIA MEDICA)

TRABAJO REALIZADO POR:

MARIA DE GUADAPUPE MOCTEZUMA ZARATE

MEXICO, 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente Tesis se realizó en los laboratorios de:
Micología Médica del Departamento de Microbiología y
Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.
Enzimas Microbianas de la Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas del IPN.
Bioquímica del IIBE de la Fac. de Química de la U.A. de
Guanajuato.

ASESOR DE TESIS:

DR. RUBEN LOPEZ MARTINEZ.

Jefe del Laboratorio de Micología Médica.
Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Medicina, UNAM.

COASESORES DE TESIS:

DR. RAMON CRUZ CAMARILLO. ENCB DEL IPN.
DRA. MA. GUADALUPE MARTINEZ CADENA. IIBE
FAC. DE QUIMICA DE LA U.A. DE GUANAJUATO.
M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ. CIEP FAC. DE
CIENCIAS QUIMICAS DE LA U.A.S.L.P.

Mi gratitud:

***A todas y cada una de las personas, que en una u otra forma,
contribuyeron a la realización de una meta más de mi vida.***

***Es buscando lo imposible como el hombre ha
realizado siempre y reconocido lo posible y
aquellos que "sabiamente" se han limitado
a lo que parecía posible no han dado jamás
un paso.***

Mijail Bakunin

INDICE

	Página
1. Generalidades	1
1.2 Clasificación taxonómica de los dermatofitos	2
1.3 Clasificación de los dermatofitos de acuerdo con el sustrato	3
1.4 Formas clínicas de las dermatofitosis	3
1.5 Mecanismos de patogenicidad de los dermatofitos	4
1.6 Características epidemiológicas y patogénicas de <i>T. rubrum</i>	5
1.7 Características morfológicas de <i>T. rubrum</i>	6
1.7.1 Características macroscópicas	6
1.7.2 Características microscópicas	7
1.8 Características fisiológicas de <i>T. rubrum</i>	7
1.8.1 Producción de órganos de perforación al pelo <i>in vitro</i>	7
1.8.2 Prueba de ureasa	8
1.8.3 Producción de pigmentos en medios especiales	8
1.9 Producción de enzimas extracelulares	8
2. Planteamiento del problema	9
3. Objetivos	10
3.1 Objetivos generales	10
3.2 Objetivos específicos	11
4. Hipótesis	12
5. Material y Métodos	13
5.1 Microorganismos empleados	13
5.2 Medios de cultivo	13
5.2.1 Para el aislamiento de <i>T. rubrum</i>	13
5.2.2 Para la observación macroscópica y microscópica de <i>T. rubrum</i>	13
5.2.3 Para la determinación de las características fisiológicas de <i>T. rubrum</i>	14
5.2.4 Para la determinación de las diferentes actividades enzimáticas	14
5.2.5 Para la evaluación de proteasas	15
5.2.6 Para la evaluación de esterases	15
5.2.7 Para la determinación de fosfolipasas	15

5.2.8	Para la evaluación de quitinasas	15
5.2.9	Para la determinación de hemolisinas	16
5.2.10	Para la evaluación de DNAsas	16
5.2.11	Para la determinación de elastasas	16
5.2.12	Para la determinación de queratinasas	17
5.3	Condiciones para la producción de queratinasas	20
5.4	Determinación de la actividad queratinolítica	20
5.5	Purificación de la queratina	20
5.6	Caracterización parcial de la queratina	21
5.6.1	Degradación de diferentes sustratos por la queratina de <i>T. rubrum</i>	21
5.6.2	Efecto de diferentes inhibidores de proteasa sobre la actividad queratinolítica	22
5.6.3	Determinación del peso molecular y actividad proteolítica en electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	22
6.	Resultados	26
6.1	Características morfológicas	26
6.1.1	Características macroscópicas	26
6.1.2	Características microscópicas	26
6.2	Características fisiológicas	26
6.2.1	Invasión al pelo <i>in vitro</i>	26
6.2.2	Prueba de la ureasa	38
6.2.3	Producción de pigmento en medios especiales	38
6.2.4	Termotolerancia	38
6.3	Producción de enzimas extracelulares	38
6.4	Producción y caracterización parcial de la(s) queratina(s) de <i>T. rubrum</i> a partir de extracto crudo	57
6.4.1	Determinación de la actividad queratinolítica a pH 7 y 9 producida con diferentes inductores	57
6.4.2	Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de queratinasas	65
6.4.3	Efecto de diferentes concentraciones de lana (sustrato inductor) sobre la producción de la queratina	65
6.4.4	Efecto de la concentración de proteína del extracto crudo sobre la actividad queratinolítica	65

6.4.5	Efecto de la concentración de lana teñida sobre la actividad queratinolítica del extracto crudo	69
6.4.6	Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad queratinolítica del extracto crudo	69
6.4.7	Efecto del pH sobre la actividad queratinolítica del extracto crudo	69
6.5	Aislamiento y caracterización parcial de la actividad queratinolítica de <i>T. rubrum</i>	69
6.5.1	Purificación de la actividad queratinolítica a partir de un sobrenadante de cultivo	73
6.5.2	Efecto de la concentración de proteína parcialmente purificada sobre la actividad queratinolítica	73
6.5.3	Efecto de la concentración de lana teñida sobre la actividad queratinolítica	73
6.5.4	Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada	78
6.5.5	Efecto del pH sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada	78
6.5.6	Degradación de diferentes sustratos por la queratinasa parcialmente purificada	78
6.5.7	Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada	82
6.5.8	Determinación del peso molecular y actividad proteolítica con electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	82
7.	Discusión	87
8.	Conclusiones	92
9.	Bibliografía	94

1. GENERALIDADES.

1.1. DEFINICION DE DERMATOFITOSIS.

Las dermatofitosis son micosis superficiales ocasionadas por un grupo de hongos denominados dermatofitos, de los cuales se han identificado 41 especies y sólo 11 se consideran importantes como patógenas. Estos hongos miceliares se encuentran dentro de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, y están estrechamente relacionados desde el punto de vista antigénico,¹⁰⁷ fisiológico y morfológico, presentando sólo ligeras diferencias nutricionales y enzimáticas.^{8,40,113,135}

En general se caracterizan por:

1.- Su queratinofilia, es decir, su afinidad por desarrollarse sobre los tejidos queratinizados (uñas, pelo y estrato córneo de la piel). Aunque existen otras especies de micromicetos igualmente capacitados y semejantes a ellos, tales como: especies de *Chrysosporium*¹¹⁰ o algunos géneros como *Ctenomyces*, *Gymnoascus* y *Malbranchea*;^{110,118} los dermatofitos son los miembros dotados de poder patógeno dentro del grupo más amplio de los hongos queratinolíticos.

2.- Su capacidad de producir enzimas a través de las cuales se efectúa la asimilación de la queratina como nutriente del hongo.^{28,93}

3.- La producción de conidias que aunque variados en su estructura y frecuencia confieren características morfológicas similares a las diferentes especies.

4.- La producción de enfermedad en el hombre o animal es por mecanismos de contacto directo de persona a persona o de animales, de suelo a personas y de fomites contaminados.^{47,74} En algunas localizaciones actúan como factores favorecedores al desarrollo de la enfermedad: la humedad, la maceración, la oclusión y los traumatismos. No se ha establecido bien la participación del recambio epidérmico o de la acción de las queratinasas, ni la influencia del sudor. Se cree que hay una predisposición genética y/o resistencia natural a la infección, tal vez dada por un factor sérico no bien definido.

1.2. Clasificación Taxonómica de los Dermatofitos ⁸⁵

SEXUADOS	Reino	Fungi
	División	Eumycota
	Subdivisión	Ascomycotina
	Clase	Ascohymenomyces
	Orden	Onygenales
	Familia	Arthrodermataceae (Gymnoascaceae)
	Género	Arthroderma
ASEXUADOS	Subdivisión	Deuteromycotina
	Clase	Hyphomycetes
	Orden	Hyphomycetales
	Familia	Moniliaceae
	Género	<i>Trichophyton</i>
		<i>Microsporum</i> <i>Epidermophyton</i>

1.3. CLASIFICACION DE LOS DERMATOFITOS DE ACUERDO CON EL SUSTRATO.

Los dermatofitos son altamente ubicuos y pueden desarrollarse con distintos tipos de nutrientes, desde escasos hasta muy elaborados. Según el criterio basado en la teoría de la evolución, los dermatofitos han sufrido un proceso de diferenciación biológica que ha determinado la restricción de los posibles huéspedes y su modo de vida. En esta diferenciación se ha basado la clasificación en:^{113,118} a) **Geofílicos**: regularmente viven en la tierra y en raras ocasiones atacan al hombre y a los animales. La especie más frecuente es *M. gypseum* que produce tiñas en individuos que están constantemente en contacto con la tierra. Entre las especies que se aíslan en ocasiones y que pueden atacar a los animales se encuentran: *M. fulvum*, *T. terrestre* y *T. ajelloi*, b) **Zoofílicos**: atacan a los animales y por el contacto con el hombre pueden infectarlo. La especie que sobresale en frecuencia es *M. canis* que tiene como reservorio natural a gatos y perros, entre otros ejemplos se encuentra: *T. verrucosum*, que afecta a gatos y vacas; *M. nanum* a cerdos, *T. equinum* a caballos, vacas, burros y a aves de corral., c) **Antropofílicos**: es un grupo constituido por parásitos obligados, del que el hombre se ha convertido en el único huésped y reservorio, excepcionalmente atacan a los animales.⁶⁷ Las especies más frecuentes en nuestro medio son:^{8,15} *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes var interdigitale*, *T. violaceum*, *T. concentricum*, *M. audouinii* y *E. floccosum*.

1.4. FORMAS CLINICAS DE LAS DERMATOFITOSIS.

Las dermatofitosis incluyen varias formas clínicas,¹¹² según el sitio anatómico en que se localicen,¹³ clasificándose en las llamadas tiñas de la cabeza, de la uñas, de la mano, de los pies, de la ingle y del cuerpo (piel glabra). Todas ellas se caracterizan por una triada sintomática, constituida por eritema, descamación y prurito. Pueden ser de evolución aguda o crónica,⁵⁴ dependiendo del tipo de dermatofito, por ejemplo, en forma general, los dermatofitos zoofílicos ocasionan tiñas agudas y los antropofílicos tiñas crónicas. El tipo y gravedad de estas lesiones están en relación con el estado inmune del huésped así como la especie y con la cepa del microorganismo causante de la infección.⁴⁸ La invasión profunda es excepcional,^{24,41,97} como en los casos de granuloma tricofítico de Querión de Celso⁹² (tiña supurativa) y micetomas.¹⁹

1.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE LOS DERMATOFITOS.

Se han descrito como factores que contribuyen a la patogenicidad de los hongos: la variabilidad fenotípica, la adherencia a los tejidos, la producción de toxinas y enzimas.^{50,58,100,126.}

En los dermatofitos se han descrito como principales mecanismos de patogenicidad: la inducción de estados de hipersensibilidad,^{1,61.} la secreción de enzimas y la variabilidad fenotípica.

Los estados de hipersensibilidad se pueden manifestar como una dermatofitosis aguda eczematosas, un granuloma tricofítico o una dermatofitides, y se dan como respuesta del huésped a los componentes antigénicos del dermatofito implicado. La tricofitina es un galactomanopéptido, el cual es el responsable de la reacción alérgica del huésped.¹⁰ La fracción de carbohidratos de este complejo se ha relacionado con la hipersensibilidad inmediata y la fracción peptídica con la hipersensibilidad retardada.^{33,34,50,51,53,71}

La secreción de enzimas hidrolíticas como proteinasas, lipasas y fosfolipasas pueden tener una participación importante no sólo en el crecimiento y multiplicación del hongo, sino también en la infección al tejido del hospedero. Minocha⁹³ ha estudiado el papel de las enzimas proteolíticas en la manifestación de reacciones inflamatorias en hospederos con infecciones por dermatofitosis. Se ha demostrado que la enfermedad inflamatoria en humanos y en animales se debe en parte a producción de enzimas proteolíticas del hongo, en particular elastasa y colagenasa durante la infección.^{60,115,116.} Se pueden producir varias enzimas proteolíticas pero sólo algunas en particular producen acantolisis epidérmica y estimula la inflamación.⁵⁹

Se han realizado estudios sobre la actividad proteolítica producida por algunos dermatofitos como: *Epidermophyton floccosum*^{55,56} *Microsporum canis*^{68,101,133,134}, *Microsporum gypseum*¹³² *Trichophyton granulosum*,³⁵ *T.Schoenleinii*,^{117,145,146.} *T. rubrum*,^{5,6,7,9,88,121.} *T. mentagrophytes*,^{141,151,152,153.} para dilucidar el mecanismo patogénico que emplean en los estratos queratinizados. Entre estos mecanismos la actividad de las queratinasas extracelulares tienen una función importante. Pues se ha demostrado que las queratinasas disuelven el citoplasma de las células de la capa córnea y digieren las fibras de queratina al penetrar en las células de la capa escamosa.^{39,133.}

Las enzimas proteolíticas no sólo han sido identificadas en los dermatofitos sino también en otros hongos patógenos como *Coccidioides immitis*^{99,146,150.} *Candida albicans*,^{79,95,114,139} *Cryptococcus neoformans*,¹⁸ *Conidiobolus coronatus*,⁹¹ *Basidobulos hapto sporus*,³⁷ *Histoplasma capsulatum*,¹³⁶ y *Sporothrix schenckii*,¹⁴⁰ *Aspergillus fumigatus*⁶⁵ entre otros. Estas enzimas no

sólo tienen importancia como factores de virulencia, sino también pueden ser de gran utilidad como criterios de identificación y clasificación taxonómica.⁴⁵

Con respecto a la variabilidad fenotípica, como factor de patogenicidad, se ha descrito que en cepas de morfología granular, se encuentra elevada producción de enzimas.¹¹⁸ La forma vellosa de *T. mentagrophytes* produce lesiones menos graves en cobayos que la forma granular.⁴⁷ En *T. rubrum* se consideran más virulentas las cepas vellosas que las cepas granulosa. La producción de conidias también se ha relacionado con la forma parasitaria, Rippon¹¹⁸ describe que las cepas de *T. rubrum* que presentan abundantes conidias provienen de tiñas inflamatorias y lesiones granulomatosas y las cepas desprovistas de conidias y con aspecto aterciopelado provienen de tiñas crónicas. Las cepas de forma granulosa de *T. mentagrophytes var. mentagrophytes*, producen reacción irritante primaria, seguida de intensa respuesta inflamatoria y pronta terminación de la infección. Invade con facilidad el pelo y produce numerosas conidias en el medio de cultivo. *T. mentagrophytes var. interdigitale* provoca respuesta inflamatoria moderada, produce infecciones crónicas, no infecta con facilidad a los animales de experimentación y en medios de cultivo produce pocas conidias.

1.6. CARACTERISTICAS EPIDEMIOLOGICAS Y PATOGENICAS DE *T. rubrum*

T. rubrum en la actualidad se ha convertido en el dermatofito más común y más ampliamente distribuido en todo el mundo.²⁵ Así, por ejemplo en México López Martínez y col⁷³, en un estudio de frecuencia de infección de las dermatofitosis señalan el aumento en el aislamiento de *T. rubrum* en un periodo de trece años (1972-1985) del 60% hasta 78%, y un incremento del 3% en un periodo de 7 años (1986-1992), según estudios realizados por Manzano y col.^{75,82} Estos datos son muy parecidos a los publicados en otros países de América como USA,^{86,119} Perú,¹⁴² o de Europa tales como España,¹⁰⁵ y Polonia.⁷⁸

Las micosis causadas por este hongo antropofílico se caracterizan por su cronicidad,¹²³ lo que indica una buena adaptación del hongo a los tejidos humanos con tendencia a extenderse por amplias superficies del tegumento, teniendo casi siempre como punto de partida las lesiones interdigitales de los pies. Puede invadir los folículos pilosebáceos¹⁴⁷ y el tejido celular subcutáneo, dando origen a lesiones inflamatorias de tipo Querión de Celso, cuando asienta en el cuero cabelludo o la barba (donde se encuentran conidios ecto y endotrix que no dan fluorescencia), aunque estas localizaciones son poco comunes; o bien puede originar granulomas del tipo "granuloma tricofítico de Majocchi".²³ Clínicamente puede ocasionar lesiones de aspecto

atípico, que pueden confundirse con otras dermatosis, siendo muy frecuente en sujetos en los que las defensas inmunitarias están disminuidas por terapéuticas a las que están sometidos o bien por otras enfermedades tales como: Diabetes,⁴ y SIDA.^{96,103} Estudios realizados por Sindrup,¹²⁴ Matis,⁸⁴ Torssander¹³⁸ y Muhleman⁹⁴ han demostrado que las dermatofitosis son unos de los hallazgos más frecuentes en los pacientes infectados con el HIV o el complejo relacionado con el SIDA.⁴⁹ Korting y col.⁶⁴ demuestran que *T. rubrum* es el dermatofito que se aísla con mayor frecuencia de pacientes infectados con HIV.

1.7. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *T. rubrum*.

1.7.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

La colonia se desarrolla en un tiempo promedio de 15 días, en medio agar Sabouraud dextrosa a temperatura ambiente. Existen dos tipos de cepas: vellosas y granulosas, siendo más frecuentes las primeras e inclusive algunos autores la consideran más virulenta.

T. rubrum var. *vellosa*. Es la forma común en los países templados, muestra colonias blancas de aspecto vellosa, algodonosa, seca y en algunas ocasiones con micelio de color rosa. Al reverso presenta un pigmento difusible color rojo vino, aunque no todas las cepas llegan a presentarlo.

T. rubrum var. *granulosa*. Propia de los países tropicales presenta colonias con aspecto pulverulento, blanca o blanco amarillento, plana o plegada ilimitada, al reverso puede presentar o no pigmento rojo vino.

Se han descrito las siguientes variedades de *Trichophyton rubrum*:^{16,148,149} dos formas polares representadas por la var. *vellosa* y la var. *rodhainii*. Entre éstas se sitúa una serie de formas intermedias que tienden a evolucionar hacia la variedad vellosa a las que designa con los términos de var. *granular*, var. *africana*, var. *disgónica*, y dentro de las vellosas distingue unas subvariedades hiperpigmentadas y melanoideas. Rippon¹¹⁸ describe la variedad *nigricans* a la que llama *T. olexae*.

1.7.2. CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS.

T. rubrum (var. *vellosa*) tiene abundantes hifas delgadas tabicadas, de aproximadamente 2 μ de diámetro. Presenta muchas microconidias, sobre todo la variedad granulosa, éstas nacen directamente de las hifas, son de aspecto piriforme o como "gotas", teniendo dimensiones de 2-3 μ de ancho por 3-5 μ de largo y por lo regular se disponen alternativamente. En colonias viejas las microconidias se ven sueltas. La mayoría de las cepas producen escasas macroconidias o están ausentes, son de forma alargada su extremidad distal es roma y redondeada mientras que la proximal, en general se inserta directamente sobre la hifa por medio de una ancha base sin una conexión identificable, dando el aspecto de un "puro o lápiz", tienen paredes finas sin ornamentaciones y con 2-7 septos y miden de 15-20 μ de largo por 4-6 μ de ancho, se presentan más en la variedad granulosa.^{44,63,113}. Así mismo, se observan estructuras semejantes a las hifas peridiales, clamidoconidias, hifas pectiniformes y muchas estructuras aberrantes. Rippon¹¹⁸ describe que en general las cepas conidiantes provienen de tinea corporis inflamatorias, tinea capitis y lesiones granulomatosas; y las cepas desprovistas de conidios y con aspecto aterciopelado provienen de tinea pedis y corporis crónica.

1.8. CARACTERISTICAS FISILOGIAS DE *T. rubrum*.

1.8.1. PRODUCCION DE ORGANOS DE PERFORACION AL PELO *in vitro*

T. rubrum no perfora pelo, solamente crece en la superficie de la vaina sin penetrarla, a diferencia de *Trichophyton mentagrophytes* que produce órganos perforadores de forma cónica en el cuerpo del pelo. Cuando parasita el pelo pueden encontrarse conidios ecto y endotrix.^{2,36}

1.8.2. PRUEBA DE UREASA.

T. rubrum es negativo para ureasa o bien puede producir un color rosa tenue a los siete días después de la inoculación, presentándose este fenómeno sobre todo cuando se trata de cepas granulosas. *T. mentagrophytes* produce ureasa entre 1 y 3 días, después de la inoculación.^{20,106}

1.8.3. PRODUCCION DE PIGMENTO EN MEDIOS ESPECIALES.

T. rubrum se caracteriza por desarrollar un pigmento rojo vino, difusible al medio de cultivo, sin embargo, no todas las cepas llegan a presentarlo en los medios rutinarios de aislamiento, por lo que se requiere de medios especiales como: papa-zanahoria adicionado de dextrosa al 1% ó agar harina de maíz con dextrosa al 0.2%, en donde las colonias producen sus clásicos pigmentos (rojo vino), diferenciandolas de las cepas de *T. mentagrophytes*. *T. terrestre* puede producir este pigmento pero es considerado como un hongo no patógeno.^{11,12,90.}

1.9. PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES.

Manzano-Gayosso⁸³ estudió la producción de algunas exoenzimas en 76 cepas clínicas de dermatofitos, de las cuales 47 correspondían a *T. rubrum*, encontrando una frecuencia de 97.8% para la DNasa, 76.5% para la elastasa y para la lipasa, 12.8% para la hemolisina y 0% para la caseinasa.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Trichophyton rubrum presenta una gran diversidad fenotípica, por lo que se supone que existan variedades de especie aún no bien establecidas. Estas variedades fenotípicas podrían poseer diferentes enzimas extracelulares.

En la actualidad se conoce poco sobre los mecanismos por los cuales las exoenzimas de *T. rubrum*, degradan diferentes sustratos para ser asimilados en sus procesos metabólicos. Además se tienen escasas evidencias de la relación que existe entre la magnitud de las formas clínicas de dermatofitosis por *T. rubrum* y sus exoenzimas, por lo que es importante determinar el perfil enzimático en cepas de *T. rubrum* con diferentes características fenotípicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

-Estudiar algunas características morfológicas y fisiológicas de *Trichophyton rubrum* así como determinar su perfil enzimático extracelular.

-Dado que *T. rubrum* ataca primordialmente tejido queratinizado hacer la purificación y caracterización parcial de sus queratinasas.

-Estudiar la utilidad de relacionar características morfológicas, fisiológicas y enzimáticas para la integración de nuevos grupos de *T. rubrum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Definir las características macroscópicas de los cultivos de *T. rubrum* a través de la observación de: color del anverso y reverso de la colonia, así como su difusión al medio de cultivo, aspecto, textura y relieve.

-A través de exámenes microscópicos de las colonias del hongo, definir características de abundancia de microconidias y dispersión de éstas, presencia o ausencia de macroconidias y clamidoconidias.

-Determinar las características fisiológicas de parasitación al pelo, producción de ureasa y producción de pigmento en medios especiales.

-Demostrar mediante la técnica en placa la presencia de: proteasa, esterasa, DNasa, elastasa, hemolisina fosfolipasa y quitinasa.

-Establecer técnicas para medir cuantitativamente la producción de queratinasas y la actividad queratinolítica.

-Determinar el tiempo y concentración de sustrato inductor para la producción de queratinasas.

-Hacer un estudio parcial sobre la especificidad de la enzima semipurificada sobre diferentes sustratos de tipo protéico.

-Estudiar el efecto de EDTA, E64, PHMB, PMSF, LEUPEPTINA, APROTININA, sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada.

-Determinar su peso molecular.

4. H I P O T E S I S

Existen diferentes variedades fenotípicas en las cepas clínicas estudiadas de *T. rubrum*, como son su morfología macroscópica y microscópica, forma de penetración al pelo, producción de pigmento y de ureasa .

Es posible que exista una relación entre las variedades fenotípicas, el tipo y nivel de exoenzimas producidas por *T. rubrum*

También cabe la posibilidad de que en base al nivel y el tipo de exoenzimas secretadas por *T. rubrum*, se pueda explicar la preferencia de ataque a ciertos tejidos y la magnitud del daño, así como ser de utilidad para diferenciar sus variedades.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS.

a) Las cepas de *T. rubrum* fueron aisladas a partir de 70 pacientes con dermatofitosis de diferentes localizaciones: cuerpo, manos, barba, pies, ingle y uñas. (Tabla 1).

Como testigos para los ensayos enzimáticos se emplearon:

b) *Serratia marcescens* wf, de la colección del Lab. de Enzimas Microbianas de la ENCB, para la determinación de quitinasas, esterases, nucleasas, proteasas, queratinasas y fosfolipasas. c) *Streptococcus pyogenes* donado por el Lab. de Microbiología de la ENCB, para la prueba de hemolisina.

d) *Pseudomonas aeruginosa*, proporcionada por el Lab. de Microbiología del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto de la ciudad de San Luis Potosí, para la prueba de elastasa.

5.2. MEDIOS DE CULTIVO.

5.2.1. PARA EL AISLAMIENTO DE *Trichophyton rubrum*.

Las muestras de las lesiones de tiñas se sembraron en agar Sabouraud dextrosa (ASD) (BIOXON) y agar Micobiotico (BIOXON). Para estimular y conservar la reproducción así como para evitar el pleomorfismo se resembraron en medio de Borelli, el cual contiene: harina de trigo 14 g, leche descremada en polvo 14 g, miel de abeja 7 g, agar 14 g, para 1000 ml de medio. Se incubaron 15 días a 28°C, posteriormente se almacenaron a 4°C.

5.2.2. PARA LA OBSERVACION MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA DE

T. rubrum.

A partir de cultivos en ASD de 15 días de incubación a 28°C se determinaron tanto las características macroscópicas (aspecto, consistencia, textura, relieve, color en la superficie y reverso de la colonia, y difusión del pigmento), como las características microscópicas (forma,

tamaño, disposición y abundancia de hifas y conidias).^{46,104} Para determinar la forma y abundancia de hifas, clamidoconidias y macroconidias se realizaron microcultivos, y la abundancia de microconidias se determinó por conteo en la cámara de Neubauer.

5.2.3. PARA LA DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS DE *T. rubrum*.

a) Para favorecer la difusión del pigmento característico de *T. rubrum* se empleó el agar harina de maíz (AHM)(DIFCO) con dextrosa a 0.2% y agar papa dextrosa (APD) (BIOXON), incubando 15 días a 28°C.^{11,12,20}

b) Para la prueba de ureasa se empleó el medio de agar-urea de Christensen (DIBICO) incubando 8 días a 28°C. La hidrólisis de la urea se pone de manifiesto por el viraje de amarillo a rojo del indicador rojo de fenol.^{20,106}

c) Para la prueba de penetración al pelo o búsqueda de conidios ecto o endotrix, se empleó solución salina adicionada de extracto de levadura en una placa de Petri con trozos de pelo de niño, incubando un mes a 28°C.⁶³ Se hicieron observaciones cada semana en busca de órganos perforadores de forma cónica y/o de conidios ecto o endotrix en el cuerpo del pelo. Se empleó como testigo *T. mentagrophytes* por tener la capacidad de invadir la vaina del pelo, a diferencia de *T. rubrum* que solo crece en la superficie pero no penetra.^{2,36}

d) Para la prueba de termotolerancia las cepas se sembraron en ASD y se incubaron 21 días a 28°C y 42°C.

5.2.4. PARA LA DETERMINACION DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Se empleó un medio base sintético, libre de glicerol que contiene las siguientes sales: citrato de amonio 0.25 g, cloruro de sodio 0.1 g, fosfato ácido de potasio 0.15 g, sulfato de magnesio 0.05 g, carbonato de sodio 0.15 g, agar 1.5 g, para 100 ml de medio. Se disuelven las sales en agua destilada y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

Las pruebas se realizaron en placas que contenían este medio más un sustrato inductor. Se inocularon las cepas a probar y el testigo correspondiente. La actividad se hizo evidente por la formación de halos cuyo aspecto y tamaño permitían evaluar la hidrólisis del sustrato, aunque

los testigos dan la prueba positiva entre las 24 y 48 horas todas las lecturas se realizaron entre 1 a 3 semanas. Este medio se uso para la determinación de proteasas, esterases, fosfolipasas, quitinasas y queratinasas.

5.2.5. PARA LA EVALUACION DE PROTEASAS.

Se disolvió caseína (SIGMA) al 1.5 % en el medio base procurando mantener el pH entre 6.5 y 7 para evitar la precipitación de la caseína. Las placas inoculadas se incubaron 8 días a 28°C. Cuando hay secreción de proteasas, se forman halos con zonas opacas debido a la precipitación de paracaseinato de calcio, indicio de una hidrólisis parcial. Tales halos pueden o no tornarse transparentes dependiendo de si continúa o no avanzando el proceso enzimático.^{27,22}

5.2.6. PARA LA EVALUACION DE ESTERASAS.

En este caso se disuelve Tween-80 al 0.4 % y cloruro de calcio al 0.015 % en el medio base. Cuando hay secreción de esterases aparece un halo opaco granuloso en torno a la colonia, debido a la formación de oleato de calcio. Las placas se incubaron 8 días a 28°C.^{31,32,76}

5.2.7. PARA LA DETERMINACION DE FOSFOLIPASAS.

En este caso se disolvió yema de huevo de gallina al 3% en el medio base. Las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante 25 días. Cuando hay secreción de fosfolipasas, se forman halos con zonas claras (fosfolipasas A) o zonas opacas (fosfolipasas C).^{29,30,52,87,109.}

5.2.8. PARA EVALUACION DE QUITINASAS.

Al medio base sintético descrito se adicionó de quitina coloidal al 12% peso húmedo.

Esta se preparó pesando 10 g de quitina comercial (SIGMA) molida (malla 40) y adicionándole 100 ml de ácido fosfórico al 85%, enseguida se homogenizó y se dejó en refrigeración durante 24 h, luego se lavo con agua de la llave hasta eliminar el ácido y finalmente se esterilizó a 15 lb/15'. Cuando un microorganismo secreta quitinasas, puede observarse un halo transparente en torno a su colonia, debido a la digestión de las partículas insolubles de quitina.^{3,21} Se incubó por 3 semanas a 28°C observando diariamente.

5.2.9. PARA LA DETERMINACION DE HEMOLISINAS.

Se empleó el medio de agar sangre bacteriológico (DIFCO) adicionado de sangre desfibrinada al 5%, las placas se incubaron a 28°C durante 3 semanas. Las colonias productoras de hemolisina presentan halos transparentes.

5.2.10. PARA EVALUACION DE DNAsas.

Para esta prueba se empleó el medio de agar-DNA (DIFCO) adicionado de azul de O-toluidina (MERCK), descrito por Lachica, las placas se incubaron 8 días a 28°C. Cuando un microorganismo secreta DNAsas aparece en torno a su colonia un halo de color rosa.^{69,125}

5.2.11. PARA LA DETERMINACION DE ELASTASAS.

El medio que se utilizó fue agar-elastina (SIGMA) el cual presenta un aspecto opaco, las placas se incubaron 15 días a 28°C y se revisaron diariamente en busca de halos transparentes alrededor de las cepas productoras de elastasa.^{62,102,122.}

5.2.12. PARA LA DETERMINACION DE QUERATINASAS.

Se diseñó y se puso a punto una técnica, usando el medio base sin agar adicionado de lana al 0.6% pretratada con sulfito de sodio y teñida con azul brillante de remazol (SIGMA). Cuya preparacion se describira mas adelante. Las cepas se incubaron 8 días en agitación (130 rpm) a 28°C. A través de ésta técnica se puede hacer el estudio simultáneo de un gran número de cepas y la evaluación cuantitativa de la enzima por la valoración del colorante liberado a una longitud de onda de 585 nm. (Una unidad de queratinaasa equivale a un cambio en la A585 de 0.01),^{5,6,7,144}.

La lana se lavó con abundante agua y jabón hasta eliminar grasa y materia orgánica adherida. Después se suspendió en sulfito de sodio 0.3M y se llevó al autoclave durante 10-15 minutos a 10 lb de presión. Enseguida se lavó con suficiente agua hasta eliminar el sulfito de sodio. Este tratamiento tuvo por objeto labilizar y romper puentes de hidrógeno y de disulfuro, lo cual se refleja en un cambio en la consistencia del sustrato, tornándose un tanto gelatinoso, indicio de que se ha incorporado agua en la estructura de la queratina.⁹⁸ Este tratamiento se le dio habitualmente a la lana para usarla como inductor para la producción de queratinasas.^{127,128}

Para teñir la lana se tomaron en principio las indicaciones de Poincelot y Day¹⁰⁸ para teñir celulosa con azul brillante de remazol con algunas modificaciones.

Se colocaron en un vaso de precipitado 370 ml de agua destilada y se hirvieron con el colorante (1.5 g de azul brillante de remazol) por 15 minutos, tapando con una cápsula de porcelana llena con agua que servirá a manera de refrigerante para evitar la pérdida de agua en el vaso. Enseguida se añadieron 20 g de lana y cada 2 minutos durante 10 minutos sulfato de sodio (30 g disueltos en 100 ml de agua destilada) agitando después de cada adición. Luego se añadió fosfato de sodio (1.5 g disueltos en 15 ml de agua destilada hirviendo) gota a gota y agitando. Finalmente se agitó e hirvió 15 minutos más. Posteriormente se lavó abundantemente con agua de la llave hasta que ya no se desprendió colorante. Se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente. Una vez seca se molió en el molino Wiley (A. H. Thomas), con una malla 60 (fig 1).

Este sustrato teñido sirvió tanto para evaluar la producción de queratinasas, como para ensayos de rutina de la actividad queratinolítica, por la valoración del colorante liberado a una longitud de onda de 585nm, que es la longitud a la cual se observa la mayor absorbencia del azul brillante de remazol en un rango intervalo de pH de 5 a 12. (fig. 2).



Figura 1. Tratamiento y tinción de la lana

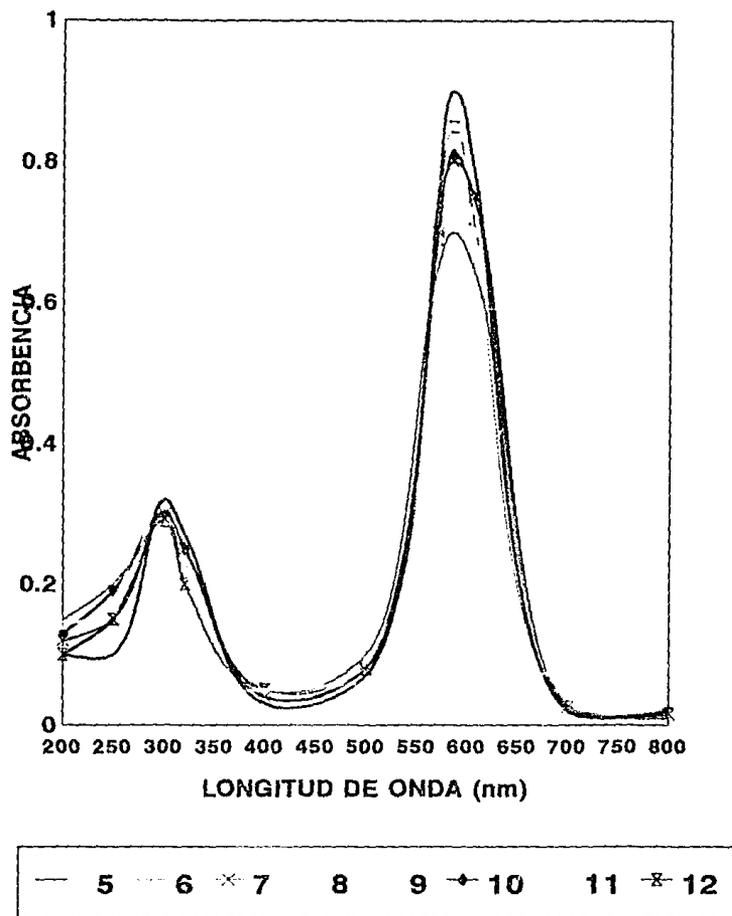


Figura 2. Espectros de absorción del azul brillante de Remazol en intervalos de pH de 5 a 12.

5.3. CONDICIONES PARA LA PRODUCCION DE QUERATINASAS.

La cepa más queratinolítica (cepa 3, fig. 29), se sembró en medio base adicionado de lana, a fin de condicionarla para la producción de la enzima. Una vez condicionada se tomaron de este cultivo 0.5 g de micelio (peso húmedo) y se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 1 l que contenían 200 ml de medio base adicionado de lana al 3%. Se incubó durante 4 semanas a 28°C. Al término de este tiempo el cultivo se centrifugó a 7000 rpm en una centrifuga JA-21, rotor JA-10 a 4°C durante 15 minutos y el sobrenadante así obtenido se empleó para los diferentes ensayos enzimáticos y para la purificación parcial de la enzima.

5.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA.

Para medir la actividad queratinolítica en el extracto crudo se colocaron en un tubo eppendorf: 50 mg de lana teñida, 2 a 3 mg de proteína por ml y 0.2 ml de regulador de glicina-NaOH 0.2 M pH 9. En el caso de la enzima parcialmente purificada se colocan: 0.40 mg de lana teñida, 60 µg/ml de proteína y 0.2 ml de regulador de glicina-NaOH 0.2 M pH 9 o 0.2 ml del regulador de TRIS-HCl 0.2 M pH 8. Se incubó durante 2 h a 37°C en agitación. La reacción se detuvo por centrifugación a 4000 rpm y la actividad se midió como un incremento en la A585 debida a la liberación de color del sustrato inducido por la enzima. Un cambio de 0.01 unidades en la A585 equivale a una unidad de actividad queratinolítica. Se emplearon 2 controles en cada ensayo (i)enzima y regulador, y (ii)lana teñida y regulador.

* **Nota:** las condiciones descritas en el apartado 5.3 y 5.4 fueron el resultado de una serie de investigaciones, cuyos resultados serán descritos en el capítulo siguiente.

5.5. PURIFICACION DE LA QUERATINASA.

El cultivo de *T. rubrum* (600 ml) incubado a temperatura ambiente durante 4 semanas (fase estacionaria) se centrifugó durante 15 minutos a 7000 rpm (centrifuga modelo JA-21, rotor JA-10) y el sobrenadante (550 ml) obtenido se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación final en agitación constante toda la noche. Posteriormente se centrifugó 30 minutos a 7000 rpm desechando el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 50 ml del regulador Tris-HCl 20 mM pH 7 y se dializó contra 4 l del mismo regulador a 4°C con agitación constante durante toda

la noche, haciendo un cambio. Enseguida se concentró con Aquacide IIA hasta un volumen de 6 ml de los cuales 4.5 ml se aplicaron a una columna de Biogel P-100 (18mm x 220mm), equilibrada con regulador Tris-HCl 20 mM pH 7. Se eluyó con el mismo regulador a una velocidad de flujo de 4 ml/h, colectándose fracciones de 2 ml. Se determinó la proteína por el método de Lowry⁷⁷ así como la actividad enzimática en cada fracción, mezclando las fracciones con mayor actividad queratinolítica para realizar la caracterización de la enzima.

5.6. CARACTERIZACION PARCIAL DE LA QUERATINASA.

5.6.1. DEGRADACION DE DIFERENTES SUSTRATOS POR LA QUERATINASA DE *T. rubrum*.

a) Para la degradación de azoalbumina se utilizó la técnica descrita por Beyon y Bond,¹⁴ según el siguiente procedimiento.

- 1.-Los sustratos y las soluciones enzimáticas deben de estar a 25°C.
- 2.-Tomar 250 µl del sustrato en un tubo Eppendorf y añadir la concentración de enzima deseada, mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 1-2 h.
- 3.-Parar la reacción por la adición de 1.2 ml de ácido tricloroacético al 10%.
- 4.-Centrifugar la mezcla de reacción a 8000 rpm durante 2-5 min y transferir 1.2 ml del sobrenadante a un tubo que contiene 1.4 ml de NaOH 1.0 M.
- 5.-Determinar la absorbencia a una longitud de onda de 440 nm. Una unidad de actividad de proteasa se define como la cantidad de enzima requerida para producir un cambio en la absorbencia de 1.0.

Se usan dos blancos: a) sustrato + regulador de glicina-NaOH 0.2 M sin enzima.

b) regulador de glicina-NaOH 0.2 M + enzima + ácido tricloroacético sustrato
(es importante añadirlos en este orden).

b) Para la degradación de Hide Powder Azure (SIGMA) (derivado de colágena de piel teñido con azul brillante de remazol). La queratinasa se incubó con 4 mg de este sustrato en el regulador de glicina-NaOH 0.2 M pH 9 durante 1 y 2 h a 37°C en agitación constante. El volumen final de la reacción fue de 1.6 ml. La reacción se detuvo al centrifugar 5 min a 7000 rpm. La degradación del sustrato se midió por evaluación de la A_{595} del sobrenadante. Un cambio de 0.1 en la A_{595} equivale a una unidad enzimática.

5.6.2. EFECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES DE PROTEASA SOBRE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA.

Se probaron 6 diferentes inhibidores de proteasa, los cuales fueron: fenilmetilsulfonilfloruro (PMSF) (10mM), leupeptina (20 μ g), aprotinina (30 μ g), E-64 (10 μ M), parahidrozimercuribenzoato (PHMB) (100 mM), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (100 μ M), y se determinó la actividad queratinolítica como se describió en Material y Métodos (5.4). El control utilizado fue tripsina con azoalbumina como sustrato.

5.6.3. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR Y ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

a) Electroforesis en condiciones desnaturalizantes: la separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (Laemmli ⁷⁰) al 7.5 %. Los geles se prepararon en placas de vidrio de 18 x 16 cm y de 1.0 mm de grosor de un equipo vertical (Hoefer Scientific Instruments). Tanto el gel separador como el gel concentrador se prepararon a partir de una solución de acrilamida y bisacrilamida al 30% en agua bidestilada, según el esquema siguiente:

	Gel separador (22.5 ml)	Gel concentrador (7.503 ml)
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	5.625 ml	1.25 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	5.625 ml	-
Tris 0.5 M pH 6.8	-	1.88 ml
Agua bidestilada	10.905 ml	4.25 ml
Filtrar y desgasificar	10'	-
SDS al 10%	0.225 ml	0.075 ml
TEMED	0.020 ml	0.008 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.100 ml	0.040 ml

Un volúmen de proteínas, correspondiente a 70 μg se mezcló 1:1 con solución solubilizadora con la siguiente composición: Tris-Hcl 0.5 M (pH 6.8), SDS al 4%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0.016%. Las muestras se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos y se aplicaron en el gel. Se empleó como regulador de corrida Tris 0.025 M - Glicina 0.02 M. La electroforesis se realizó a 20 mA/gel hasta que la marca del azul de bromofenol llegaba a 0.5 cm del extremo inferior de la placa. Como marcadores se empleó una mezcla de los siguientes estándares: Albúmina (66,000 Da), Ovoalbúmina (45,000 Da), Anhidrasa carbónica (29,000 Da), Inhibidor de tripsina (21,000 Da) y Lisozima (14,000 Da).

b) ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS.

Los geles de poliacrilamida (7.5%) se polimerizaron en presencia de gelatina tipo I de piel de cerdo al 0.1%. Se aplicaron concentraciones de proteína de 50 µg/ml de cada fracción. En este caso a las muestras no fueron adicionadas del agente reductor, ni se calentaron. Después de la electroforesis, el gel se lavó con 100 ml de Triton X-100 al 2.5% (p/v) durante 2 h (para remover el SDS) y posteriormente se incubó en 100 ml de regulador Tris-HCl 100 mM adicionado de CaCl₂ 1 mM, pH 7.8 durante 1-2 h a 37°C. La reacción se detuvo lavando el gel en ácido tricloroacético al 50% (p/v) durante 1 h, a temperatura ambiente. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 durante 1 h, y se destiñó con una mezcla de metanol al 45% (v/v)/ácido acético al 10% (v/v) hasta que se observó clarificación de las bandas con actividad proteolítica.^{57,72.}

c) TINCION DE LOS GELES

1.TINCION CON AZUL DE COOMASSIE.

Cuando se requirió, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie al 0.25% , disuelto en una mezcla de metanol al 25% y ácido acético al 10%) durante dos horas. Para desteñirlos, se empleó una solución de ácido acético al 10% y metanol al 50%, hasta que desapareció el fondo azul y finalmente se trataron con una solución de ácido acético al 7% y metanol al 5%.

2. TINCION CON NITRATO DE PLATA.

Para esta tinción los geles se trataron con las soluciones (BIO-RAD) que se indican a continuación:

Reactivo	Volúmen (ml)	Tiempo (min.)
1. Fijador (metanol 40%, ácido acético 10%)	200	30
2. Fijador (etanol 10%, ácido acético 5%)	200	15

3. Fijador (etanol 10%, ácido acético 5%)	200	15
---	-----	----

4. Oxidante	100	5
-------------	-----	---

5. Agua desionizada	200	5
---------------------	-----	---

Este paso se repitió hasta que desapareció por completo la coloración amarilla.

6. Reactivo de plata	100	20
----------------------	-----	----

7. Agua desionizada	200	1
---------------------	-----	---

8. Revelador	100	0.5
--------------	-----	-----

Se reveló hasta que la solución se tornó amarilla o hasta que apareció un leve precipitado color humo

9. Revelador	100	5
--------------	-----	---

10. Revelador	100	5
---------------	-----	---

11. Acido acético al 5%	200	5
-------------------------	-----	---

6. RESULTADOS

Las cepas clínicas estudiadas fueron aisladas de pacientes con dermatofitosis, principalmente en uñas de pies (47.1%), (Tabla I, fig. 3-5).

6.1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

6.1.1. CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS.

Las colonias de las 70 cepas analizadas se observaron planas de color blanco a cremoso, ocasionalmente rosadas y con una ligera elevación central (fig.6). El 78% de las cepas presentó un aspecto algodonoso, un 13% polvoso y un 9% aterciopelado (tabla II). El 77% presentó en ASD un pigmento rojo vino difusible al medio de cultivo (fig.7).

6.1.2. CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS.

En las cepas que presentaron conidiación (78.6%), se observó la forma, el tamaño y la disposición característica de las microconidias de esta especie. El 21.4% de las cepas no presentó conidiación (fig.8-9), en un 10% se observaron clamidoconidias (fig.10) y en un 7.1% macroconidias (fig.11).

6.2. CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS.

6.2.1. INVASION AL PELO *in vitro*.

Ninguna de las 70 cepas aisladas presentó órganos de perforación, solamente la cepa aislada de la barba presentó conidios endotrix, todas las demás cepas crecieron sobre la superficie de la vaina del pelo.

Tabla I. Origen clínico de las 70 cepas aisladas de T. rubrum.

AREA AFECTADA	NUMERO DE CASOS	%
UNAS PIES	33	47.1
PIES	21	30.0
INGLE	8	11.4
CUERPO	4	5.7
MANO	2	2.8
CARA	1	1.4
BARBA	1	1.4
TOTAL	70	100



Figura 3. Exámen microscópico directo de escamas con KOH al 10% (400x).

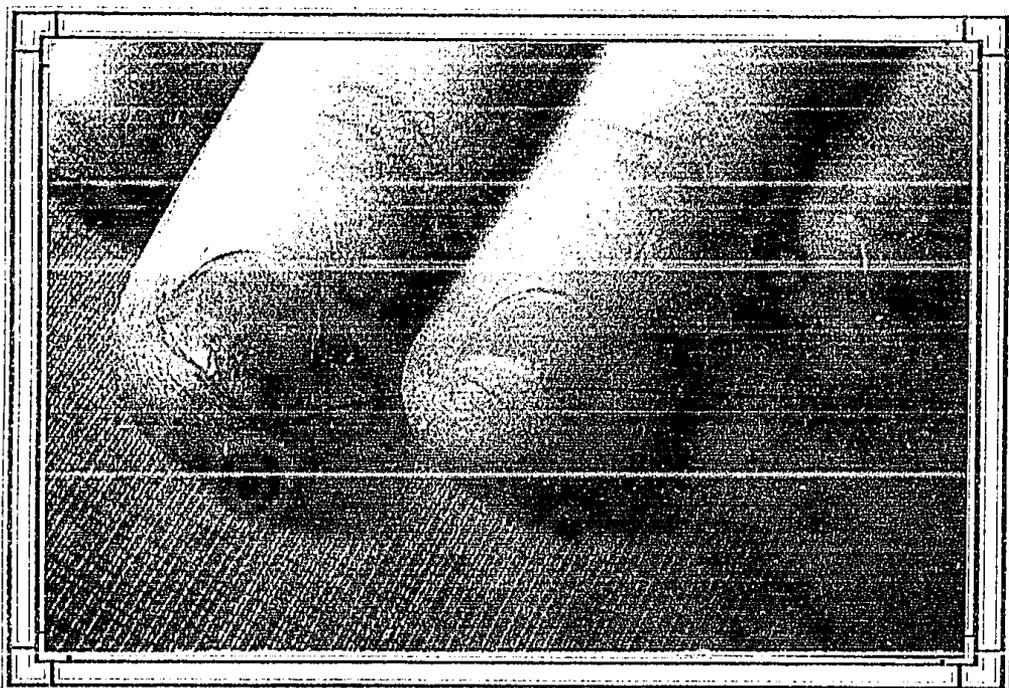


Figura 4. Tiña de uñas por T. rubrum.

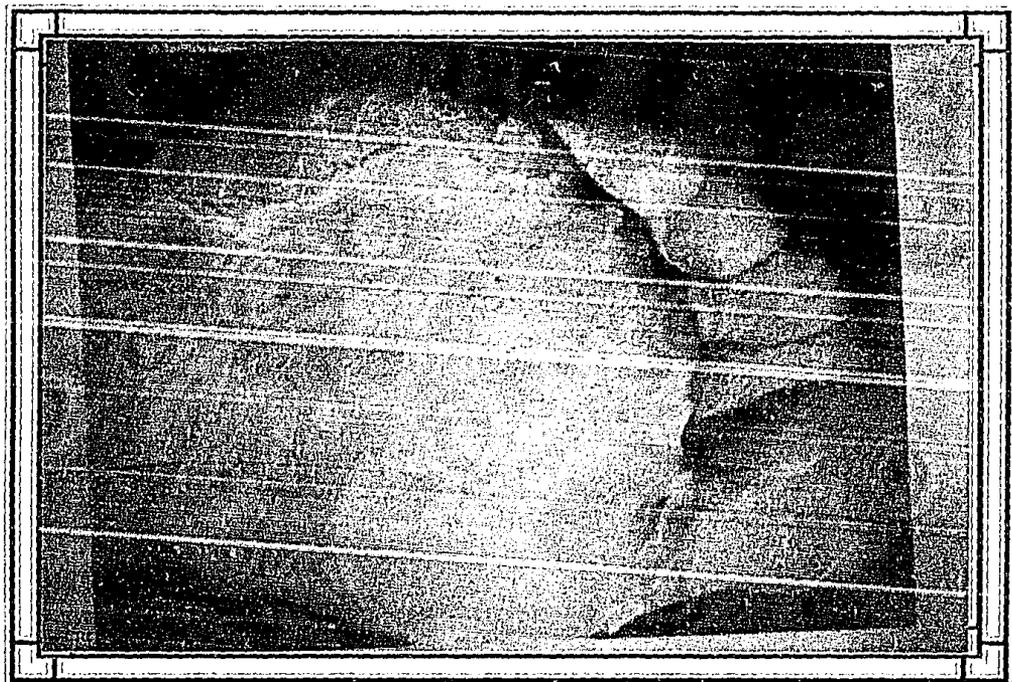


Figura 5. Tiña de pies por T. rubrum.

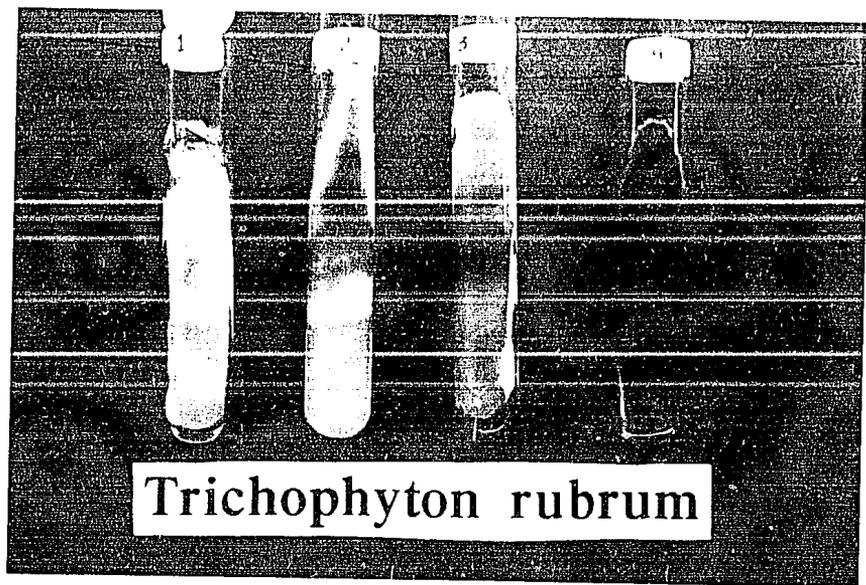
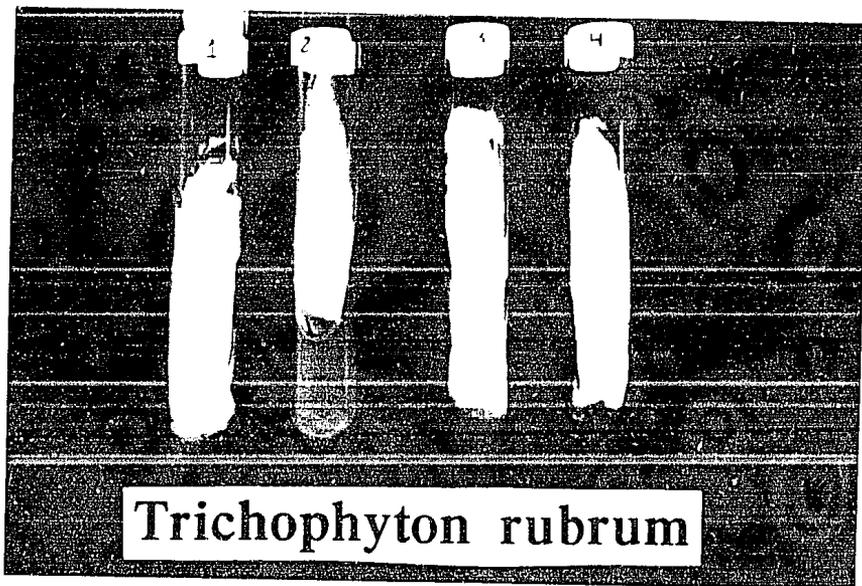


Tabla II. Aspecto de las cepas aisladas
de T. rubrum.

ASPECTO	PORCIENTO
ALGODONOSO	78
POLVOSO	13
ATERCIOPELADO	6
TOTAL	100

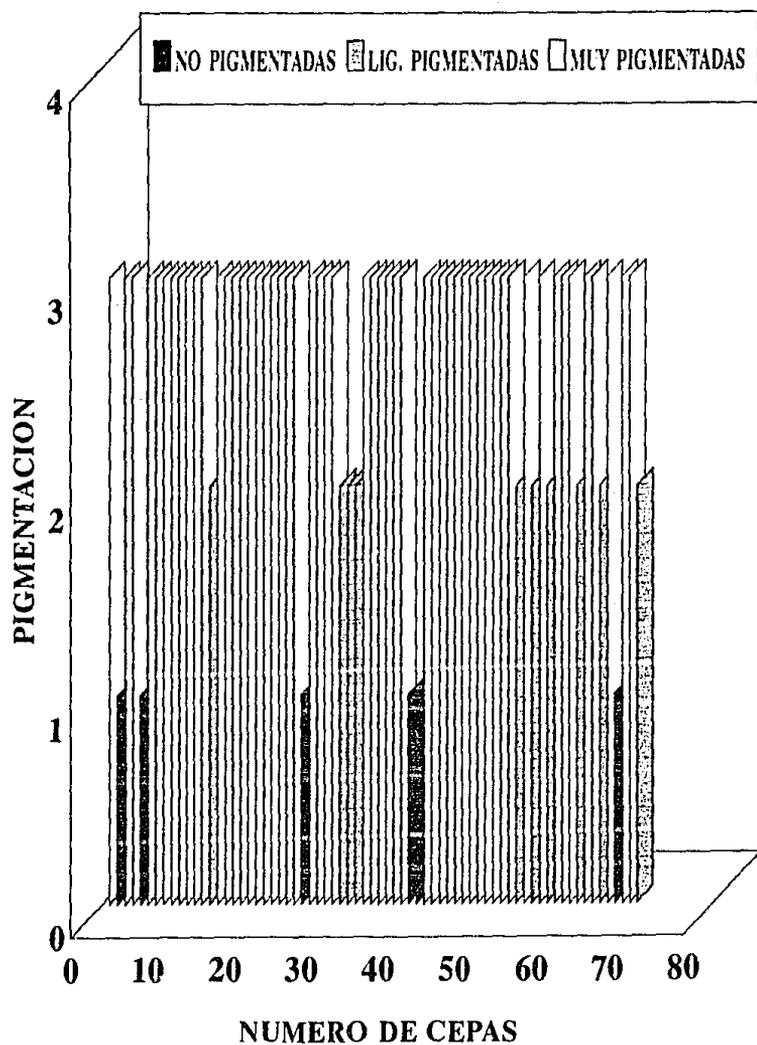


Figura 7. Producción de pigmento rojo vino por las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*.

- 1.- Cepas no pigmentadas.
2. Cepas ligeramente pigmentadas.
- 3.- Cepas muy pigmentadas.

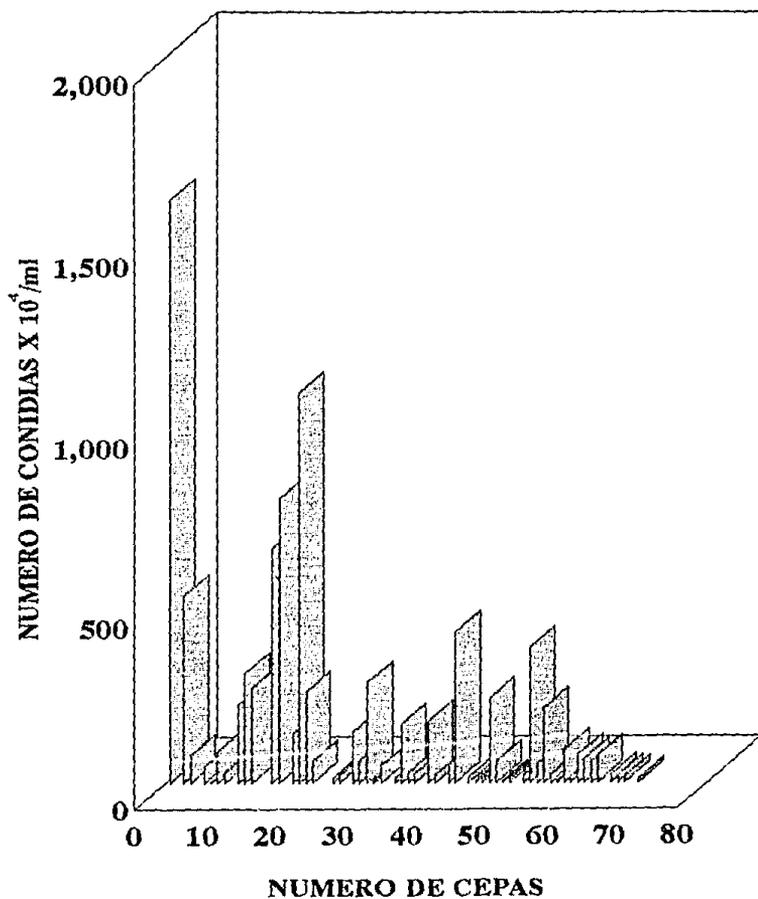


Figura 8. Producción de microconidias por las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*. (ASD, 15 días de incubación, 28°C.).



Figura 9. Vista microscópica de T. rubrum que muestra microconidias piriformes sostenidas en forma aislada.

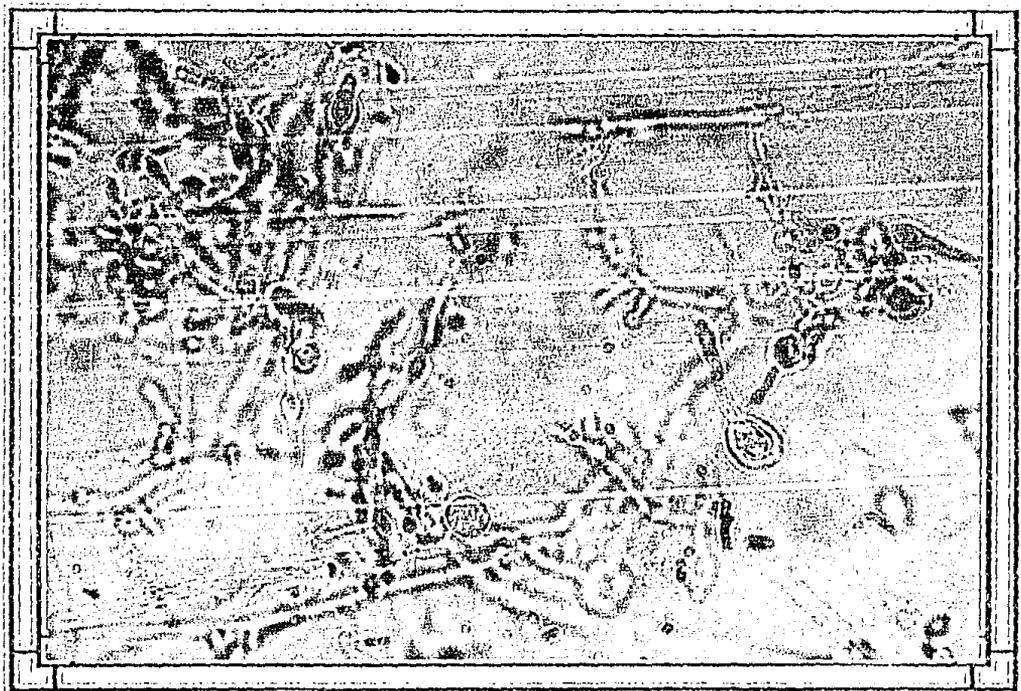


Figura 10. Observación microscópica de *T. rubrum* que muestra
e chlamidoconidias.

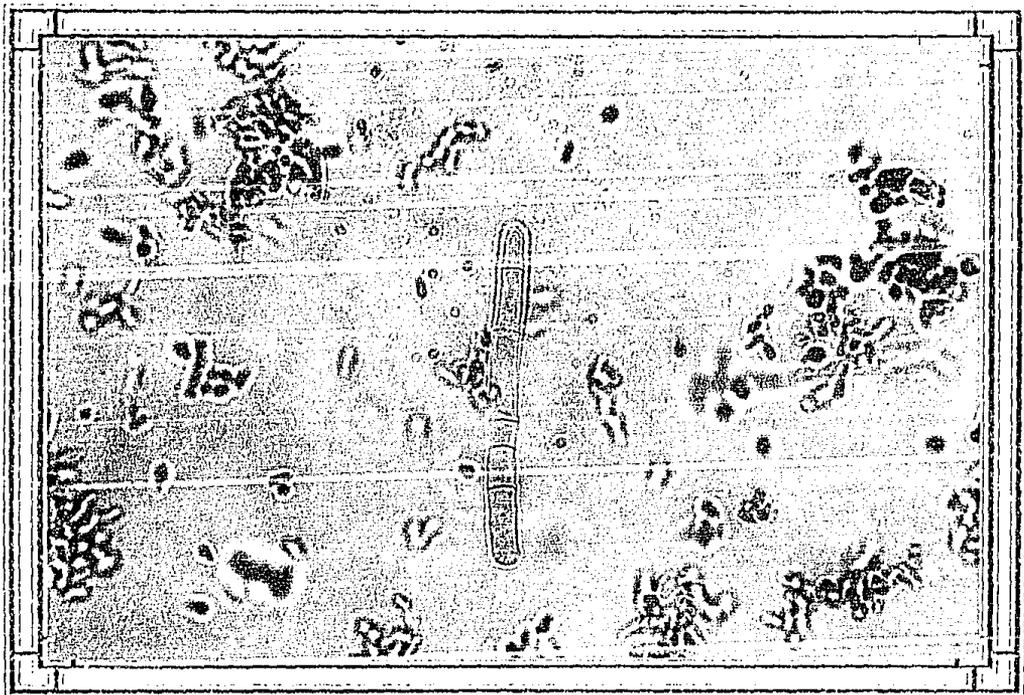


Figura 11. Observación microscópica de *T. rubrum* que muestra macroconidias oscuras, con aspecto de puro.

6.2.2. PRUEBA DE LA UREASA.

Un 28.5% de las cepas analizadas presentó una reacción debilmente positiva para esta prueba (fig.13-14).

6.2.3. PRODUCCION DE PIGMENTO EN MEDIOS ESPECIALES.

Tanto en APD como en AHM todas las cepas produjeron el pigmento rojo vino característico de *T. rubrum* así como su difusión al medio de cultivo. (fig.15).

6.2.4. TERMOTOLERANCIA

Del total de copas analizadas únicamente 5 (7.14%) presentaron crecimiento a 42°C.

6.3. PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES.

Se determinó la producción de 8 enzimas por las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*, de las cuales las actividades de: elastasa, esterasa, DNasa, fosfolipasa, proteasa, hemolisina y quitinasa se determinaron en placa utilizando el medio base adicionado de un sustrato específico para cada enzima (fig.16-22), mientras que la actividad de queratinasas se determinó en matraces con el medio base adicionado de lana teñida como sustrato y midiendo la actividad enzimática por la liberación de color a una longitud de onda de 585 nm. (fig.23). Las actividades enzimáticas de proteasas, esterases, fosfolipasas, elastasas y DNasas fueron positivas, presentando diferentes de halos de hidrólisis (Tabla III). Las actividades de hemolisina y quitinasa no se presentaron en ninguna de las cepas analizadas. De las actividades positivas la que presentó los mayores halos de hidrólisis (10-20 mm) fue la elastasa (55.71%), el 14.28% de 5.1 a 7.5 y 30% de 0 a 2.5 mm. (fig.24). La segunda mayor actividad encontrada fue la de esterases, en la cual se observaron halos de hidrólisis de 7.6 a 10 mm (21.42%), 5.1 a 7.5 mm (51.42%) y de 2.6 a 5.0 (27.1%) (fig.25). La siguiente mayor actividad encontrada fue la DNasa con halos de hidrólisis de 5.1 a 7.5 (48.57%), 2.6 a 5.0 (34.28%) y de 0 a 2.5 (17.14%) (fig.26) y las menores actividades encontradas fueron la de fosfolipasa y proteasa, con halos de hidrólisis de 2.6 a 5.0 mm (64.2% Y 17.14%) y de 0 a 2.5 mm (35.7% y 82.85%) respectivamente. (fig.27-28). Con respecto a la producción de queratinasas,

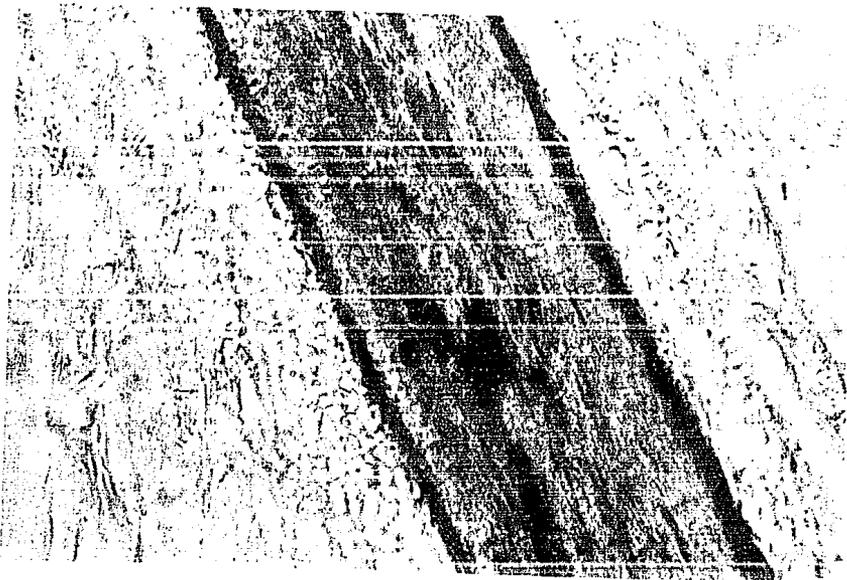
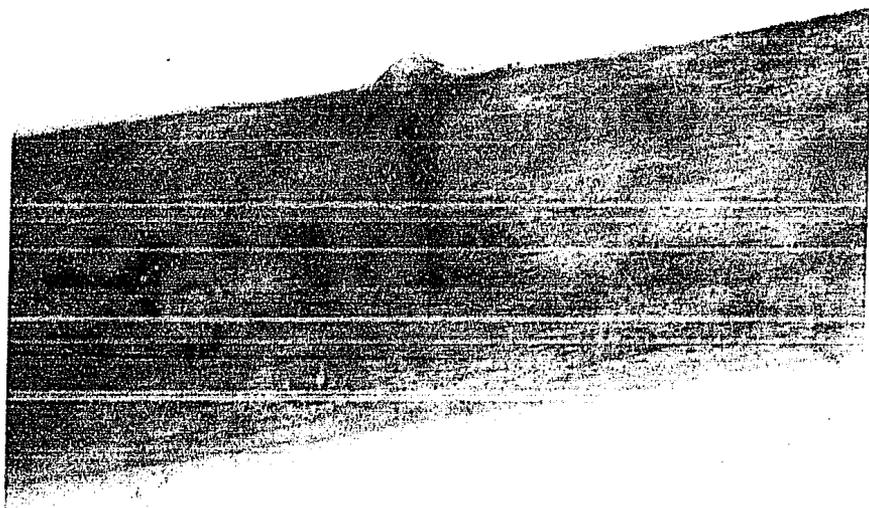
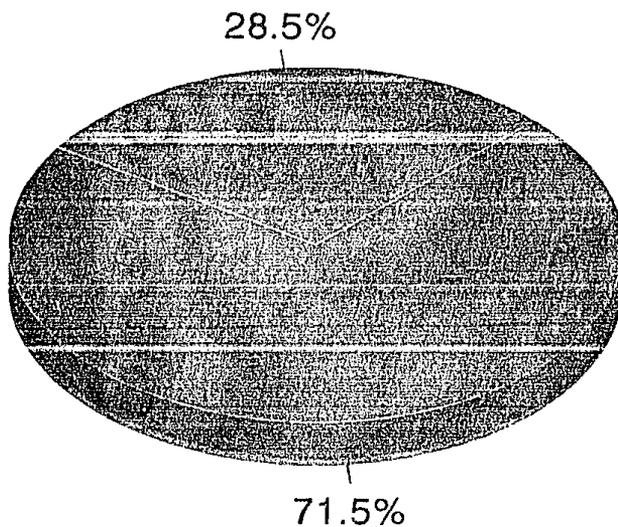


Figura 11. Examen microscópico de pelo punzado por dermatofitosis.

UREASA DEBILMENTE POSITIVA



UREASA NEGATIVA

Figura 13. Producción de ureasa de las 70 cepas aisladas de T. rubrum. Se empleó el medio de agar-urea de Christensen, incubando 8 días a 28°C.

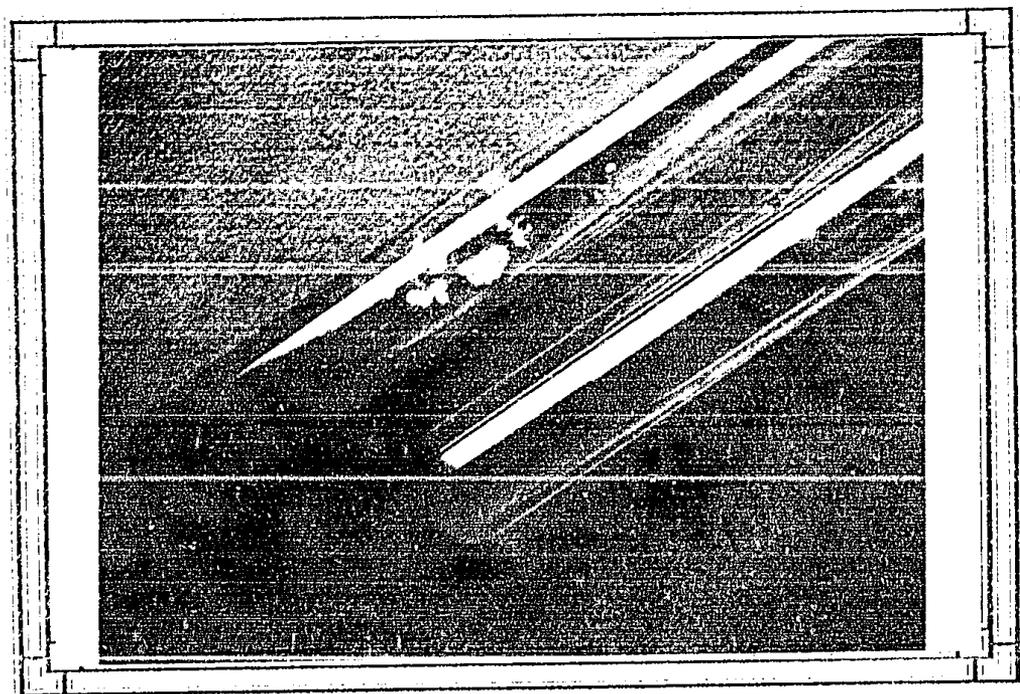


Figura 14. Prueba de Ureasa en T. rubrum. (Agar urea de Christensen, 8 días de incubación, 28°C.). (A) T. mentagrophytes.
(B) T. rubrum.

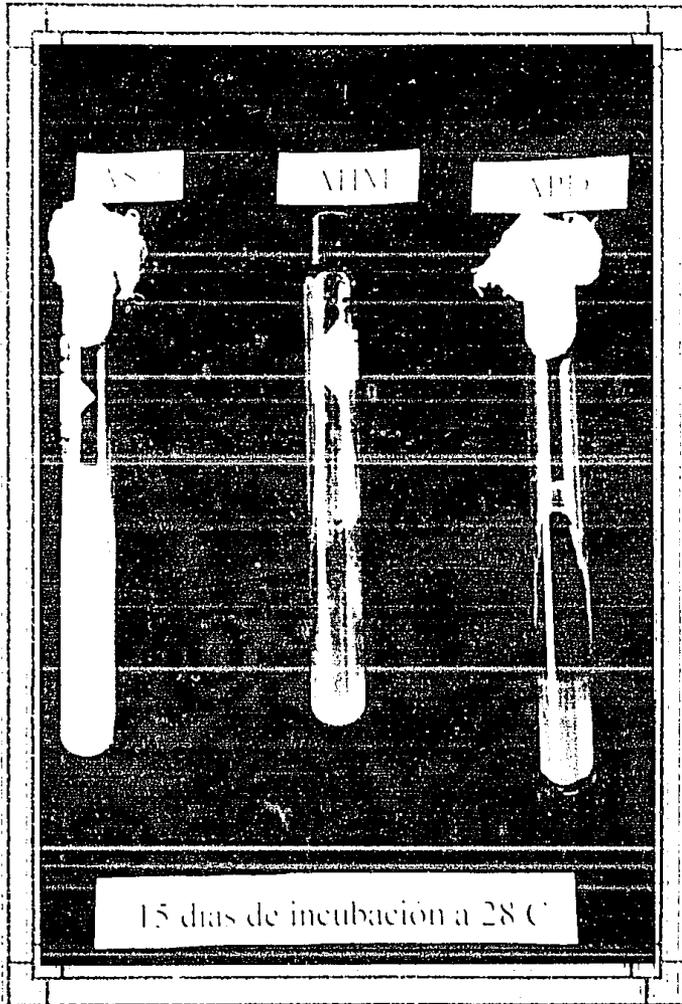


Figura 15. Producción de pigmento difusible al medio por *T. rubrum*. AS: Agar Sabouraud Dextrosa, AM: Agar Harlan de Rafin, APD: Agar Papa Dextrosa. (15 días de incubación a 28°C).

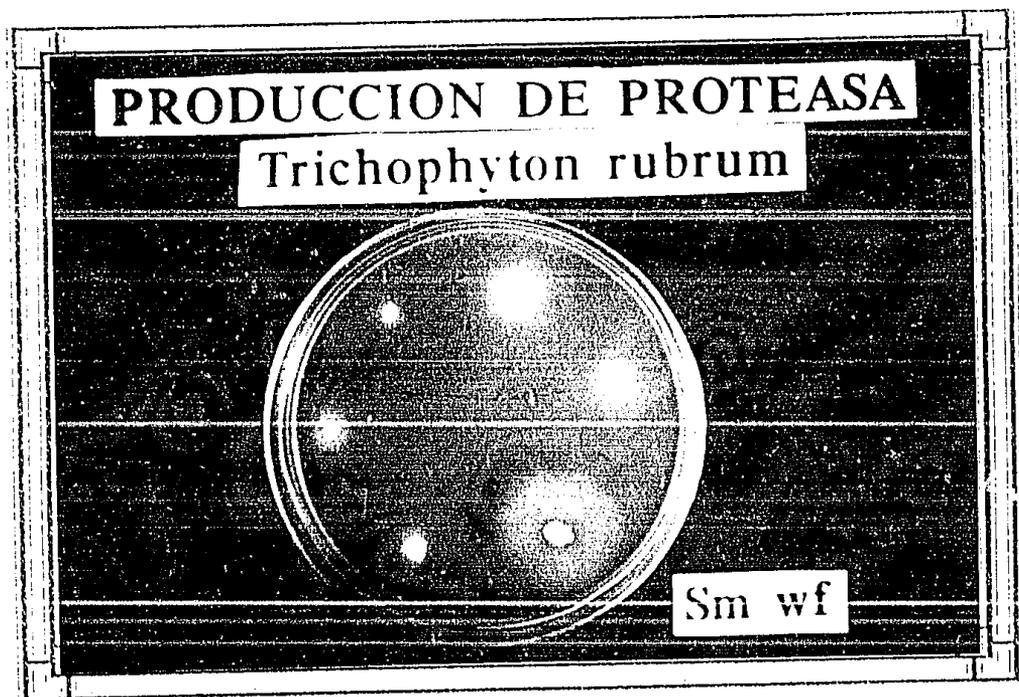
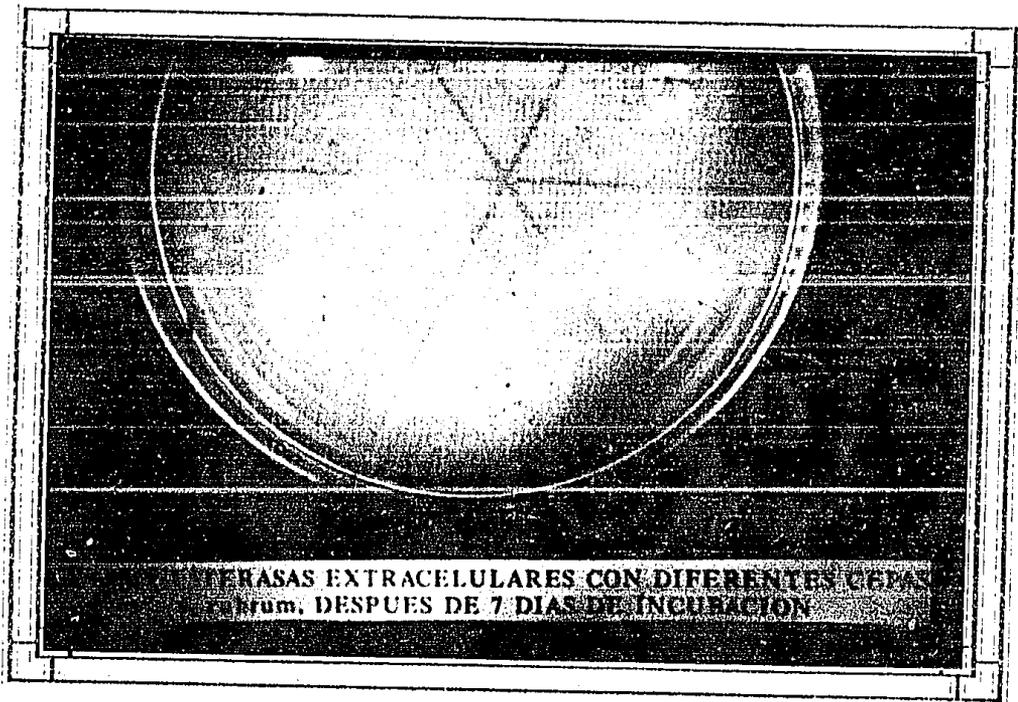
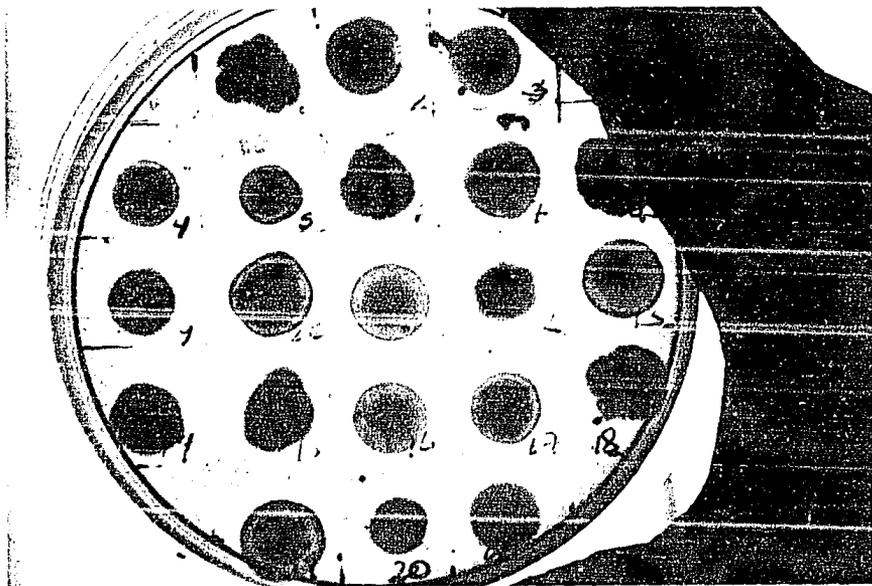


Figura 16. Producción de proteasa en algunas cepas de *T. rubrum*, en medio base adicionado de caseína al 1.5%, 8 días de incubación, 28°C.
Control positivo: *S. marcescens* wf.



MATRICES EXTRACELULARES CON DIFERENTES CEBAS
de *T. rubrum*, DESPUES DE 7 DIAS DE INCUBACION

Figura 12. Producción de esteranas en algunas cepas de *T. rubrum*,
en medio base adicionado de Tween 80 al 0.4% y CaCl_2 al
0.015%, 8 días de incubación, 28°C.
Control positivo: *B. marcescens* w.f.



ENSAYO DE LECITINASAS CON DIFERENTES CEPAS DE
T. rubrum, EN UN MEDIO BASAL-YEMA DE HUEVO AL
3% AGAR; 48 h DE INCUBACION A 28 C.

Figura 18. Producción de fosfolipasas por algunas cepas de *T. rubrum*.

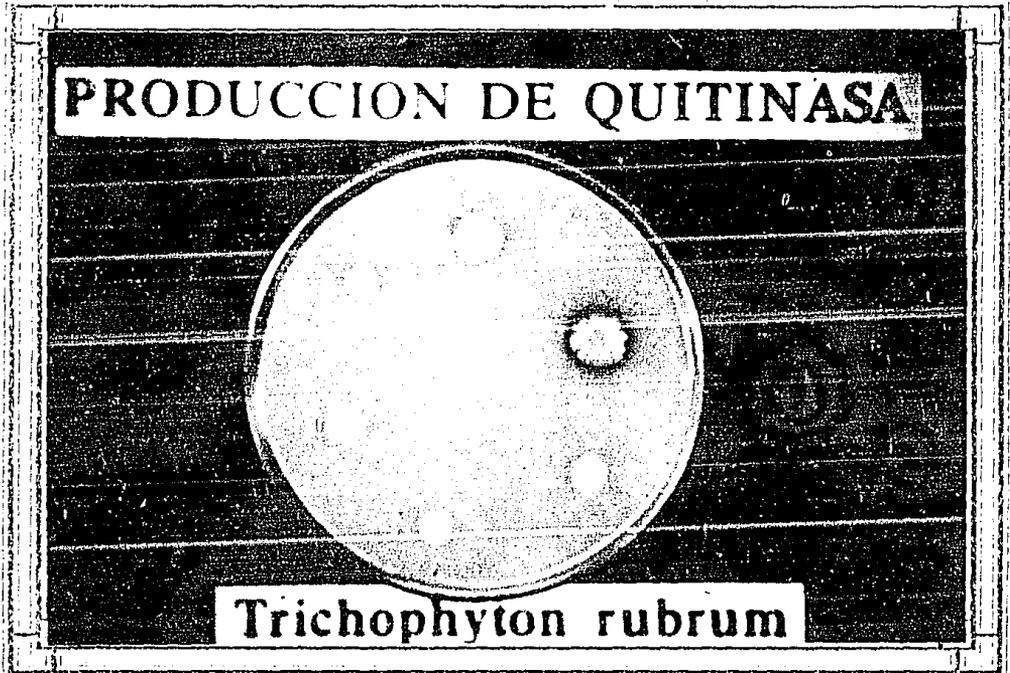


Figura 19. Producción de quitinasas por algunas cepas de T. rubrum, en medio base adicionado de quitina coloidal al 1% peso húmedo, 3 semanas de incubación, 28°C.
Control positivo: S. marcescens wf.

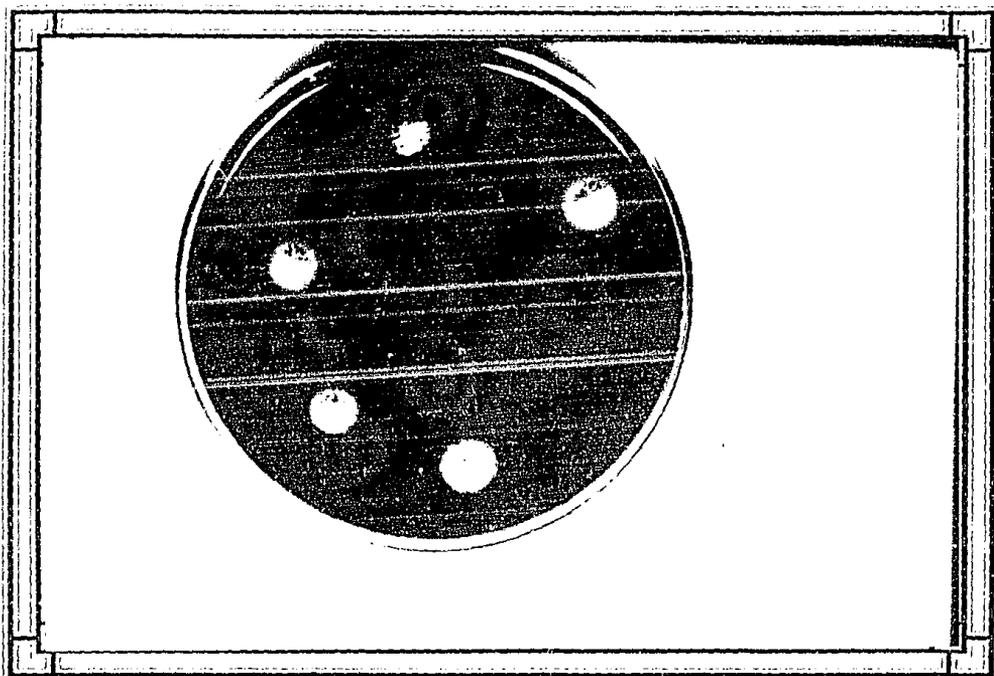
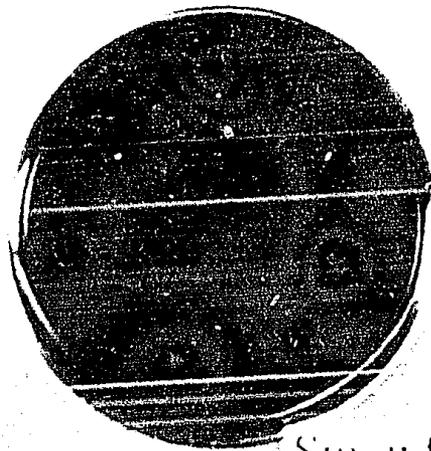


Figura 20. Producción de hemolisina por algunas cepas de T. rubrum, en medio de agar sangre adicionado de sangre desfibrinada al 5%, 3 semanas de incubación, 28°C.
Control positivo: *S. pyogenes*.

PRODUCCION DE DNASA
Trichophyton rubrum



Sim wf

Figura 21. Producción de DNasas por algunas cepas de *T. rubrum*, en medio de agar adicionado de DNA al 0.03%, 8 días de incubación, 28°C.

Control positivo: *S. marcescens* wf.



Figura 22. Producción de elastasas por algunas cepas de *T. rubrum*, en medio de agar adicionado de elastina al 10%, 15 días de incubación, 28°C.
Control positivo: *P. aeruginosa*.

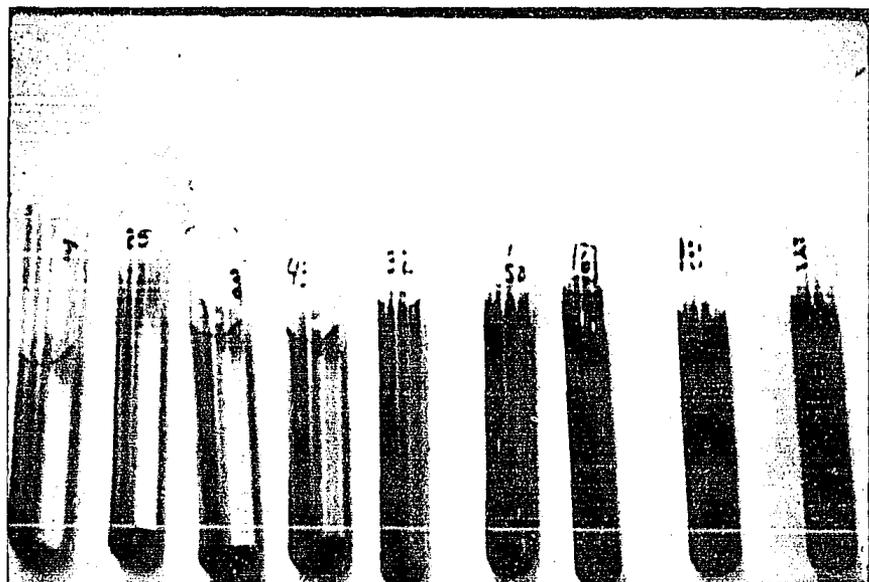


Figura 23. Producción de queratina por *T. rubrum*.

Tabla III. Perfil hidrolítico extracelular de las 70 cepas aisladas de T. rubrum.

VALOR	ENZIMAS									
	ELASTASAS		ESTERASAS		DNasa		FOSFOLIPASAS		PROTEASAS	
	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%
0 - 2.5	21	30	-	-	12	17.1	25	35.7	58	82.8
2.6 - 5.0	-	-	19	27.1	24	34.2	45	64.2	12	17.1
5.1 - 7.5	10	14.2	36	51.4	34	48.5	-	-	-	-
7.6 - 10.0	-	-	15	21.4	-	-	-	-	-	-
10.1 - 20.0	39	55.7	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	70	100	70	100	70	100	70	100	70	100

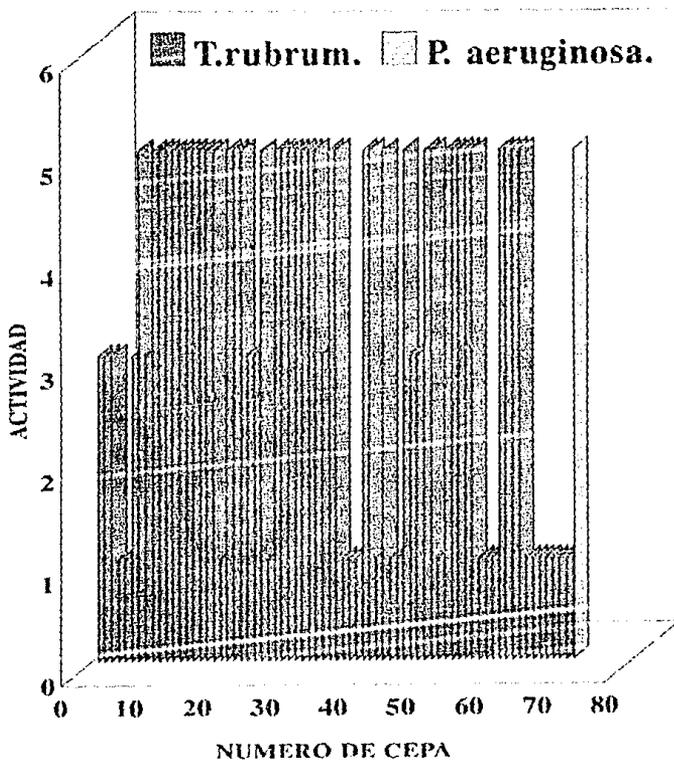


Figura 24. Actividad de elastasas en las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*. Control Positivo: *P. aeruginosa*.

1. Halo de hidrólisis de 0-2.5mm
2. Halo de hidrólisis de 2.6-5mm.
3. Halo de hidrólisis de 5.1-7.5mm.
4. Halo de hidrólisis de 7.6-10mm.
5. Halo de hidrólisis de 10.1-20mm.

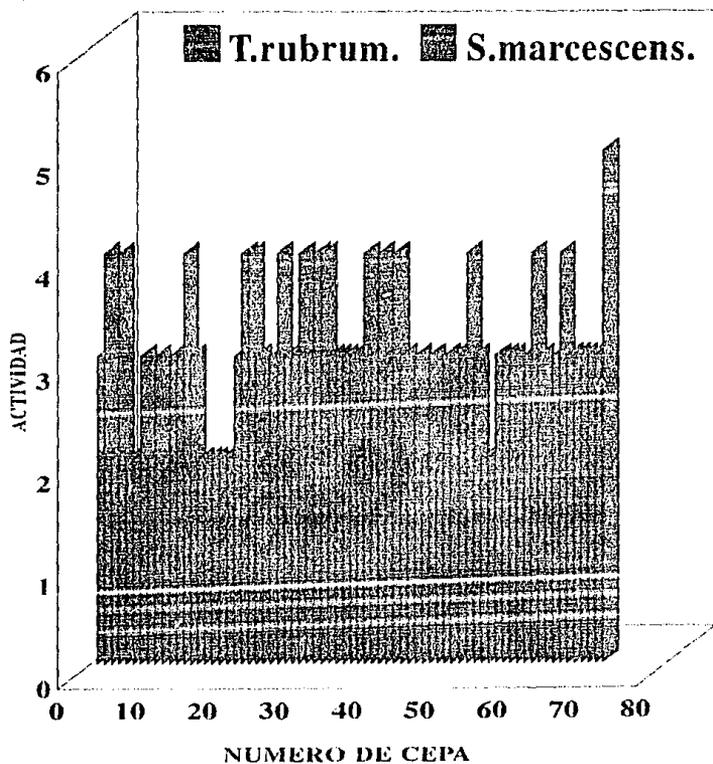


Figura 25. Actividad de esterases en las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*.
Control Positivo: *S. marcescens*.

1. Halo de hidrólisis de 0-2.5mm
2. Halo de hidrólisis de 2.6-5mm.
3. Halo de hidrólisis de 5.1-7.5mm.
4. Halo de hidrólisis de 7.6-10mm.
5. Halo de hidrólisis de 10.1-20mm.

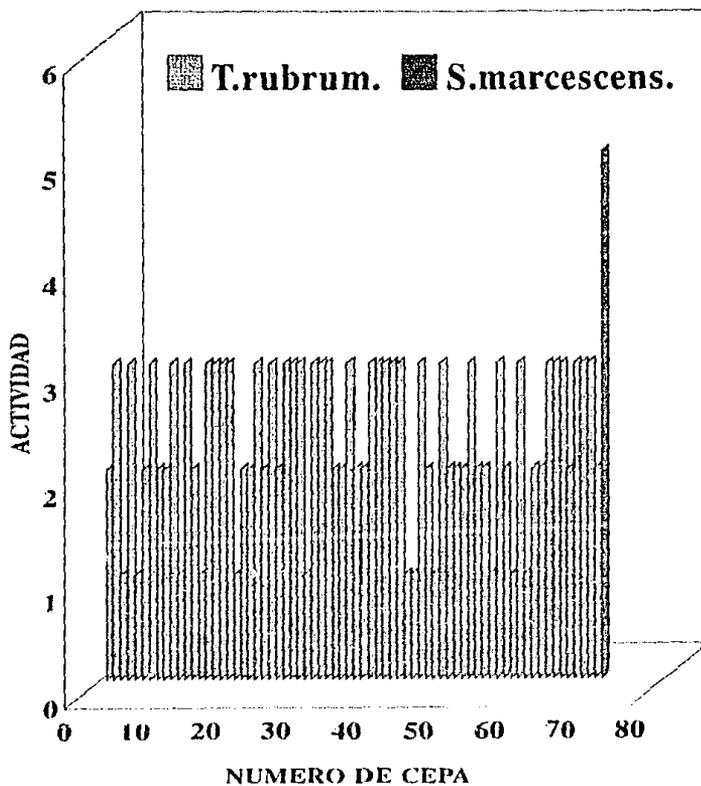


Figura 26. Actividad de DNasas en las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*.
Control Positivo: *S. marcescens*.

1. Halo de hidrólisis de 0-2,5mm.
2. Halo de hidrólisis de 2,6-5mm.
3. Halo de hidrólisis de 5,1-7,5mm.
4. Halo de hidrólisis de 7,6-10mm.
5. Halo de hidrólisis de 10,1-20mm.

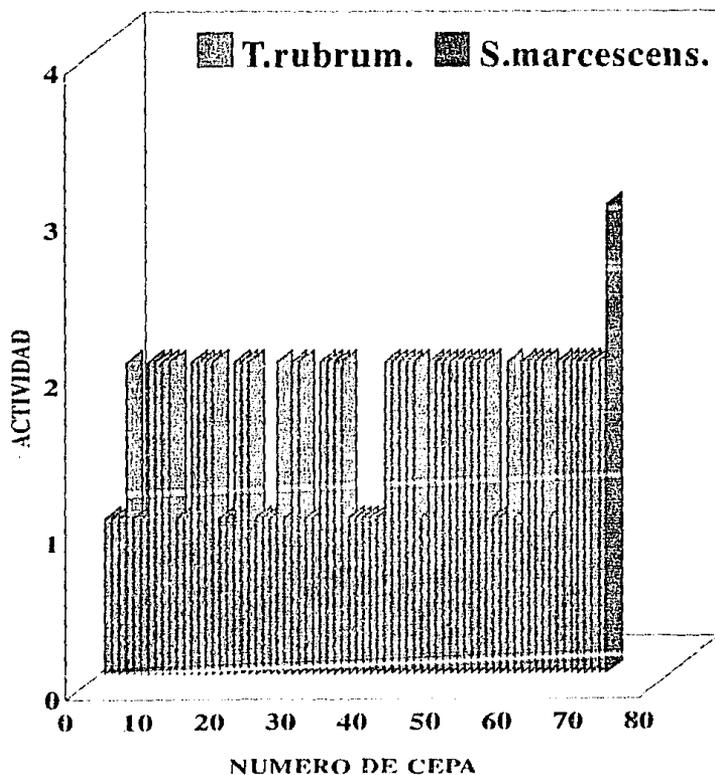


Figura 27. Actividad de fosfolipasas en las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*.
Control Positivo: *S. marcescens*.

1. Halo de hidrólisis de 0-2.5mm
2. Halo de hidrólisis de 2.6-5mm.
3. Halo de hidrólisis de 5.1-7.5mm.
4. Halo de hidrólisis de 7.6-10mm.
5. Halo de hidrólisis de 10.1-20mm.

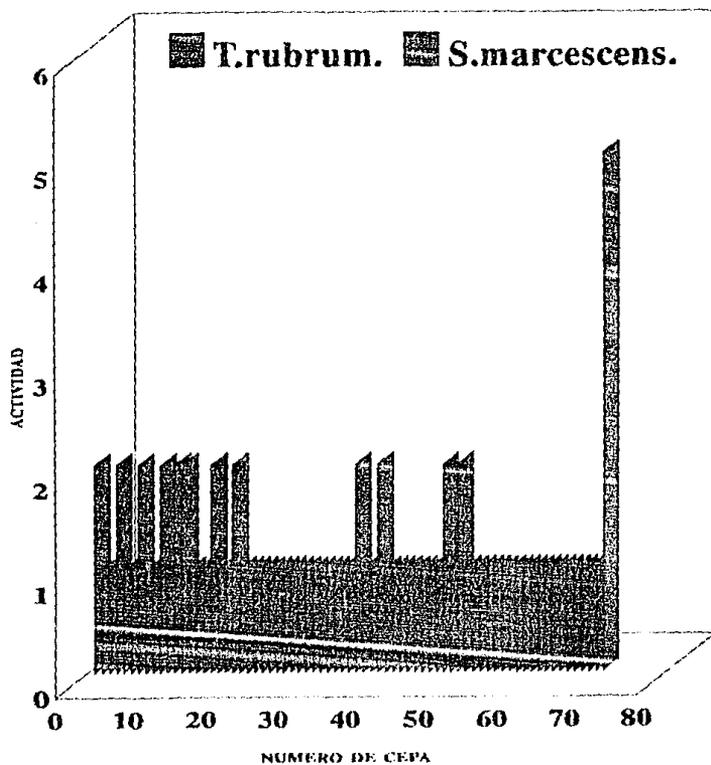


Figura 28. Actividad de proteasas en las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*. Control Positivo: *S. marcescens*.

1. Halo de hidrólisis de 0-2.5mm
2. Halo de hidrólisis de 2.6-5mm.
3. Halo de hidrólisis de 5.1-7.5mm.
4. Halo de hidrólisis de 7.6-10mm.
5. Halo de hidrólisis de 10.1-20mm.

se observó que el 15.71% de las cepas presentaron actividad mayor a las 100 unidades de queratinasa, mientras que en el resto de las cepas (84.28%) la actividad fue menor a las 100 unidades. (fig.29). En relación con las áreas afectadas, los resultados de actividad enzimática fueron similares a los anteriores, ya que las actividades mayoritarias fueron las de elastasas, seguida de esterases, DNasas, fosfolipasas y proteasas, tanto en las cepas aisladas de las uñas de los pies, pies y otras regiones del cuerpo. (tabla IV-VI).

6.4. PRODUCCION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA(S) QUERATINASA(S) DE *T. rubrum* A PARTIR DE EXTRACTO CRUDO.

6.4.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA A pH 7 y 9, PRODUCIDA CON DIFERENTES INDUCTORES.

Para determinar que sustrato inductor presentaba mayor producción de enzima se probaron: crin, pelo de gato, pelo de niño, lana, harina de plumas de dos marcas diferentes (Farina y Agromarina), incubando durante 28 días y midiendo la actividad cada 4 días de la siguiente manera: se tomaron de 7-8 ml de cultivo y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min, y 2 ml del sobrenadante se mezclaron con 2 ml del regulador de fosfatos 0.2 M pH 7 o del regulador de glicina-NaOH 0.2 M pH 9 y 40 mg de lana teñida como sustrato, y se incubaron a 37°C durante 2 h en condiciones estáticas. La actividad queratinolítica se determinó por la valoración del colorante liberado a 620 nm. Se eliminaron los sustratos de harina de pluma debido a que dieron resultados falsos positivos. En los cuatro sustratos restantes, se determinó la actividad enzimática a pH 7 y 9 observándose la mayor actividad a pH 7 cuando se produjo la enzima en cultivos incubados durante 28 días utilizando crin (15 U.Q.) y lana (13 U.Q.) como inductores (fig.30), mientras que a un pH 9 el sustrato que indujo mayor actividad fue la lana (52. U.Q.), seguido de la crin (22.5 U.Q.), (fig.31). Cabe mencionar que en los cultivos incubados desde 4 a 28 días siempre se obtuvo mayor actividad de la enzima a un pH 9 que a un pH 7 (fig.32).

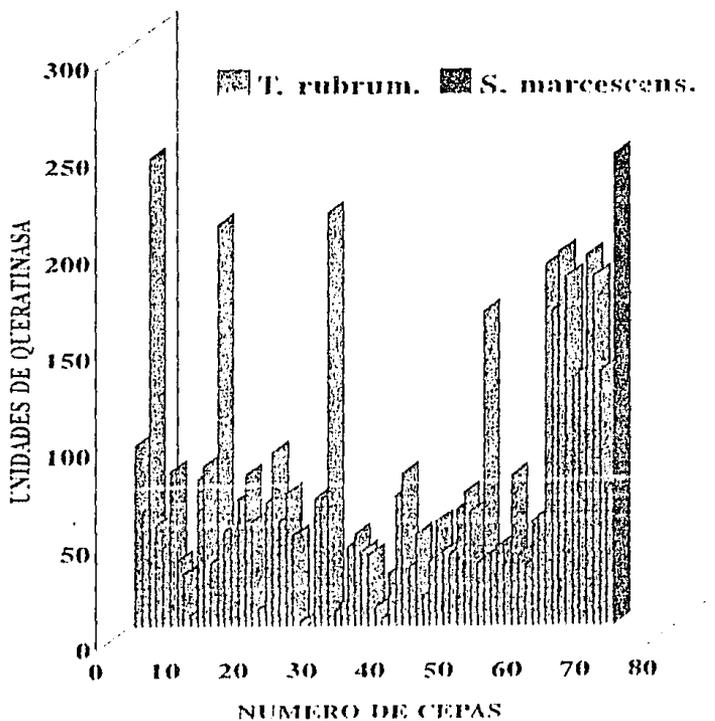


Figura 29. Actividad de queratinasas en las 70 cepas aisladas de *T. rubrum*.
Control Positivo: *S. marcescens*.

La actividad enzimática se determinó por la valoración del colorante liberado a una longitud de onda de 585nm. (Una unidad de queratinasa equivale a un cambio en la absorbancia de 0.01).

Tabla IV. Perfil hidrolítico extracelular de las cepas aisladas de las uñas de los pies.

VALOR DIAMETRO DE HIDROLISIS (mm)	ENZIMAS									
	ELASTASAS		ESTERASAS		DNasa		FOSFOLIPASAS		PROTEASAS	
	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%
0 - 2.5	11	33.3	-	-	7	21.2	6	18.1	27	81.8
2.6 - 5.0	-	-	4	12.1	12	36.3	27	81.8	6	18.1
5.1 - 7.5	5	15.1	15	45.4	14	42.4	-	-	-	-
7.6 - 10.0	-	-	14	42.4	-	-	-	-	-	-
10.1 - 20.0	17	51.5	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	33	100	33	100	33	100	33	100	33	100

Tabla V. Perfil hidrolítico extracelular de las cepas aisladas de los pies.

VALDR	ENZIMAS									
	ELASTASAS		ESTERASAS		DNasa		FOSFOLIPASAS		PROTEASAS	
	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%
0 - 2.5	6	28.5	-	-	5	23.8	17	80.9	18	85.7
2.6 - 5.0	-	-	11	52.3	6	28.5	4	19	3	14.8
5.1 - 7.5	4	19	10	47.6	10	47.6	-	-	-	-
7.6 - 10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.1 - 20.0	11	52.3	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	21	100	21	100	21	100	21	100	21	100

Tabla VI. Perfil hidrolítico extracelular de las cepas aisladas de otras áreas afectadas.*

VALOR -DIAMETRO DE HIDROLISIS (mm)	ENZIMAS									
	ELASTASAS		ESTERASAS		DNasa		FOSFOLIPASAS		PROTEASAS	
	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%	CASOS	%
0 - 2.5	4	25	-	-	-	-	2	12.5	13	81.2
2.6 - 5.0	-	-	4	25	6	37.5	14	87.5	3	18.7
5.1 - 7.5	1	6.2	11	68.7	10	62.5	-	-	-	-
7.6 - 10.0	-	-	1	6.2	-	-	-	-	-	-
10.1 - 20.0	11	68.7	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	16	100	16	100	16	100	16	100	16	100

* Ingle, cuerpo, mano, cara y barba.

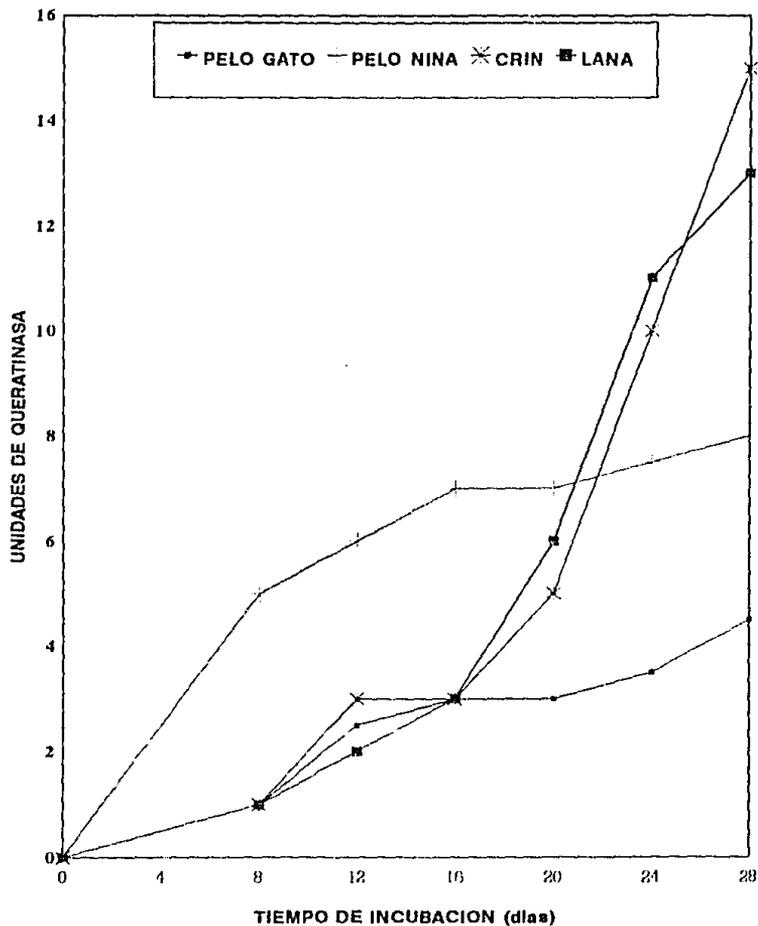


Figura 30. Comparación de diferentes inductores para la síntesis de queratinasas. La actividad queratínolítica se determinó por la valoración del colorante liberado a una longitud de onda de 620 nm, en una mezcla de reacción con conteniendo 40 mg de lana teñida como sustrato, 2 ml del sobrenadante del cultivo, 2 ml del regulador de fosfatos 0.2 M pH 7 incubando durante 2 h a 37°C en condiciones es táticas.

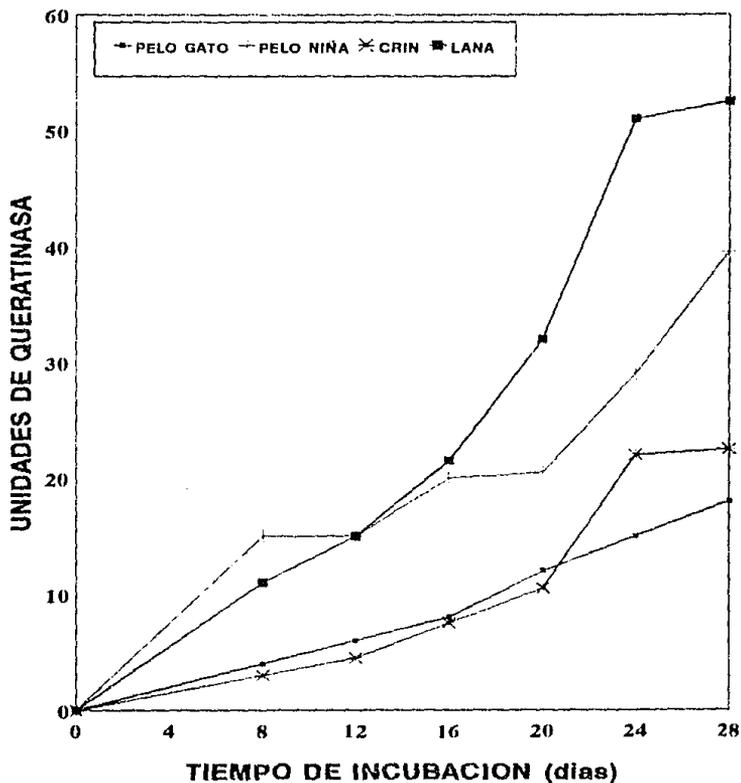


Figura 31. Comparación de diferentes inductores para la síntesis de queratinasas. La actividad quera tinolítica se determinó por la valoración del colorante liberado a una longitud de onda de 620 nm, en una mezcla de reacción conteniendo 40 mg de lana teñida como sustrato, 2 ml del sobrenadante del cultivo, 2 ml del regulador de glicina-NAOH 0.2 M pH 9, incubando durante 2 h a 37°C en condiciones estáticas.

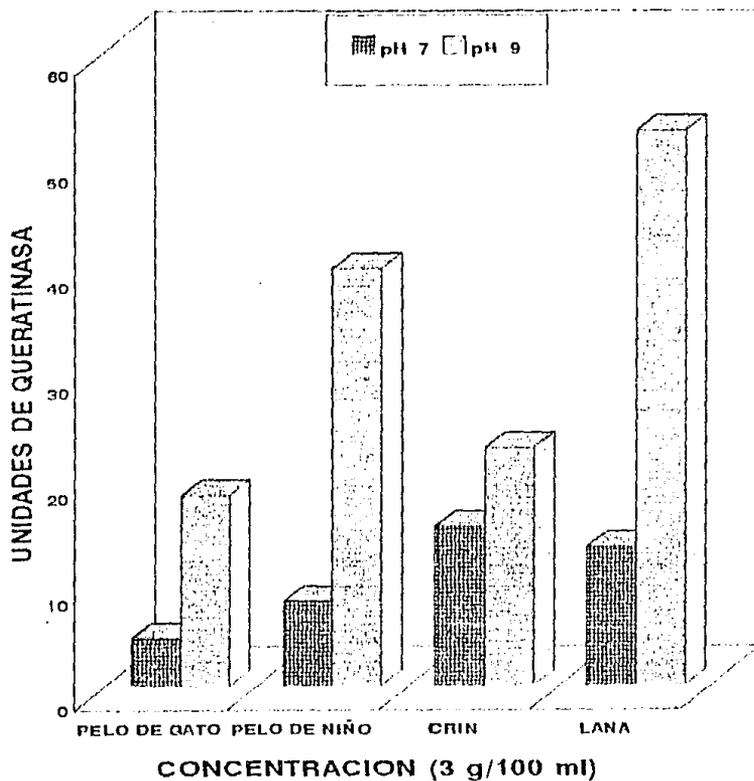


Figura 32. Determinación de la actividad queratolítica a pH 7 y 9. Se compara la producción de la enzima por diferentes inductores en cultivos incubados durante 28 días.

6.4.2. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA PRODUCCION DE QUERATINASAS.

Se determinó la actividad queratinolítica en cultivos de 1,2,3,4, y 5 semanas, observándose que la actividad enzimática aumenta con la edad del cultivo, obteniendo un máximo a los 28 días de incubación. Además el crecimiento y la actividad queratinolítica fueron paralelas a la edad del cultivo (fig.33).

6.4.3. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LANA (SUSTRATO INDUCTOR) SOBRE LA PRODUCCION DE LA QUERATINASA.

En la fig.34 se puede apreciar que la mayor producción de la enzima se obtiene a concentraciones de 3-5 % de lana, ya que a mayores concentraciones (6-7 %) disminuye su producción aunque el crecimiento se mantiene.

6.4.4. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA DEL EXTRACTO CRUDO SOBRE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA

Se probaron diferentes concentraciones de proteína (1 a 3 mg/ml) del extracto crudo y se determinó la actividad queratinolítica como se indicó en Material y Métodos (5.4). En la fig.35 se puede observar que a una mayor concentración de proteína aumenta la actividad .

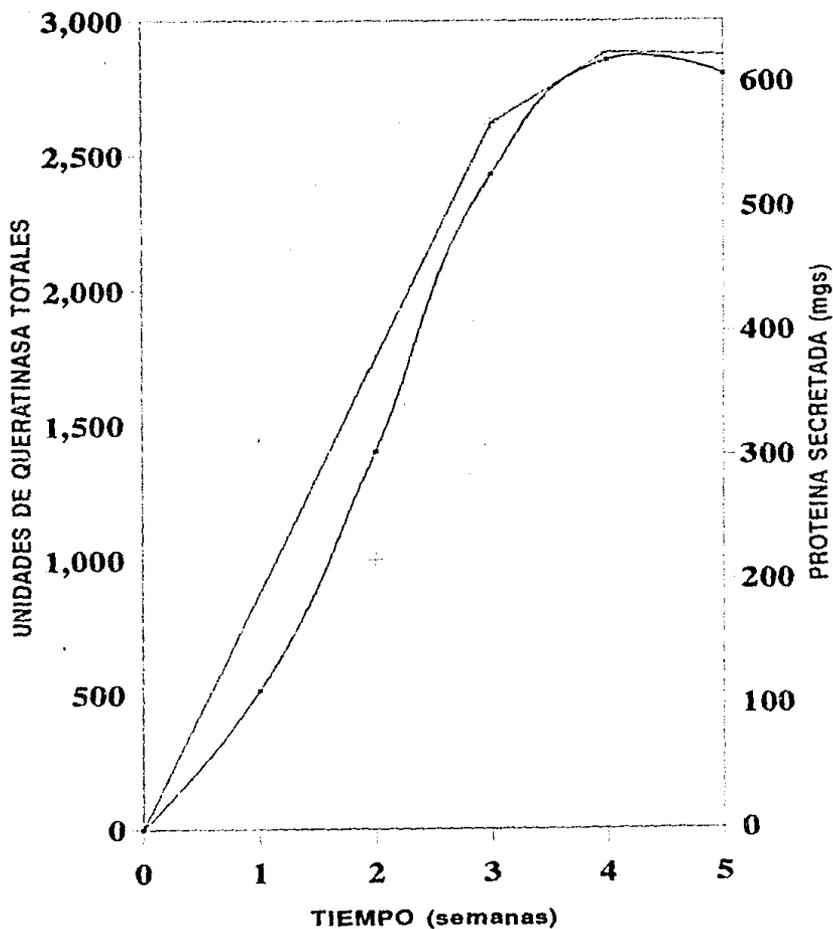


Figura 33. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de la queratinasa. Matraces que contenían el medio base adicionado de lana al 3% fueron inoculados e incubados durante 5 semanas en condiciones estáticas a 28°C, midiendo la actividad queratinolítica cada semana, como se describió en Material y Métodos (5.4).

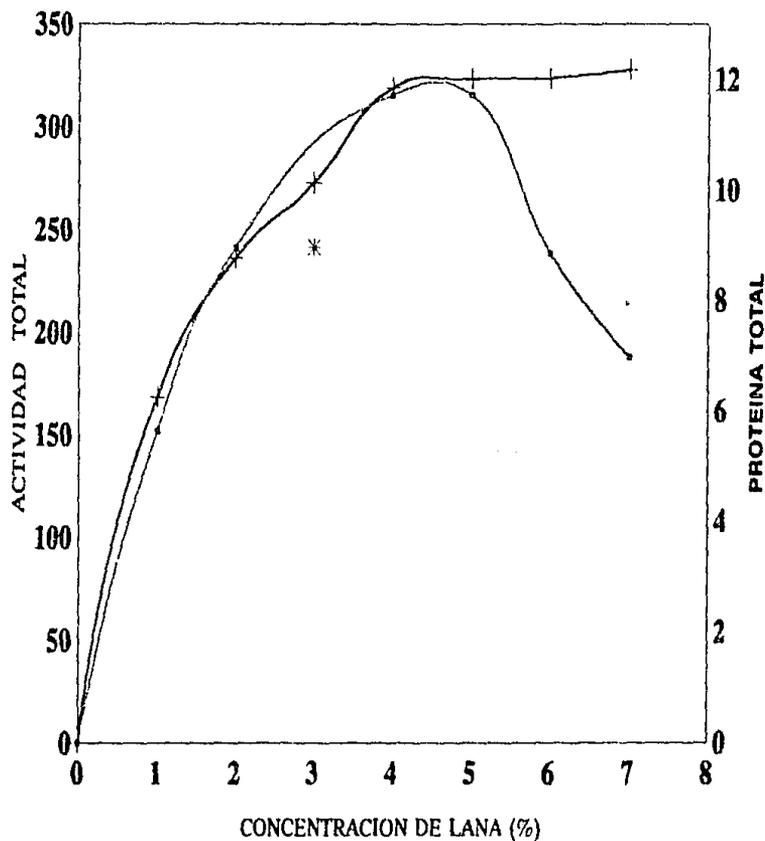


Figura 34. Efecto de diferentes concentraciones de lana sobre la producción de la queratinasa. Se probaron diferentes concentraciones del sustrato inductor (1-7%) incubando 4 semanas a 28°C y determinando la actividad queratinolítica como se describió el Material y Métodos.

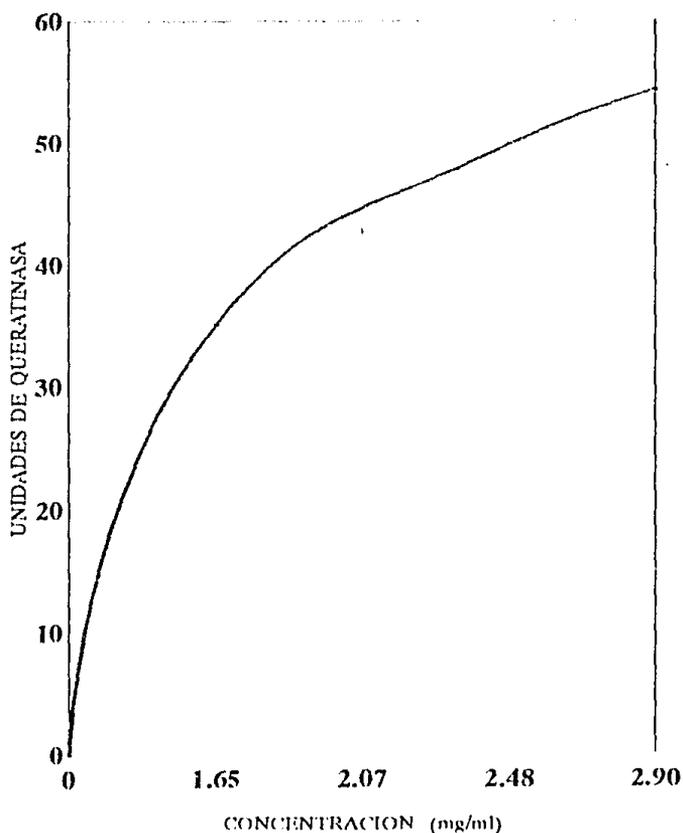


Figura 35. Efecto de la concentración de proteína del extracto crudo sobre la actividad queratinolítica. Se probaron diferentes concentraciones de proteína (1-3 mg/ml) midiendo la actividad queratinolítica como se describió en Material y Métodos (5.4).

6.4.5. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LANA TEÑIDA SOBRE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA DEL EXTRACTO CRUDO.

Para medir la actividad queratinolítica se probaron 4 concentraciones de lana teñida 25, 50, 75 y 100 mg, y se encontró que la reacción fue lineal hasta una concentración de 75 mg de lana (fig.36).

6.4.6. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA EN EL EXTRACTO CRUDO.

A diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48 y 72 h), se tomaron concentraciones de proteína de 2.9 mg/ml y se midió la actividad enzimática como se describió en Material y Métodos (5.4). Los resultados obtenidos se observan en la fig. 37 donde se puede apreciar que la reacción fue lineal hasta aproximadamente las 20 h y después empieza a decaer.

6.4.7. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA DEL EXTRACTO CRUDO.

Para esta determinación se utilizaron los reguladores de fosfatos 0.2 M (pH 6, 7 y 8) y de glicina-NaOH 0.2 M (pH 9 y 10). Los resultados de actividad obtenidos mostraron (fig.38) que el pH afecta notablemente la actividad de la enzima, obteniéndose la máxima actividad a un valor de pH de 9.

6.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA DE *T. rubrum*.

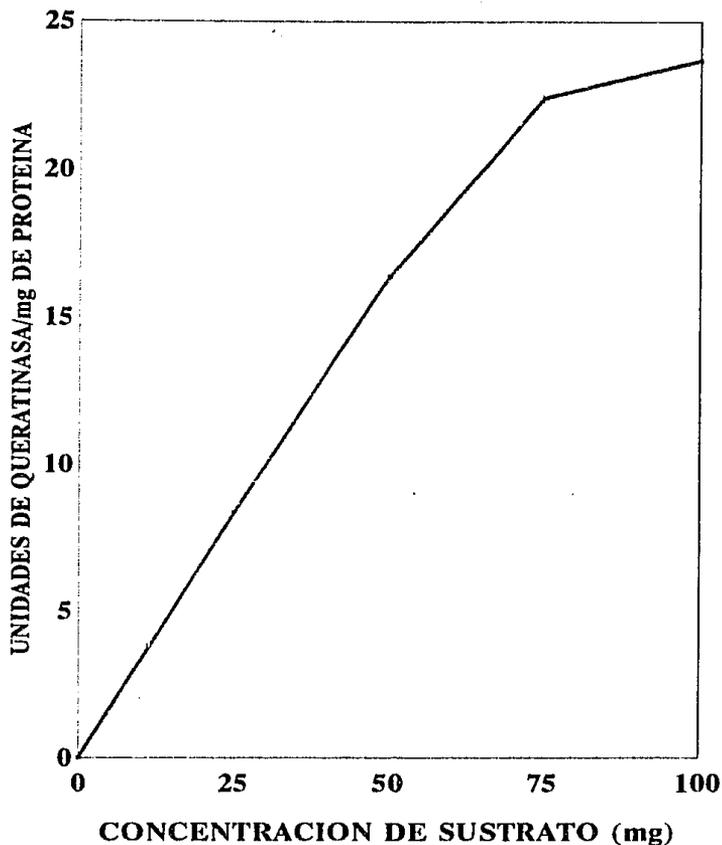


Figura 36. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad queratinolítica en el extracto crudo. A 4 tubos Eppendorf conteniendo diferentes concentraciones de lana teñida (25, 50, 75 y 100 mg) se les añadieron 2.9 mg/ml de proteína y 0.2 ml del regulador plicina-NaOH 0.2 M pH 9 y se incubaron a 37°C durante 2 h en agitación constante, determinando la actividad enzimática por la valoración del colorante liberado a 595nm.

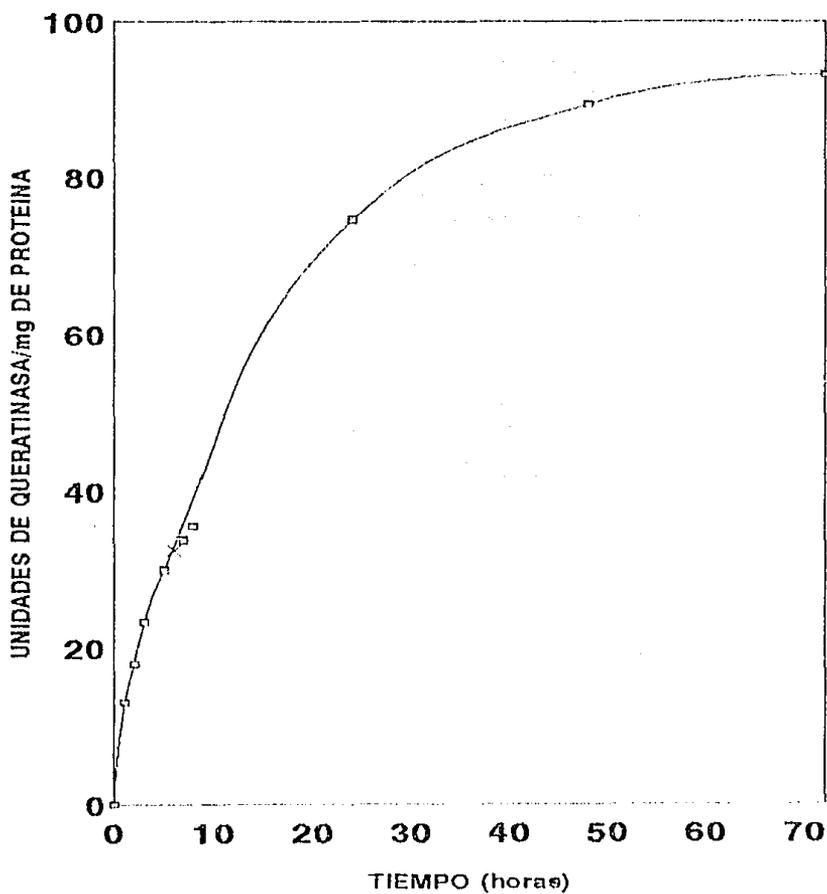


Figura 37. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad queratinolítica en el extracto crudo: a diferentes intervalos de tiempo (1-8 y 24, 48 y 72 h) se determinó la actividad que queratinolítica como se describió en Material y Métodos (5.4).

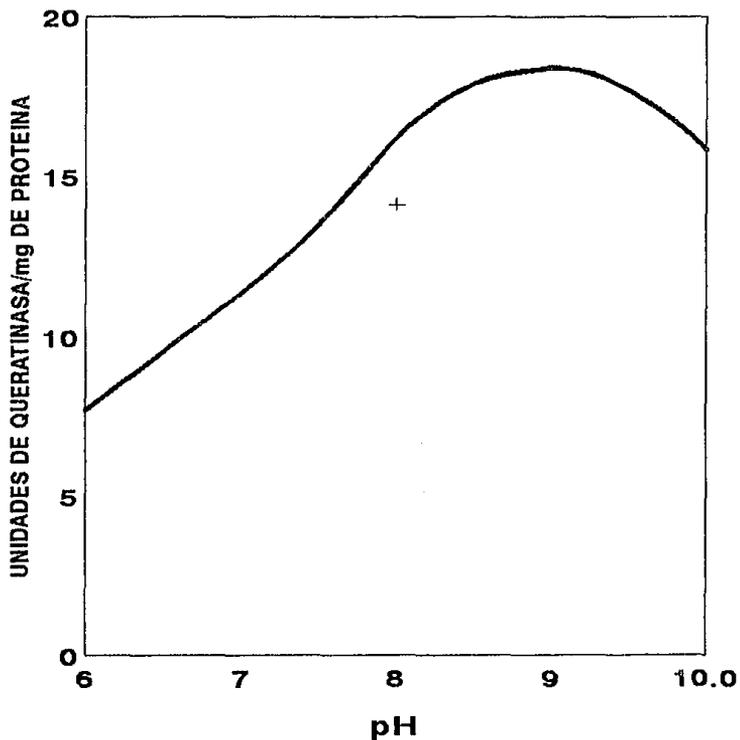


Figura 38. Efecto del pH sobre la actividad queratinolítica del extracto crudo. Se determinó la actividad como se describió en Material y Métodos empleando los reguladores de fosfatos 0.2 M (pH 6 y 8) y de glicina-NaOH 0.2 M (pH 9 y 10).

6.5.1. PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA A PARTIR DE UN SOBRENADANTE DE CULTIVO.

Con el procedimiento descrito en material y metodos (5.5) se tuvo una purificación de 15 veces con un rendimiento del 10% (tabla VII) Las fracciones de mayor actividad queratinolítica obtenidas en la cromatografía de Biogel P-100 (fig.39) se mezclaron para realizar la caracterización parcial de la queratinasa.

6.5.2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA PARCIALMENTE PURIFICADA SOBRE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA.

Se probaron diferentes concentraciones de proteína (20,40, 60, 80, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$) y se determinó la actividad como se indicó en Material y Métodos (5.4). Los resultados (fig.40) muestran que la actividad fue directamente proporcional a la concentración de la enzima, aunque se observan tres pendientes.

6.5.3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LANA TEÑIDA SOBRE LA ACTIVIDAD QUERATINOLITICA.

Se tomaron diferentes concentraciones de lana teñida (20,40,50,60,80 y 100 mg) y se determinó la actividad queratinolítica (ver apartado 5.4) con 60 μg de proteína por ensayo. Los resultados de actividad obtenidos se muestran en la fig.41 donde se observa la mayor actividad a una concentración de 50 mg de lana y a mayores concentraciones empezó a decaer.

Tabla VII.- Purificación de la actividad Queratinolítica de sobrenadante de cultivo de *Trichophyton rubrum*

Etapa de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total (UQ)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadante del cultivo	1213	17.9	21712.7	1	100
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ al 90 %	1291.6	12.17	13711.4	0.67	72.3
Dializado	397.2	43.17	17147	2.4	78.9
Concentración con Aquacide IIA	94.5	63.6	6015.9	3.5	27.7
Biogel P-100	8.0	257	2060	14.38	9.5

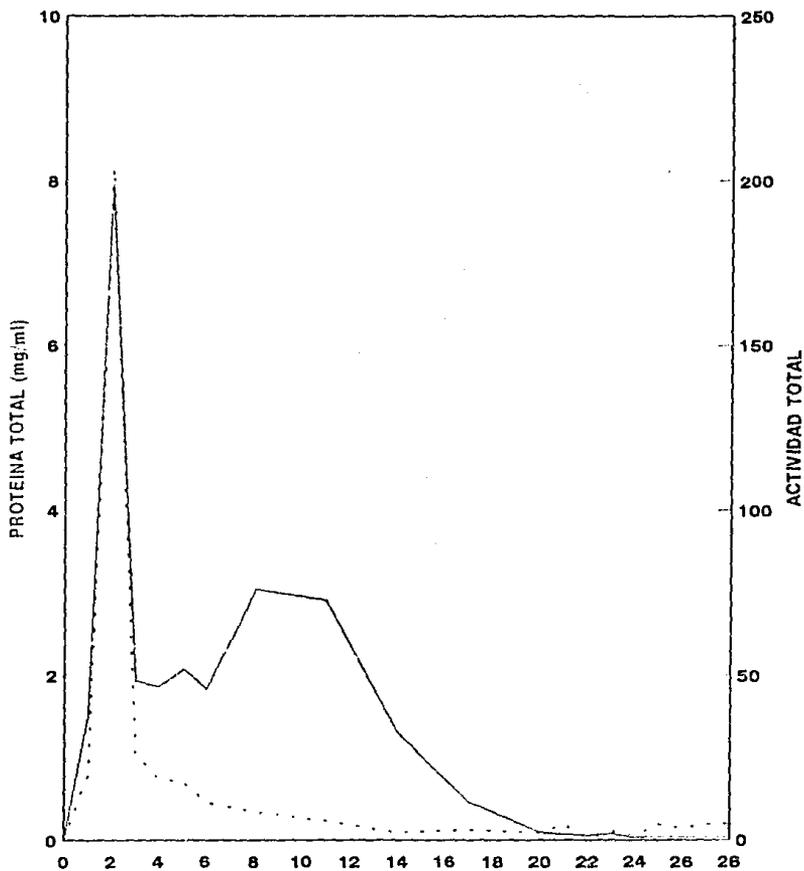


Figura 39. Cromatografía en Biogel P-100 del concentrado con aquacide II A del sobrenadante del cultivo de *T. rubrum*. Se colectaron fracciones de 2 ml c/u y se determinó proteína y actividad enzimática como se describe en Material y Métodos.

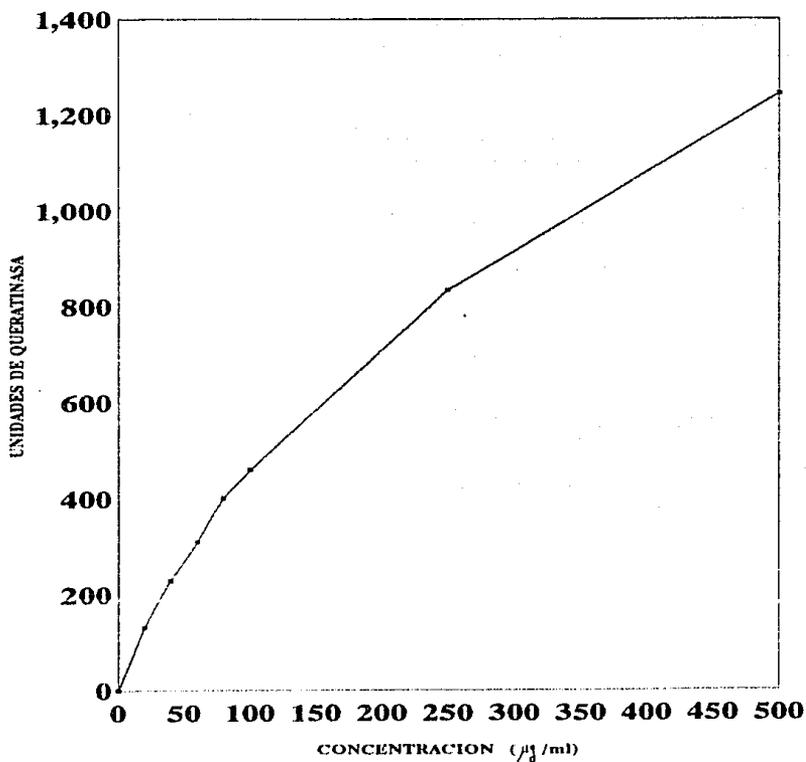


Figura 40. Efecto de la concentración de proteína parcialmente purificada sobre la actividad queratinolítica. Se mezclaron diferentes concentraciones de proteína (20, 40, 60, 80, 100, 250 y 500 µg/ml) con 50 mg de lana teñida y 0.2 ml de regulador de glicina- HCl 0.2 M pH 9 y se incubaron a 37°C durante 2 h en agitación constante, determinando la actividad enzimática por la valoración del colorante liberado a 535 nm.

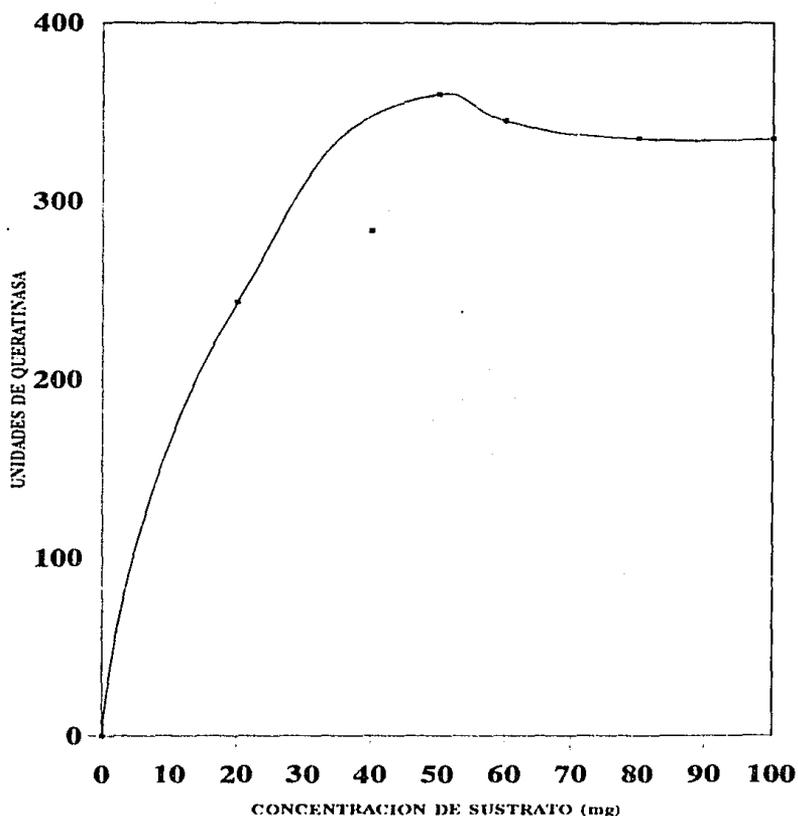


Figura 41. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad queratinolítica en la enzima parcialmente purificada. A tubos Eppendorf conteniendo diferentes concentraciones de lana teñida (20, 40, 50, 60, 80 y 100 mg) se les añadieron 60 μ g/l de proteína y 0.2 ml de regulador glicina- NaOH 0.2 l. pH 9 y se incubaron a 37°C durante 2 h en agitación constante, determinando la actividad enzimática por la valoración del colorante liberado a 595 nm.

6.5.4. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA.

La mezcla de reacción (40 mg de lana teñida y 60 µg de proteína por ensayo) se incubó en agitación a 37°C a distintos intervalos de tiempo (1, 2, 4, 8, 12 y 24 h), determinando así la actividad queratinolítica, en la fig.42 se puede apreciar que la actividad es directamente proporcional al tiempo de incubación.

6.5.5. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA.

Para esta determinación se utilizaron los reguladores PIPES 0.2 M (pH 6 y 7), Tris-HCl 0.2 M (pH 7, 8, 8.5 y 9) y glicinaNaOH 0.2 M (pH 9, 9.5 y 10). Los resultados de actividades obtenidos mostraron (fig.43) que la actividad de la enzima tiene un intervalo máximo a pH de 8-9.5.

6.5.6. DEGRADACION DE DIFERENTES SUSTRATOS POR LA QUERATINASA PARCIALMENTE PURIFICADA.

Se determinó la degradación de diferentes sustratos por la enzima parcialmente purificada, midiendo la actividad enzimática como se describió en Material y Métodos. Encontrando que los sustratos probados son degradados por la enzima aunque en menor proporción que el sustrato específico en los 2 tiempos ensayados (fig.44).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

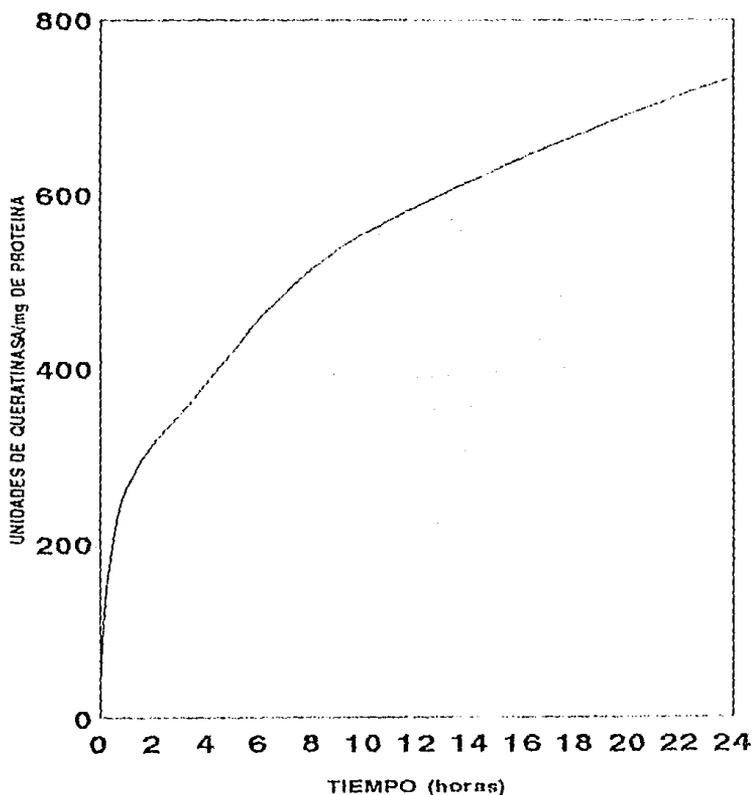


Figura 42. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada. A diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 8, 12 y 24 h) se determinó la actividad queratinolítica como se describió en Material y Métodos (5.4).

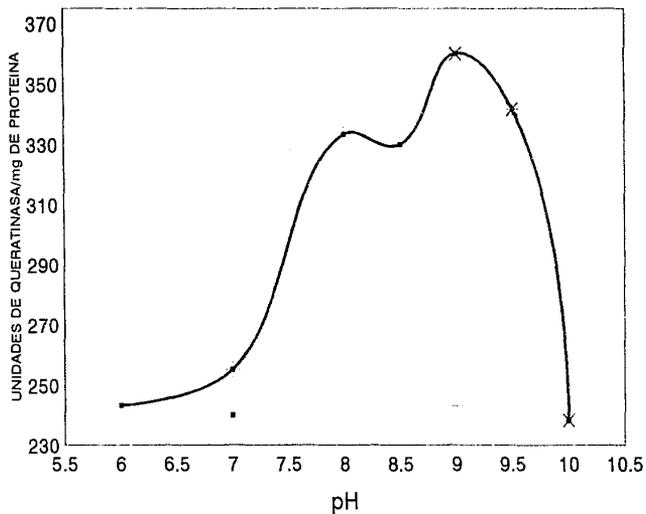


Figura 43. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima parcialmente purificada. Se determinó la actividad queratinolítica como se describió en Material y Métodos, empleando los reguladores de PIPES 0.2 M (pH 6 y 7), TRIS-HCl 0.2 M (pH 7, 8, 8.5 y 9) y glicina-NaOH 0.2 M (pH 9, 9.5 y 10).

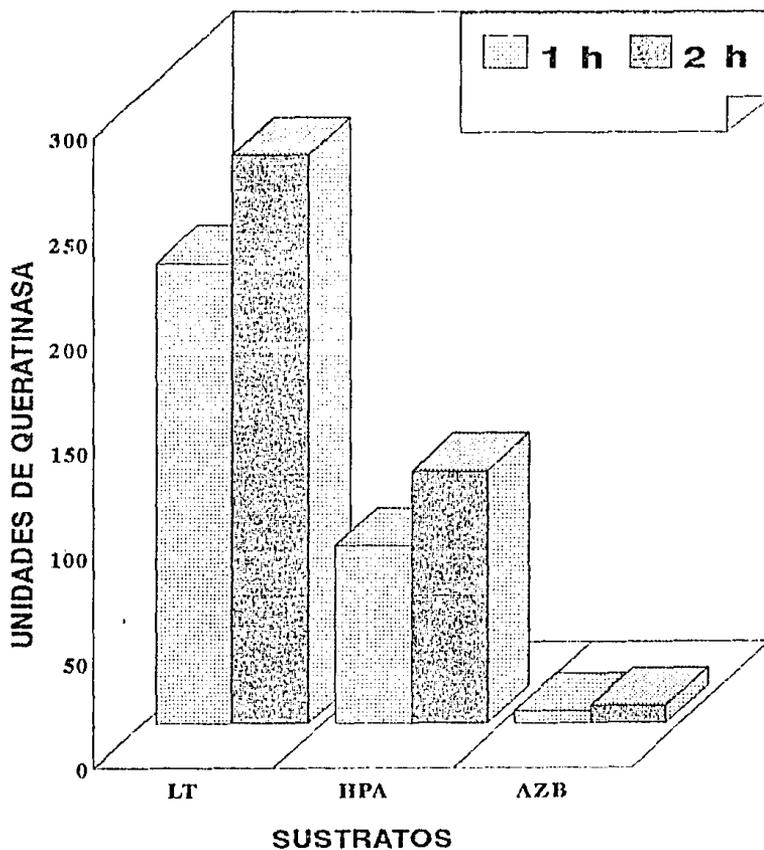


Figura 44. Degradación de diferentes sustratos por la queratinasa parcialmente purificada de *T. rubrum*. LT: Lana teñida, HPA: Hide Powder Azure, AZB: Azoalbúmina.

6.5.7. EFECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA.

De los inhibidores utilizados (PMSF, leupeptina, aprotinana, E-64, PHMB y EDTA), EL PMSF fue el que inhibió en mayor proporción (55.3%) la actividad de la queratinasa, mientras que los otros inhibidores lo hicieron en un intervalo de 4.6-16.9%, (tabla VIII).

6.5.8. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR Y ACTIVIDAD PROTEOLITICA CON ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Alícuotas de las diferentes etapas de purificación de la queratinasa de *T. rubrum* se sometieron a electroforesis como se indicó en Material y Métodos (5.6.3). En la fig. 45 se muestran los resultados obtenidos, en donde se observa la presencia de varias bandas de proteína en un intervalo de 25 a 45 KDa. Los pesos moleculares de las proteínas se muestran en la tabla IX. Por otro lado, la única banda que mostró actividad proteolítica en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizado con gelatina fue la de 25 ± 2 KDa (fig. 46).

Tabla VIII.- Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad queratinolítica.

INHIBIDOR	CONCENTRACION	% DE ACTIVIDAD
NINGUNO	-	100
PMSF	10mM	44.7
LEUPEPTINA	20 μ g	83.1
APROTIMINA	30 μ g	93
E-64	10 μ M	92.4
EDTA	100 μ M	95.4
PHMB	1mM	91.8

Tabla IX. Proteínas detectadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la queratinasa parcialmente purificada de *T. rubrum*.

BANDA No.	RF (cm)	PESO MOLECULAR (Kd)
1	0.56	45
2	0.62	41
3	0.67	32
4	0.7	29
5	0.73	27
6	0.79	25

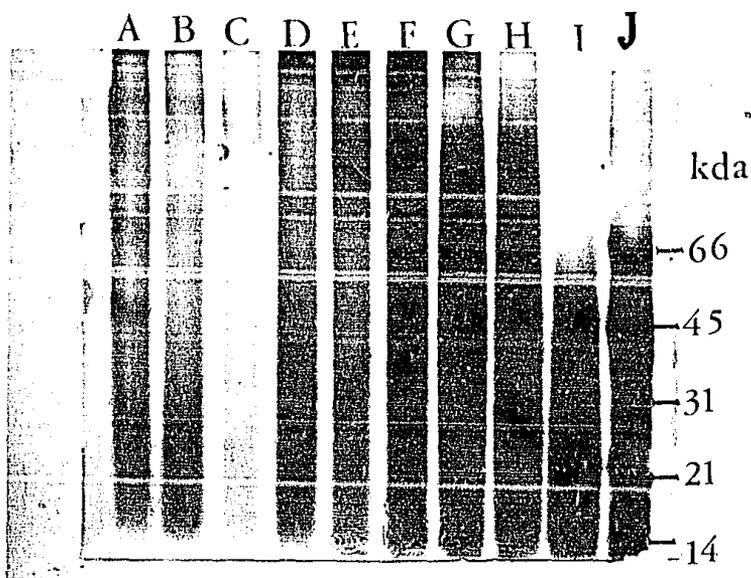


Figura 45. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las diferentes preparaciones de queratinasa de *T. rubrum*. (A). Sobrenadante del cultivo, (B). Dializado después de precipitar con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (C). Fracción proteica sin afinidad por carboximetilcelulosa, (D). Concentrado con aquacide 11A, (E,F, G, H, I) Fracciones 1, 2, 4, 6 y 11 respectivamente, del gradiente de Biogel P-100, y (J). Proteínas marcadoras de peso molecular conocido: Albúmina de suero bovino, 66.2 kd; Ovoalbúmina, 45 kd; Anhidrasa carbónica, 31 kd; Inhibidor de tripsina aislado de soya, 21.5 kd; Lisozima, 14.4 kd.

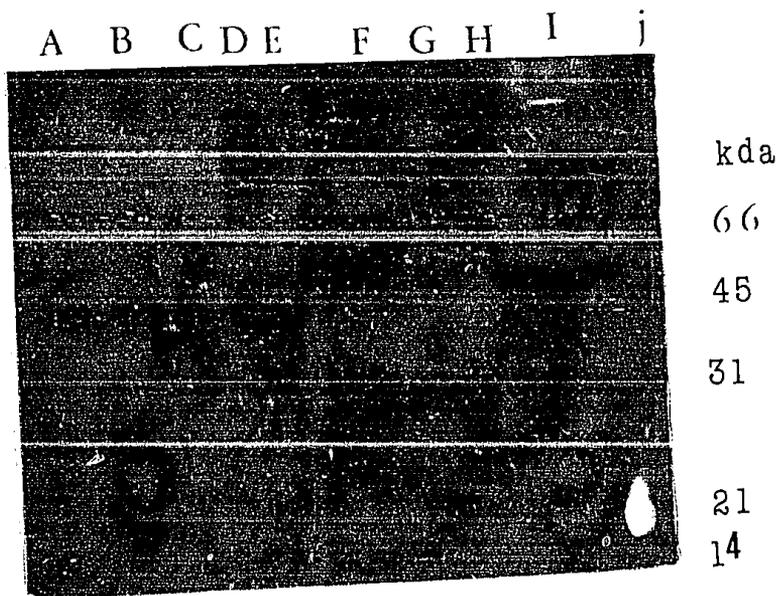


Figura 46. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS copolimerizado con gelatina de las diferentes preparaciones de queratinasa de T. rubrum. (A). Sobrenadante del cultivo, (B). Fracción proteica sin afinidad por carboximetil celulosa, (C). Concentrado con aquacide IIA, (D, E, F, G, H, I), Fracciones 1, 2, 4, 6 y 11 respectivamente, del gradiente de Biogel P-100, (I). Protinas de peso molecular conocido, (J). Tripsina.

7. DISCUSION

T. rubrum es un hongo antropofílico y en la actualidad se ha convertido en el dermatofito del hombre más común y más ampliamente distribuido, rara vez se aísla de animales y nunca del suelo¹⁸ y su morfología es muy variable¹⁴⁹. La frecuencia de aislamiento varía del 40% al 80% en las diferentes poblaciones estudiadas^{75,83}. De las 70 cepas aisladas en este trabajo, se aisló una mayor proporción a partir de uñas de los pies (47.1%) y de pies (30%), lo que concuerda con los datos reportados^{8,15,118,137}, pues las infecciones en otras partes del cuerpo son menos frecuentes, sobre todo en cuero cabelludo y rara vez invaden pelo¹¹⁸.

Por otro lado, el análisis de las características morfológicas y fisiológicas (macro y microscópicas) como aspecto de la colonia, forma de conidios, producción de órganos de perforación al pelo *in vitro*, ureasa y producción de pigmento en medios especiales, concuerdan con la mayoría de los reportes de la literatura^{8,15,49,63,118,137}. En cuanto a la termotolerancia de las cepas aisladas, no se encontraron datos en la literatura, y lo encontrado en este trabajo (7.14%) indica que esta característica es poco frecuente.

En este estudio, se determinó la producción de 8 enzimas extracelulares por las 70 cepas aisladas, de las cuales 7 se analizaron mediante métodos cualitativos en placa y la queratinasa por métodos cuantitativos, de las cuales 5 fueron positivas (proteasa, esterasa, fosfolipasa, elastasa y DNasa) y 2 negativas (hemolisina y quitinasa). En un estudio similar, Manzano⁸³, estudio la actividad de 5 de ellas, encontrando datos similares para elastasa, DNasa, proteasa y hemolisina.

mientras que para las demás enzimas, (a excepción de la quitinasa, la cual esta ausente en el hongo, confirmando la ausencia de actividad quitinolítica del mismo, Ruiz Herrera comunicación personal), se han reportado actividades cuali y cuantitativamente en el mismo hongo, dermatofitos y otros hongos entre los que se encuentran lipasas y queratinasas de *T. rubrum*¹¹, fosfolipasa de *C. albicans*^{100,109}, lipasa de *M. furfur*¹⁰⁰, DNasa en *Staphylococcus aureus* y *Streptomyces pyogenes*¹²⁵, peptidasa y fosfatasa alcalina de *M. canis*¹⁰¹, la lipasa de *F. floccosum*⁵⁶ y la quitinasa, proteasa, hemolisina, DNasa y lipasa de *C. onidiobolus coronatus*⁹¹

Aunque se ha reportado que la expresión proteolítica de *T. rubrum* es variable, que no muestra relación con la severidad de la inflamación y que no tiene un papel significativo en la patogenia de las lesiones⁹¹, otros autores indican que si están relacionadas con la infección, por ejemplo, la elastasa, la cual fue la que se obtuvo en mayor proporción en este trabajo, está relacionada con las infecciones crónicas, que son la más características que induce el *T. rubrum*, y Rippon¹¹⁶ reporta que la elastasa es un factor que ayuda a los dermatofitos a producir una reacción inflamatoria importante en el tejido del huésped, mientras que Kothary y cols⁶⁵ han sugerido que la elastasa y la DNasa son importantes en la virulencia del hongo.

Por otra parte, Hellgren y Vincent⁵⁶ no reportan actividad lipolítica en *T. rubrum* y sugieren que debido a esto, se dificulta su penetración en la piel de mamíferos, la cual está cubierta por capas gruesas de lípidos y que se explica por que el hongo se localiza principalmente en las palmas de las manos, uñas y plantas de los pies. De las demás enzimas, no hay reportes que indiquen su relación con la patogenicidad del hongo, aunque se cree que participan de una u otra forma en la misma^{31,83,116}. Además, el estudio de las enzimas fúngicas ha permitido la identificación y la ubicación taxonómica de algunos hongos¹⁵.

Por otro lado, en la literatura se ha estudiado la producción de queratinasas por diversos hongos con diferentes nutrientes¹⁷ y sustratos como la actividad queratinolítica de *T. schoenleinii*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* utilizando lana lavada y esterilizada con óxido de etileno^{26,145}, la descomposición de queratina nativa de lana por *Streptomyces fradiae*⁹⁸, la producción de actividad queratinolítica de diferentes dermatofitos (*T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *K. ajelloi*, *T. gallinae*) empleando como sustrato queratina nativa, pelo de cobayo y plumas de pollo¹⁴⁴, la síntesis y degradación de queratinasas extracelulares en *Chrysosporium queenslandicum*, *Graphium peccilloides* y *Scopulariopsis brevicaulis*, siendo el sustrato queratina insoluble⁸¹, la queratinolisis por *Absidia cylindrospora* y *Rhizomucor pusillus* con los sustratos pelo humano, lana de carnero, uña de perro, cuerno de toro, piel de serpiente y plumas de gallina¹¹¹, la purificación y caracterización parcial de dos queratinasas extracelulares de *Scopulariopsis brevicaulis* utilizando pelo humano como sustrato⁸⁰, la sulfitolisis en queratinolisis por *K. ajelloi*, también induciendo la enzima con pelo humano¹²⁰, la degradación *in vitro* de pelo humano por *Auxarthron conjugatum*, *Chrysosporium indicum*, *C. pannicola*, *Keratomyces ajelloi* y *Microsporium gypseum*³⁶ y la degradación de la queratina de pelo humano por *Chrysosporium indicum*, *Geotrichum candidum*, *Gymnoascoideus petalosporus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Talaromyces trachyspermus*¹¹¹. Sin embargo, la mayoría de los métodos se basa en la determinación de proteína y/o nutrientes liberados al medio de cultivo, por lo que en este trabajo se implementó una técnica para la determinación de la actividad queratinolítica utilizando lana teñida como sustrato y midiendo dicha actividad evaluando la liberación de color a una λ_{585} nm, que es la longitud de onda a la cual se obtiene la mayor absorbancia del colorante. Cabe mencionar, que la lana fue el sustrato inductor más eficiente para la producción de la enzima que crin, pelo de gato, pelo de niña y harina de plumas de dos marcas diferentes, además, la actividad enzimática aumentó con la edad del cultivo (hasta 28 días de incubación, lo que coincide con un estudio anterior⁸⁰), la concentración óptima de sustrato para la producción de la enzima fue de 3 a 5%.

Esta técnica es sencilla, fácil, económica, reproducible y rápida, en comparación con algunas de las descritas en la literatura, además, la actividad encontrada es específica para queratina lo cual es una ventaja con respecto a algunas actividades queratinolíticas descritas, las cuales se analizan con sustratos inespecíficos, principalmente azocoll, por lo que esta técnica se puede utilizar con alta confiabilidad en la determinación de la actividad queratinolítica de diferentes hongos con resultados altamente satisfactorios.

El estudio de la caracterización de algunas propiedades de la enzima en el sustrato crudo, mostró que la reacción es lineal hasta 75 mg de sustrato, en el tiempo de incubación hasta 20 horas y el pH óptimo fue a un pH de 9, algunas de estas propiedades coinciden con algunos reportes de actividades queratinolíticas en el mismo dermatofito y en otros hongos relacionados, por ejemplo, en medio condicionado de *T. rubrum*^{7,9}, y el sobrenadante de *Auxarthron conjugatum*, *Chysosporium indicum*, *C. pannicola*, *Keratomyces ajelloi* y *M. gypseum*¹⁶.

Por otra parte, en este trabajo se purificó y caracterizó parcialmente una queratinasa a partir de una cepa clínica de *T. rubrum* en base a la metodología descrita por Ashai y cols⁹, modificada en dos aspectos, no se utilizó la columna de Sephadex-G-100 ni la del gradiente de pH, y se concentró con Aquacide IIA y se fraccionó en columnas de Biogel P-100, lo cual nos permitió obtener una purificación de 15 veces y un rendimiento de 10%, la cual tiene un peso molecular de 25 ± 2 Kda tanto en electroforesis en gel de poliacrilamida SDS como en geles copolimerizados con gelatina.

La enzima que se purificó y caracterizó parcialmente a partir de filtrados de *T. rubrum* puede estar relacionada con algunas proteinasas reportadas en otras cepas de *T. rubrum* y

diferentes dermatofitos, debido a que presenta propiedades similares a las reportadas, sobre todo en el pH óptimo el cual es alcalino con un máximo entre 8 y 9. Yu y cols¹⁵¹, purificaron 2 enzimas proteolíticas de movilidad relativa de 38,000 y 48,000 daltones de *T. mentagrophytes*. También se ha reportado una proteinasa de movilidad relativa de 34,300 en *T. granulosum*, y Ashai y cols⁹ reportaron 2 proteinasas de 44,000 y 36,000, las cuales se encuentran como dímeros en ausencia de agentes reductores, y una tercera actividad de 27,000.

La enzima parcialmente purificada posiblemente sea una serín proteinasa, pues es inhibida por agentes que actúan sobre este tipo de enzimas, y puede ser similar a la reportada por Meevotism y Niederpruem⁸⁸ y por Chattaway y cols²⁸ en filtrados del hongo, así como a la de Ashai y cols⁹ en medio condicionado de *T. rubrum*.

Por otra parte, Takiuchi y cols¹³⁴, purificaron una proteinasa de *M. canis* y produjeron anticuerpos contra la misma. Este anticuerpo presenta reacción cruzada con material proteico de *T. rubrum*, *M. gypseum* y *T. mentagrophytes*, lo cual sugiere que se pueden expresar proteinasas estructuralmente similares por algunos o todos los dermatofitos.

La función primaria de la queratinása extracelular purificada en este trabajo probablemente sea degradar queratina de la superficie de piel como una fuente de nutrientes para el hongo. Hay reportes que indican que *T. rubrum* produce lesiones muy profundas y destructivas en la piel⁹², principalmente con cepas de regiones tropicales¹¹⁸, finalmente la presencia de esta enzima, así como de actividad significativa de elastasa, sugiere que *T. rubrum* podría crecer y causar destrucción de tejidos en la capa dérmica rica en elastina.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Se aislaron 70 cepas de *T. rubrum* a partir de muestras clínicas de diferentes localizaciones, siendo mayor de uñas de pies.
- 2.- El análisis de las características macro y microscópicas de las cepas aisladas, sugiere que pueden estar correlacionadas con diferentes fenotipos los que serían sometidos a estudios bioquímicos y de biología molecular para comprobar este hecho.
- 3.- Se encontraron 6 actividades de proteasas exocelulares, de las cuales se observó mayor producción de elastasas y esterases.
- 4.- No se encontró actividad de hemolisina y quitinasa.
- 5.- Se implementó una técnica para la determinación de la actividad queratinolítica con resultados altamente satisfactorios.
- 6.- Se obtuvo mayor producción de la enzima queratinolítica utilizando como inductor lana.
- 7.- Se aisló, purificó y caracterizó parcialmente una queratinasa de peso molecular de 25 ± 2 kd.

8.- La enzima parcialmente purificada presentó un pH óptimo alcalino (8-9) y fue inhibida por PMSF, lo que sugiere que es una serin proteasa alcalina.

9.- Es una enzima termotolerante y degrada además de la lana otros sustratos como azoalbumina y hide powder azure.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Ahmed RA. Immunology of human dermatophyte infections. Arch Dermatol. 1982;118: 521-525.
- 2.- Ajello L, Georg LK. *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. Mycopath Mycol-Appl. 1957;53:3-17.
- 3.- Aguayo Roussel B. Estudios preliminares sobre la producción de quitinasas por *Serratia marcescens*. Tesis Profesional. 1976. ENCB. México, D.F.
- 4.- Altera J, Saryt E. Prevalence of pathogenic fungi in the toe-webs and toe-nails of diabetic patients. Mycopathologia. 1979; 67:157-159.
- 5.- Apodaca G, McKerrow J. H. Purification and characterization of a 27,000-Mr extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Infection and Immunity. 1989;57: 3072-3080.
- 6.- Apodaca G, McKerrow J H. Regulation of *Trichophyton rubrum* Proteolytic Activity. Infection and Immunity. 1989; 57:3081-3090.
- 7.- Apodaca G, McKerrow J H. Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. J Medical Vet Mycol. 1990;28:159-171.
- 8.- Arenas R. Micología Medica Ilustrada. Dermatofitosis. México: Interamericana-McGraw-Hill. 1993:57-76.
- 9.- Asahi M, Lindquist R, Kimie F, et al. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. Biochem J. 1985;232:139-144.
- 10.- Baker SA, Cruickshank, Halden JH. Structure of a galactomannanpeptide allergen from *Trichophyton mentagrophytes*. Biochem Biophys Acta. 1963;74:239-246.
- 11.- Bassets M, Koenig H. Production de pigment rouge du *Trichophyton rubrum*. Bulletin de la Societe de Mycologie Medicale. 1976;V:29-39.
- 12.- Bassets M, Koenig H, Midoun M. Etude de quelques facteurs favorisant la production du pigment rouge du *Trichophyton rubrum*. Bulletin de la Societe de Mycologie Medicale. 1980: X:21-24
- 13.- Blank F, Mann SJ. *Trichophyton rubrum* infections according to age, anatomical distribution and sex. Regional of Dermatology. 1975;92:171-174
- 14.- Beynon RJ, Bond JS. Proteolytic enzymes. A practical approach. Appendix III. Oxford. IRL PRESS. 1989;55:241-249.

- 15.- Bonifaz A. Micología Médica Básica. Dermatofitosis. México: Francisco Méndez Cervantes. 1990:31-90.
- 16.- Brasch J, Qadripur SA. An unusual variant of *Trichophyton rubrum* from Schleswig-Holstein. Mykosen. 1986;29:584-588.
- 17.- Brasch J, Britta-Sigrid Martins, Chirstophers E. Enzyme relase by *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. Mycoses. 1991;34:365-368.
- 18.- Brueske Charles H. Proteolytic Activity of a Clinical Isolate of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology. 1986:63 1-633.
- 19.- Burgoon CF, Bank F, Johnson WC. Mycetoma formation in *T. rubrum* infection. Brit J Derm. 1974;90(2):155-162.
- 20.- Campbell M, Stewart J. The Medical Mycology. Dermatophyte Identification. 111-119.
- 21.- Carmona-Huerta, C. Comparación bioquímica de cepas pigmentadas y apigmentadas de *Serratia marcescens* de origen clínico. Tesis Profesional. 1980. ENCB. Mexico, D.F.
- 22.- Castañeda-Aguillo: Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria. I. *Serratia marcescens*. Synthetic and gelatin media. Journal of General Physiology. 1956;3:369-375.
- 23.- Conti-Diaz IA, Torres LA, Colman R. Granuloma de Majocchi de la barba por *Trichophyton rubrum*. Med Cut ILA. 1974;2(6):433-436.
- 24.- Convib J, Albornoz MB, Viso RF. Abscesos subcutaneous producidos por el *Trichophyton rubrum*. Med Cut. 1970;4(6):501-504.
- 25.- Crespo E V. Epidemiología de las micosis superficiales. Actas Dermo Sif. 1979;70:595-610.
- 26.- Crewther WG, Fraser RDB, Lennox FG, et al. The chemistry of keratins. Adv. Protein Chem. 1975;20:191-346.
- 27.- Cruz-Camarillo R, Albores-Medina A: Obtención con posibles fines comerciales de una proteasa alcalina extracelular de *Serratia marcescens*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 1972;14:211-219.
- 28.- Chattaway FW, Ellis DE, BafLOW AJE. Peptidases of dermatophytes. Journal of Investigative Dermatology. 1963;41:31-37.
- 29.- Chrisope GL, Fox CW, Marshall RT. Lecithin Agar for Detection of Microbial Phospholipases. Applied and Environmental Microbiology. 1976;31:784-786.
- 30.- Das Sk, Banerjee AB. Phospholipids of *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia. 1974;12:281-286.

- 31.- Das SK, Banerjee AB. Lypolytic enzymes of *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia. 1977;15:313-323
- 32.- Das SK, Banerjee AB. Effect of undecanoic acid on the production of exocellular lipolytic and keratinolytic enzymes by undecanoic acid-sensitive and -resistant strains of *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia. 1982;20:179-184.
- 33.- Davies RR, Farideh Zaini. *Trichophyton rubrum* and the chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes. Sabouraudia. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1984;22:65-71.
- 34.- Davies RR, Farideh Zaini. Enzymatic activities of *Trichophyton rubrum* and the chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes. Sabouraudia. J Medical Vet. Mycol. 1984;22:235-241.
- 35.- Day WC, Toncic P, Stratman SL, et al. Isolation and properties of an extracellular protease of *Trichophyton granulorum*. Biochemica et Biophysica Acta, 1968;167:597-606
- 36.- Deshmukh SK, Agrawal SC. *In vitro* degradation of human hair by some keratinophilic fungi. Mykosen. 1982;25(8):454-458.
- 37.- Echeteu CO, Ononogbu IC. Extracellular lipase and proteinase of *Basidobolus haptosporus*. Possible role in subcutaneous mycosis. Mycopathologia. 1982;80:171-177.
- 38.- Eissenberg LG, Goldman W. Histoplasma variation and adaptive strategies for parasitism: New perspectives on Histoplasmosis. Clinical Microbiology Review. 1991;4:411-421.
- 39.- Eleuterio MK, Grappel SF, Caustic CA, et al. Role of keratinases in Dermatophytosis. III. Demonstration of delayed hypersensitivity to keratinases by the capillary tube migration test. Dermatologica. 1973;147:255-260.
- 40.- Emmons ChW, Binford ChH, Pautz J, Kwon-Chung KJ. Medical Mycology. Dermatophytoses Philadelphia. Lea & Febiger, 1977:117-167.
- 41.- Feuerman JE, Alteras I. Some unusual cutaneous manifestations of *Trichophyton rubrum* in Israel. Mykosen. 1980;23:619-626.
- 42.- Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, et al. Dermatology in General Medicine. Mycologic infections. New York: McGraw Hill. 1987:2201-2248
- 43.- Fraser RDB, MacRae TP, Sparrow LG, et al. Disulphide bonding in -keratin. Int J Biol Macromol. 1988;10:106-112.
- 44.- Frey D, Oldfiel R, Bridger R. A colour Atlas of Pathogenic Fungi. *Trichophyton rubrum*. Wolfe Medical Publications Ltd. 56-59
- 45.- Fromentin H. Enzymatic characterization with the API ZYM system of entomophthorales potentially pathogenic to man. Current Microbiology, 1982;7:315-318.
- 46.- Garys M, Douglass M. Mycology for the clinical laboratory. Dermatophytes. USA. Reston Publishing Company. Inc. 1979:113-44.

- 47.- Georg LK. Epidemiology of dermatophytes. Sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Ann Ny Acad Sci.* 1960;89:69-67.
- 48.- González-Ochoa A, Orozco VC. Frequency of occurrence of principal dermatophytoses and their causative agents observed in México city. *Int J Dermatol.* 1974,13:303-309.
- 49.- Goodman DS, Teplitz ED, Wishner A, y col. Prevalence of cutaneous disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related complex. *J AM ACAD DERMATOL.* 1987;17:210-220.
- 50.- Grappel SF, Blank F. Role of keratinases in dermatophytosis. I. Immune responses of guinea pigs infected with *Trichophyton mentagrophytes* and guinea pigs immunized with keratinases. *Dermatologica.* 1972;145:245-255.
- 51.- Grappel SF, Bishop CT, Blank F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. *Bacteriol Rev.* 1974;38:22-250.
- 52.- Habermann E, Hardt KL. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry.* 1972;50:163-173.
- 53.- Haan P, Raay-Helmer V, Boorsma M. Diversity of antigenic extracts from the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Mykosen.* 1987;30(9):427-433.
- 54.- Hay JR. Chronic dermatophyte infections. Clinical and mycological features. *Brit J Dermatol,* 1988;106:1-7.
- 55.- Hellgren L, Vincent J. Lipolytic activity of some dermatophytes. *J Med Microbiol* 1980;13: 155-157.
- 56.- Hellgren L, Vincent J. Lipolytic activity of some dermatophytes. II. Isolation and characterisation of the lipase of *Epidermophyton floccosum*. *J MED MICROBIOL.* 1981;14:347-350.
- 57.- Heussen Ch, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry.* 1980;102:196-202.
- 58.- Higuchi D, Takiuchi I, Negi M. The effect of keratinase on human epidermis, especially on stratum corneum. *Jap J Dermatol* 1981;91:119-125.
- 59.- Hino H, Ammitzboll T, Svejgaard E, et al. Acantholysis induced by proteolytic enzymes. II enzyme fractions produced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Acta Derm Venereol (Stockh).* 1982;62:283-288.
- 60.- Hopsu-Havu, Snock VK, Tunnela CE. Production of elastase by pathogenic and non-pathogenic fungi. *Mykosen.* 1972;15:100-110

- 61.- Jones HE, Reinhardt JH, Rinaldi MG. Acquired Immunity to dermatophytes Arch Dermatol. 1974;109:840-848.
- 62.- Kazuyuki, Morihara. Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology. 964;88(3):745-757.
- 63.- Koneman E, Roberts G. Micológia práctica de laboratorio. Identificación de laboratorio de mohos. Argentina: Editorial Medica Panamericana S.A. 1987;20,126,127,128,130,166.
- 64.- Korting HC, Blecher P, Stallmann D, et al. Dermatophytes on the feet of HIV-infected patients: frequency, species distribution, localization and antimicrobial susceptibility. MYCOSES. 1993;36:271-274.
- 65.- Kothary M, Chase T, MacMillan J. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive Aspergillosis in mice. Infect Imm. 1984;43:320-325.
- 66.- Kunert J. Thiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes in vitro. Sabouraudia. 1972;10:6-13.
- 67.- Kushida T, Watanabe S. Canine rigworm cause by *Trichophyton rubrum*, probable transmission from man to animal, Sabouraudia. 1975;13:30-32.
- 68.- Kwang Hoon Lee, Kwang Kyun Park, Sung Hyun Park, et al. Isolation, Purification and Characterization of Keratinolytic Proteinase from *Microsporum canis*. Yonsei Medical Journal. 1987;28(2):131-138.
- 69.- Lachica RVF, Genigeorgis C, Hoepflich P D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting Staphylococcal nuclease activity. Applied Microbiology. 1971;21:585-587.
- 70.- Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heard bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685.
- 71.- Lepper AWD. Immunological aspects of dermatomycoses in animals and man. Rev Med Vet Mycol. 1964;6:435-442.
- 72.- Lockwood BC, North MJ, Scott KI, y col. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. Molecular and Biochemical Parasitology. 1987;24:89-95.
- 73.- López-Martínez R, Castañón-Olivares LR, Rodríguez HR. Algunos aspectos epidemiológicos de las dermatofitosis. Frecuencia de infección. Rev Mex Mic. 1985;1:29-35.
- 74.- López-Martínez R. Investigación de algunas fuentes de infección en la dermatofitosis. Estudio de suelos, animales y hombre. Gaceta Médica de México. 1986;122:167-172.

- 75.- López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Mier T, y col. Exoenzimas de Dermatofitos. Aislados de tiñas agudas y crónicas. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 1994;36:17-20.
- 76.- Lovell DF, Bibel DJ. Tween 80 medium for differentiating nonpigmented *Serratia* from other Enterobacteriaceae. Journal Clinical Microbiol. 1977;5:245-247.
- 77.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr et al. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of biological Chemistry. 1951;193:265-267.
- 78.- Macura AB, Laskowicka Z, Macura C. Fungi causing superficial cutaneous mycoses in the district of Cracow. Mykosen. 1984;27:36-42
- 79.- Mago N, Khuller GK. Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*. Journal of Medical and Veterinary Micology. 1990;28:355-362.
- 80.- Malviya HK, Rajak RC, Hasija SK. Purification and partial characterization of two extracellular keratinases of *Scopulariopsis brevicaulis*. Mycopathologia. 1992;119:161-165.
- 81.- Malviya HK, Rajak RC, Hasija SK. Synthesis and regulation of extracellular keratinase in three fungi isolated from the grounds of a gelatin factory, Jabalpur, India. Mycopathologia 1992;120:1-4.
- 82.- Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, y col. Dermatophytoses in México City. Mycoses. 1994;37:49-52.
- 83.- Manzano-Gayosso P. Estudio clínico-epidemiológico de las dermatofitosis, correlación entre la producción de enzimas y evolución clínica. Tesis de Posgrado. 1991. UNAM México, D.F.
- 84.- Matis WL, Triana A, Shapiro R, et al. Dermatologic findings associated with human immunodeficiency virus infection. J. Am. Acad. Dermatol. 1987;17:746-751.
- 85.- Matsumoto T, Ajello L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. Int J Dermatol. 1987;26(8): 491-496.
- 86.- Mclean T, Levy H, Lue YA. Ecology of dermatophyte infections in South Bronx, New York 1969 to 1981. J Amer Acad Dermatol. 1987;16:336-340.
- 87.- McClung LS, Toabe R. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium sporogenes* and certain species of the gangrene and botulinum groups. J. Bacteriology. 1947;53:139-147.
- 88.- Meevootisom V, Niederpruem J. Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia. 1979;17:91-106.
- 89.- Mendoza-Villalobos SE. Obtención y caracterización de tricofitina para reacciones intradérmicas. Tesis profesional. 1993. UNAM. Mexico, D.F.

- 90.- Merz WG, LLOYD KO, Silva-Hutner M. Characterization of a *Trichophyton mentagrophytes* and its diffusible pigment. 1972;10:86-93.
- 91.- Mier T, Toriello C, Casamitjana M, et al. Estudio comparativo de la producción de diversas enzimas en dos cepas de *Conidiobolus coronatus*. Bol Soc Mex. Mic. 1981;16:5-10.
- 92.- Milkhaill GR. *Trichophyton rubrum* Granuloma. Intern J Derm. 1970;9(1):41-46.
- 93.- Minocha Y, Pasricha SJ, Mohapatra N L, Kandhari K C. Proteolytic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. Sabouraudia. 1972;10:79-85.
- 94.- Muhlemann MF, Anderson MG, Paradinas FJ, y col. Early warning skin signs in AIDS and persistent generalized lymphadenopathy. Br.J.Dermatol. 1986;114:419-424.
- 95.- Negi M, Tsuboi R, Matsui T, et al. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. Journal of Investigative Dermatology. 1984;83: 32-36.
- 96.- Neils SP. HIV Infection in children. J. Am Acad Dermatol 1990;22:1223-1231.
- 97.- Nishiyama C, Isikawa T, et al. Six cases of tinea profunda probably induced by use of steroid ointments. Jap J Med Mycol. 1977;18:22-28.
- 98.- Noval JJ, Nickerson WJ. Descomposición de native keratin by *Streptomyces fradiae*. J Bacteriol. 1959;77:251-263.
- 99.- Nziramasanga P, Lupan DM. Elastase activity of *Coccidioides immitis*. J Med Microbiol. 1985;19:109-114.
- 100.- Ogawa H, Nozawa Y, Rojanavanich V, et al. Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infections. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1992;30:189-196.
- 101.- O'Sullivan J, Mathison EG. The localization and secretion of a proteolytic enzyme complex by the dermatophytic fungus *Microsporium canis*. Journal of General Microbiology. 1971;68:319-326.
- 102.- Pavlovskis OR, Wretling B. Assessment of protease (elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infection. Infect Imm. 1979;24:181-187.
- 103.- Penneys NS, Hicks B. Unusual cutaneous lesions associated with acquired immunodeficiency syndrome. J Am Acad Dermatol. 1985;13:845-852.
- 104.- Pereiro MM, Ferreirós EM, Pereiro F M. Estudio clínico y micológico de las micosis por *Trichophyton rubrum*. Med Cut ILA. 1978;2:129-138.
- 105.- Pereiro MM, Pereiro M, Pereiro Jr M. Review of dermatophytoses in Galicia from 1951 to 1987 and comparison with other areas of Spain. Mycopathologia. 1991;113:65-78.

- 106.- Philpot C. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* by a simple urease test. *Sabouraudia*. 1967;5:189-193.
- 107.-Philpot MCh. Serological differences among the dermatophytes. *Sabouraudia*. 1978;16: 247-256.
- 108.- Poincelot RP, Day PM. Simple dye release assay fordetermining cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiology*.23:875-879.
- 109.- Price MF, Wilkinson D, Gentry LO. Plate method for detection phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabuoraudia*. 1982;20:7-14.
- 110.- Rajak RC, Parwekar S, Malviya H, et al. Keratin degradation by fungi isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur India. *Mycopathologia*. 1991:114:83-87.
- 111.- Rajak RC, Malviya H, Deshpande H, et al. Keratinolysis by *Absidia cylindrospora* and *Rhizomucor pusillus*: biochemical proof. *Mycopathologia*. 1992:118:109-114.
- 112.- Richardson MD, Aljabre SH. Pathogenesis of dermatophytosis. *Curr. Top. Med. Mycol (United States)*. 1993;5:49-77.
- 113.- Rebell G, Taplin D. *Dermatophytes*. Florida:university of Miami Press.1964:1-74.
- 114.- Remold H, Fosold H, Staib F. Purification and characterization of proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochem, Biophys Acta*, 1968;167:399-406.
- 115.- Rippon J. Elastase: Production by Ringworm Fungi. *Science*. 1967;157:947.
- 116.-Rippon JW. Varadi DP. The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1968;50: 54-58.
- 117.- Rippon JW. Collagenase from *Trichophyton Schoenleinii*. *J. Bacteriol*. 1968;95:43-47.
- 118.- Rippon J. *Tratado de Micología Médica. Dermatofitosis y Dermatomicosis*. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1990:186- 248.
- 119.- Rippon JW. Forty four years of dermatophytes in a Chicago clinic (1944-1988). *Mycopathologia*. 1992;119:25-28.
- 120.- Ruffin P, Andrieu S, Bisert G, et al. Sulphitolysis in keratinolysis. *Biochemical proff. Sabouraudia* 1976;14:181-184.
- 121.- Sanyal AK, Das SK, Banerjee AB, Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia:of Medical and Veterinary Micology*. 1985;23:165-78
- 122.- Sbarra AJ, Gilfillan RF, Bardawill WA. A plate assay for elastase. *Nature*. 1960;4747: 322-323.

- 123.- Schechtman RC, Allen MH, McGregor JM, et al. Skin inflammation in chronic dermatophyte infections caused by *Trichophyton rubrum* lack of epidermal expression of ICAM-1. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1993;31:459-462.
- 124.- Sindrup HH, Weismann K, Sand PC, y col. Skin and oral mucosal changes in patients infected with human immunodeficiency virus. Acta. Derm. Venereol. (Stockh). 1988;68:440-443.
- 125.- Smith PB, Hancock GA, Rhoden D L. Improved medium for detecting deoxyribonuclease producing bacteria. Applied Microbiology 1969;18:991-993.
- 126.- Sondell B, Thornell LE, Stigbrand T, y col. Immunolocalization of stratum corneum chymotryptic enzyme in human skin and oral epithelium with monoclonal antibodies; evidence of proteinase specifically expressed in keratinizing squamous epithelium. J. Histochem Cytochem (United States). 1994;42(4):459-465.
- 127.- Stahl WH, McQue B, Mandels GR y col. Studies on the Microbiological Degradation of Wool. I. Sulfur Metabolism. 1949a;20:422-432.
- 128.- Stahl WH, McQue B, Siu RGH. Studies on the Microbiological Degradation of Wool. II Nitrogen Metabolism. Arch. Biochem 1950a;27:211-220.
- 129.- Steinert PM. The Extraction and Characterization of Bovine Epidermal β -Keratin. Biochem. J. 1975;149:39-48.
- 130.- Svejgaard EA, Sthahl CD, Thomsen K. Clinical and immunological studies in chronic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* Acta Venereol. 1984;64:496-500.
- 131.- Svejgaard E. Immunologic properties of a fraction of *Trichophyton rubrum* with affinity to concavalin A. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1986;24:271-280.
- 132.- Takiuchi I, Higuchi D. Isolation, purification and biochemical properties of keratinase elaborated from *Microsporium gypseum*. The Japanese Journal of Dermatology. 1977;87:305-309.
- 133.- Takiuchi I, Higuchi D, Sei Y, y col. Isolation of an extracellular proteinase (Keratinase) from *Microsporium canis*. Sabouraudia. 1982;20:281-288.
- 134.- Takiuchi I, Sei Y, Takagi H, y col. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporium canis*. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1984;22:219-224.
- 135.- Tanaka S, Summerbell RC, Tsuboi R, y col. Advances in dermatophytes and dermatophytosis. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1992;30:1:29-39.
- 136.- Toriello C, Mier T, Ojeda E, y col. Actividades enzimáticas en levaduras de *Histoplasma capsulatum*. Rev Mex Mic. 1988;4:275- 280.

- 137.- Torres-Rodríguez J. Micosis que afectan piel y mucosas. Dermatofitos o tiñas. Barcelona. DOYMA S.A. 1987:34-55.
- 138.- Torssander J, Karlsson A, Morefeldt-Manson L, y col. Dermatophytosis and HIV-infection. A study in homosexual men. Acta. Derm. Venereol. (Stockh). 1988;68:54-56.
- 139.- Tsuboi R, Kurita Y, Negi M, y col. A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit the cell growth of *C. albicans*. The Journal of Investigative Dermatology. 1985;85:438-440.
- 140.- Tsuboi R, Sanada T, Ogawa H. Influence of culture medium pH and proteinase inhibitors on extracellular proteinase activity and cell growth of *Sporothrix schenckii*. Journal of Clinical Microbiology. 1988;26:1431-1433.
- 141.- Tsuboi R, Ko Ik, Takamori K, y col. Isolation of a keratinolytic proteinase from Trichophyton mentagrophytes with enzymatic activity at acid pH. Infection and Immunity. 1989;57:3479-3483.
- 142.- Vidotto V, Garcia R, Ponce LM, y col. Dermatophytoses en Cusco (Peru). Mycoses. 1991;34:183-186.
- 143.- Wayne W, Boolika S T, Wray VP y col. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Annal. Biochem. 1981;118:197-203.
- 144.- Wawrzkiwicz K, Wolski T, Lobarzewski J. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. Mycopathologia. 1991;114:1-8.
- 145.- Weary PE, Canby CM. Keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. The Journal of Investigative Dermatology. 1967;48:240-248.
- 146.- Weary PE, Canby CM, Further observations on the keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleinii* and *Trichophyton rubrum*. Journal of Investigative Dermatology. 1969;53:58-63.
- 147.- Wilson JW, Plunkett OA, Gregorsen A. Nodular granulomatous perifolliculitis of legs caused by *Trichophyton rubrum*. Journal of Investigative Dermatology. 1969;53:58-63.
- 148.- Wong KO, Chan YF. A variant of *Trichophyton rubrum* isolated in Hong Kong. Br. J. Derm. 1968;80:671-674.
- 149.- Young CN. Range of variation among isolates of *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia. 1972;10:164-170.
- 150.- Yuan L, Cole GT. Isolation and characterization of an extracellular proteinase of *Coccidioides immitis*. Infection and Immunity. 1987;55:1970-1978.
- 151.- Yu RJ, Harmon SR, Blank F. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. Journal of Bacteriology. 1968;96:1435-1436.

- 152.-Yu RJ, Harmon SR, Wachter PE, y col. Amino acid composition and specificity of a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes* Archives of Biochemistry and Biophysics. 1969;135:363-370.
- 153.-Yu RJ, Harmon SR, Grappel SF, y col. Two cell-bound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. The Journal of Investigative Dermatology. 1971;56:27-32.