

# Caracterización parcial de proteínas de una cepa de *Cladosporium* sp

Partial characterization of proteins of a strain of *Cladosporium* sp

COLCIENCIAS TIPO 1. ARTÍCULO ORIGINAL

RECIBIDO: ENERO 26, 2013; ACEPTADO: FEBRERO 13, 2013

José Iván Rengifo<sup>1</sup>

[jose.ivan.rengifo@correounivalle.edu.co](mailto:jose.ivan.rengifo@correounivalle.edu.co)

Flavio Cerón<sup>2</sup>

[flaceron@gmail.com](mailto:flaceron@gmail.com)

Luz Dary Caicedo<sup>1</sup>

[ludcaice@usc.edu.co](mailto:ludcaice@usc.edu.co)

Universidad Santiago de Cali - Colombia (1)

Universidad del Valle, Cali -Colombia (2)

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue la caracterización parcial de proteínas de la fracción acuosa y micelio del cultivo de una cepa de *Cladosporium* sp, aislada de la casa de un paciente reactivo a las conidias de este hongo, ubicada en la zona nor-oriental de la ciudad de Cali. Se determinó la concentración de proteínas con el método de Lowry, el patrón electroforético en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) y la actividad de las enzimas proteasas y fosfatasa ácida y alcalina. En el micelio se encontró un contenido proteico de 5.88 ug/mL, bandas de electrofóresis entre 11 y 74 kDa, actividad proteolítica en un rango de pH entre 6.0 y 8.0, actividad de fosfatasa negativa en medio ácido y alcalino. Las pruebas realizadas con el extracto acuoso fueron negativas. Investigaciones realizadas en otras partes del mundo han demostrado que existe variación en la cantidad y actividad de las proteínas de estos hongos, lo que hace difícil la estandarización de técnicas diagnósticas e inmunoterapia, resultados que están de acuerdo con los obtenidos. Este es el primer estudio realizado en la ciudad de Cali; se espera continuar con otras investigaciones que permitan caracterizar los componentes alérgicos de especies de este hongo, el más prevalente en el ambiente de esta ciudad.

## Palabras Clave

*Cladosporium spp*; proteínas; alérgenos.

## Abstract

The objective of this research was the partial characterization of proteins from the aqueous fraction and growing mycelium of *Cladosporium* sp strain isolated from a patient's home reactive conidia of this fungus, located in the north-eastern city of Cali. The concentration of protein by the method of Lowry, the gel electrophoresis pattern in polyacrylamide sodium dodecyl sulphate (SDS) and the activity of protease enzymes and acid and alkaline phosphatase. The mycelium was found a protein content of 5.88 ug / mL electrophoresis bands between 11 and 74 kDa proteolytic activity in a pH range between 6.0 and 8.0, negative phosphatase activity in acidic and alkaline medium. Tests with the aqueous extract was negative. Research in other parts of the world have shown that the variation in the amount and activity of these fungal proteins, which makes difficult the standardization of diagnostic and immunotherapy, results that agree with the data. This is the first study in the city of Cali, is expected to continue with further investigations to characterize the allergenic components of this fungus species, the most prevalent in the atmosphere of this city.

## Keywords

*Cladosporium spp*; proteins; allergens

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Cladosporium* spp, son saprofitos, oportunistas y cosmopolitas. Se aíslan con frecuencia en los interiores y los exteriores de viviendas y son considerados una causa importante de alergias respiratorias. Crecen en una gran variedad de sustratos, tales como plantas en descomposición, maderas, cauchos, suelo entre otros. Sus esporas son probablemente las de mayor prevalencia a nivel mundial, sobre todo, en los climas templados, con temperaturas óptimas entre 18 y 28°C, donde pueden encontrarse en el aire, a lo largo de todo el año (Das & Gupta-Bhattacharya, 2008; Hasnain, Akhter, & Waqar, 2012; Meng, Barnes, Rosenwasser, & Health, 2012; Naegele, Reboux, Scherer, Roussel, & Millon, 2013).

El diagnóstico de alergias para este u otro tipo de hongos es difícil de realizar, ya que a diferencia de los otros alérgenos, no es claro cuál es la fuente original de sensibilización: si los micelios, las esporas o los metabolitos secundarios; además, se conoce que las proteínas de estos hongos pueden variar de acuerdo con las condiciones geográficas y topográficas, lo que aumenta la dificultad de estandarizar técnicas para la obtención de extractos con actividad antigénica, efectivos para el diagnóstico y el tratamiento específico mediante inmunoterapia (Bisht, Arora, Singh, Gaur, & Sridhara, 2004; Grier, LeFevre, Duncan, Esch, & Coyne, 2012; Nosanchuk & Taborda, 2013; Shah & Grammer, 2012).

Es importante conocer cuáles son los hongos presentes en los diferentes ambientes, especialmente en las casas de pacientes alérgicos, con el fin de realizar estudios controlados sobre la eficacia y seguridad de la inmunoterapia con extractos fúngicos que puedan ser aplicados en pruebas de sensibilización, adecuadas a las condiciones de cada región. Los hongos del género *Cladosporium* spp, están asociados a problemas de alergia a nivel mundial y son los hongos que se encuentran con mayor frecuencia en el ambiente de la ciudad de Cali (Caicedo, Díaz, Henao & Ocampo, 2002). Por esta razón se consideró importante realizar un estudio de aislamiento y caracterización de proteínas de una cepa obtenida de la casa de un paciente, reactivo a sus conidias, ubicada en el perímetro urbano de esta ciudad, con el propósito de determinar las posibles variaciones que estas puedan presentar y compararlas con la composición proteica de las cepas informadas en la literatura.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en la ciudad de Santiago de Cali, situada a 1025 metros de altitud sobre el nivel del mar, con una humedad media relativa de 66% y una temperatura promedio de 25°C.

### A. Cepa de estudio

El estudio se realizó con una cepa de *Cladosporium* sp, aislada de la casa de un paciente reactivo a las conidias de este hongo, ubicada en la zona nor-oriental del perímetro urbano de Cali (Barrio Las Ceibas).

### B. Aislamiento e identificación del hongo

Para el aislamiento del hongo se utilizó el método gravimétrico intradomiciliario, basado en la caída libre de esporas y micelio fúngico, sobre una caja de petri con medio de cultivo (Gómez et al., 2005). Se expusieron cuatro cajas de petri de 90 mm; dos con Agar Sabouraud dextrosa al 20% (Merck), suplementado con Despacilina plus 800 al 0.2% y Gentamicina de 80 mg al 0.2% y dos con Agar Sabouraud Dextrosa modificado con 5% de NaCl, durante 30 minutos en diferentes sitios de la casa. Las cajas se incubaron durante 10 días a 25°C y se examinaron diariamente para visualizar el crecimiento de mohos de color negro presuntivos de *Cladosporium* spp; luego, estas se subcultivaron en agar dextrosa de Sabouraud. La cepa de *Cladosporium* sp se identificó con base en los criterios establecidos, como características macroscópicas y microscópicas (Hoog, Guarro, Gené & Figueras, 2011; Larone, 2011; Ellis, Davis, Alexiou, Handke, & Bartley, 2007).

### C. Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos, se inoculó 1 cm<sup>2</sup> de la cepa de *Cladosporium* sp, en un erlenmeyer de 250 mL, que contenían 100 mL de medio líquido semisintético Czapek dox (Oxoid, Basingstoke, UK), una vez inoculada, la cepa fue incubada en un agitador a 100 rpm a una temperatura ambiente promedio de 25°C, durante tres semanas. Los cultivos se examinaron diariamente para visualizar el desarrollo adecuado del hongo y detectar posibles contaminaciones, además de evitar que un posible crecimiento excesivo llegara a la parte superior del erlenmeyer. Dependiendo de este crecimiento el micelio fue cosechado y separado del medio líquido con papel whatman No. 1, obteniendo una fracción del medio

acuoso y una fracción del micelio (Al-Suwaine, Bahkali, & Hasnain, 2001; Gómez et al., 2005).

#### D. Obtención de las proteínas del micelio

La fracción del micelio fue sometida a un proceso de deslipidificación con una mezcla de cloroformo y metanol (2:1) (v/v), con agitación constante durante 24 horas.

El micelio deslipidificado fue separado de los solventes con papel Whatman No.1 y secado a temperatura ambiente durante 24 horas; posteriormente, fue pesado y triturado en un mortero hasta obtener un polvo muy fino al cual se le añadió buffer fosfato salino (PBS) pH 8.0 1:50 (p/v) y 0.4% (p/v) de cristales del fenol, como preservativo. Estos extractos fueron dejados en agitación constante a una temperatura de 4°C durante 72 horas y separados con papel whatman No. 1. Luego fueron centrifugados a 20000 gravedades por 30 min y 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se sometieron a diálisis con PBS al 25 % por seis horas y agua bidestilada por doce horas a 4°C, luego de la cual se esterizaron en filtro millipore 0.22  $\mu$ m.

El producto obtenido en este proceso se separó en dos fracciones, a una se le adicionó un cóctel de inhibidores enzimáticos para proteasas, cuya solución stock consistió de P.M.S.F 87.0 mg, (Sigma prod. P7626), Pepstatin “A” 3.0 mg (Sigma prod. P4265) y Aprotinin 1.25 mg (Sigma prod. A1153), mezclados en 5.0 mL de Etanol Absoluto y disueltos con agua destilada 1: 500 v/v. De esta dilución se adicionaron 5  $\mu$ L por cada mL de antígeno obtenido, para luego ser utilizada en los ensayos de SDS-PAGE y en la determinación de actividad de fosfatasa. La otra fracción se dejó sin inhibidores para ser utilizada en los ensayos de actividad proteolítica. Ambas fracciones se concentraron en un rotaevaporador a una temperatura de 37°C y agua para condensación a 4°C. Se almacenaron a -20°C, hasta su uso para la cuantificación de proteínas, el análisis de electroforesis y los ensayos enzimáticos (Al-Suwaine, Bahkali, & Hasnain, 2001).

#### E. Obtención de proteínas del medio acuoso

El medio acuoso se filtró en papel whatman No. 1. Se centrifugó a 20000 gravedades por 30 min a 4°C. El sobrenadante se sometió a diálisis con PBS al 25% por seis horas y agua bidestilada por doce horas a 4°C. Se esterilizó con filtro millipore 0.22  $\mu$ m.

El producto de este proceso se separó en dos fracciones, a una de ellas se le adicionó un cóctel de

inhibidores enzimáticos para proteasas, cuya solución stock consistió de P.M.S.F 87.0 mg, (Sigma prod. P7626), Pepstatin “A” 3.0 mg (Sigma prod. P4265) y Aprotinin 1.25 mg (Sigma prod. A1153). De esta dilución se adicionaron 5  $\mu$ L por cada mL de antígeno obtenido, para luego ser utilizada en los ensayos de SDS-PAGE y en la determinación de actividad de fosfatasa. La otra fracción se dejó sin inhibidores para ser utilizada en los ensayos de actividad proteolítica. Ambas fracciones se concentraron en un rotaevaporador a una temperatura de 37°C y agua para condensación a 4°C. Se almacenaron a -20°C, hasta su uso para la cuantificación de proteínas, análisis de electroforesis y ensayos enzimáticos (Al-Suwaine, Bahkali, & Hasnain, 2001)

#### F. Cuantificación de proteínas

El contenido de proteína de los extractos fue estimado por el método de Lowry (Harlow & Lane, 1988). En este, el complejo proteína-Cu<sup>+2</sup> se hace reaccionar con el reactivo de folin-ciocalteu phenol dando una coloración azul, presenta un máximo de absorción a 750 nm en la región visible del espectro. Para realizar la cuantificación se prepararon las siguientes soluciones así:

- Solución A (100 mL), se pesó 0.5 g de CuSO<sub>4</sub> y 1.0 g de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O y se disolvieron en agua destilada hasta completar 100 mL.
- Solución B (100 mL), se pesaron 2.0 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0.4 g de NaOH y se disolvieron en agua destilada hasta completar 100 mL.
- Solución C (51 mL), se mezcló 1 mL de solución A con 50 mL de solución B. Solución D (20 mL), se mezcló 10 mL de folin-ciocalteu phenol con 10 mL de agua destilada.

Las muestras se prepararon de la siguiente forma: en un tubo de ensayo se adicionó 0.5 mL de la muestra problema, 2.5 mL de la solución C, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 5 – 10 minutos, se adicionó 0.25 mL de la solución D y se mezcló. Después de 20 – 30 minutos se leyó la absorbancia de la muestra a 750 nm. El blanco se preparó siguiendo los pasos anteriores y reemplazando los 0.5 mL de muestra iniciales por agua destilada. Para la curva de calibración se preparó una solución stock de Albúmina sérica bovina (ASB) de 100  $\mu$ g/mL, a partir de la cual se realizaron diluciones a concentraciones de 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0  $\mu$ g/mL. La muestra preparada se midió en el espectrofotómetro con las siguientes condiciones. Se ajustó el mando de selección

de la longitud de onda a 750 nm, se ajustó el cero de absorbancia con la solución blanco, se midió la absorbancia de los tubos clasificados, desde la solución menos concentrada a la más concentrada.

#### G. Determinación de pesos moleculares relativos

Las proteínas obtenidas se corrieron por electroforesis en gel homogéneo de poliacrilamida 12%, bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE) con los siguientes equipos y reactivos: Cámara de Electroforesis Miniprotein II (BioRad), solución stock de acrilamida-bisacrilamida, agua destilada, buffer Tris HCl 1.5 M pH 8.8, buffer Tris HCl 0.5M pH 6.8, persulfato de amonio [PSA] al 10%, SDS al 10%, TEMED, buffer de corrida tris-Glicina, buffer muestra 2X (García, 2000). Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron de acuerdo con la movilidad relativa [Rf] al compararlos con los patrones de peso molecular conocidos (García, 2000; Braun, Kinkl, Zischka, & Ueffing, 2008).

#### H. Determinación de actividad proteolítica

La actividad proteolítica se midió mediante un ensayo de digestión con una proteína estándar como sustrato. Se mezclaron 100  $\mu$ L de muestra de la proteína obtenida, 4  $\mu$ L de solución de Albúmina sérica bovina (ASB) de 100  $\mu$ g/mL como sustrato y 90  $\mu$ L de PBS 0.01 M, ajustado a un rango de pH de 5.0 a 9.0, por unidad. Esta mezcla se incubó a 37°C. De las muestras anteriores se tomaron alícuotas de 4  $\mu$ L, cada hora hasta completar 4 horas. Se mezclaron con buffer muestra y se llevaron a SDS-PAGE 12%. En cada pozo se adicionaron 10  $\mu$ L de la mezcla y un pozo con 10  $\mu$ L de proteínas estándar de peso molecular conocido. Los geles obtenidos se tiñeron con nitrato de plata, para determinar actividad proteolítica (Monod, Capoccia, Léchenne, Zaugg, Holdom, & Jousson, 2002).

#### I. Determinación de la actividad de fosfatasa ácida

Se hizo una mezcla de ensayo que contenía: 2760  $\mu$ L de buffer acetato de sodio, ajustado a diferentes valores de pH por unidad, de 4.0 hasta 6.0; 90  $\mu$ L de Paranitrofenil fosfato [pNFP], como sustrato y 150  $\mu$ L de la proteína obtenida, en un volumen final de 3000  $\mu$ L. Se incubaron las muestras por treinta minutos a 37°C. Se terminó la reacción con la adición de 30  $\mu$ L de NaOH 1.0 M. El Paranitrofenol [pNF] producido se determinó por espectrofotometría a 410 nm (Gómez-Guiñan, 2004).

#### J. Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

Se hizo una mezcla de ensayo que contenía: 2760  $\mu$ L de buffer Tris-HCl, ajustado a diferentes valores de pH por unidad, de 7.0 a 9.0; 90  $\mu$ L de pNFP y 150  $\mu$ L de la proteína obtenida. Se incubaron las muestras por treinta minutos a 37°C. Se terminó la reacción con la adición de 30  $\mu$ L de NaOH 1.0 M. El pNF producido se determinó por espectrofotometría a 410 nm (Gómez-Guiñan, 2004).

### III. RESULTADOS

#### A. Aislamiento e identificación del hongo

Se aislaron en promedio 4 UFC de un cultivo puro de *Cladosporium sp* en los diferentes sitios de la casa del paciente reactivo a las conidias del hongo (habitación, baños, sala y cocina). El crecimiento se detectó a partir del segundo día. Para la identificación se tuvo en cuenta características macroscópicas como el color, la textura y la topografía. Al quinto día presentó color negro en el anverso y reverso de la caja petri, textura aterciopelada y topografía rugosa, presuntiva del género *Cladosporium*. Para su identificación se tuvo en cuenta las características microscópicas, como conidioforos ramificados, conidias pigmentadas lisas y catenuladas, con crecimiento acropetal. (Hoog, Guarro, Gené & Figueras, 2011; Larone, 2011; Ellis, Davis, Alexiou, Handke, & Bartley, 2007).

#### B. Obtención de las proteínas del micelio y del medio acuoso

Una vez terminado todo el proceso de extracción se obtuvo un volumen aproximado para cada extracto (100 mL en el caso del medio acuoso y 50 mL en el caso del micelio). Al someter los extractos a concentración utilizando en rotaevaporador se obtuvo un volumen final de cada muestra de 20 mL.

#### C. Cuantificación de proteínas

Como se muestra en la Tabla 1 la concentración de proteínas del extracto del micelio fue 5,88  $\mu$ g/mL, mientras que en el extracto acuoso fue cero.

**Tabla 1. Concentración de proteínas**

Muestra	Absorbancia
Extracto del Micelio	0,085
Extracto acuoso	0,000

D. Determinación de pesos moleculares relativos

La Figura 1 muestra la PAGE-SDS 12%, se observó la presencia de bandas de proteínas en el extracto del micelio, pero no en el extracto acuoso. La Tabla 2 muestra el patrón electroforético, el Rf, el P.E. y el Log<sub>10</sub> de las proteínas estándar (datos base para la Figura 2).

Figura 1. SDS – PAGE al 12 % de proteínas Así: A y E marcadores de peso molecular, (Proteínas estándar) B proteínas extracto del micelio, C proteínas extracto acuoso

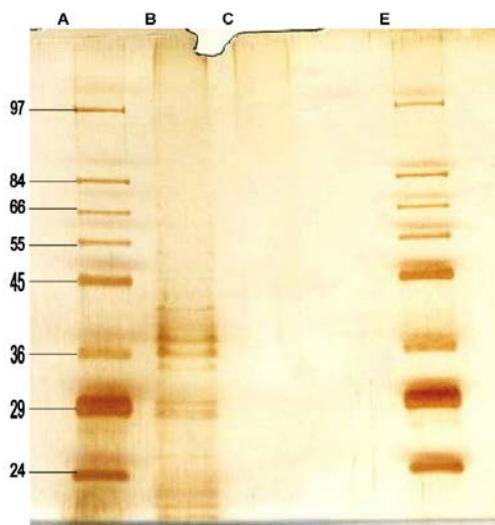
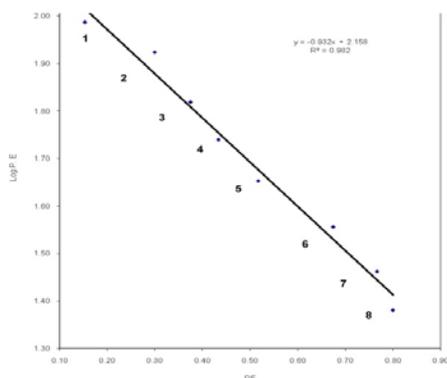


Tabla 2. Peso molecular de proteínas estándar

Migración P. E. (cm)	Rf	P. E. (KDa)	Log <sub>10</sub> P. E.
0,95	0,1533	97	1,9868
1,80	0,2998	84	1,9243
2,25	0,3748	66	1,8195
2,60	0,4331	55	1,7404
3,10	0,5164	45	1,6532
4,05	0,6746	36	1,5563
4,60	0,7662	29	1,4624
4,80	0,7995	24	1,3802

Figura 2. Curva estándar de 8 marcadores de peso molecular. 1. Fosforilasa b, músculo de conejo (97.000), 2. Fructosa-fosfato-kinasa, músculo de conejo (84.000), 3. Albúmina sérica bovina (66.000), Deshidrogenasa glutámica, hígado bovino (55.000), Ovalbúmina, hu



E. Patrón de electroforesis de la fase miceliar

En la Tabla 3 se muestran los Rf y P.M. de las proteínas obtenidas de la fase miceliar.

Tabla 3. Pesos moleculares aproximados de las proteínas obtenidas del extracto del micelio de la cepa aislada del *Cladosporium* sp

Migración Proteínas micelio (cm)	Rf	Y	Anti Log <sub>10</sub> Y	Proteínas Micelio (kDa)
2,20	0,3665	1,8725	74,5590	74,56
2,40	0,3997	1,8307	67,7173	67,72
2,80	0,4664	1,7467	55,8084	55,81
3,00	0,4997	1,7048	50,6757	50,68
3,10	0,5164	1,6838	48,2836	48,28
3,50	0,5830	1,6000	39,8107	39,81
3,70	0,6163	1,5580	36,1409	36,14
3,80	0,6329	1,5370	34,4350	34,44
4,05	0,6746	1,4846	30,5211	30,52
4,20	0,6996	1,4532	28,3923	28,39
4,65	0,7746	1,3587	22,8402	22,84
4,70	0,7829	1,3483	22,3000	22,30
4,95	0,8246	1,2958	19,7606	19,76
5,25	0,8744	1,2331	17,1041	17,10
5,70	0,9494	1,1387	13,7626	13,76
5,85	0,9744	1,1072	12,7997	12,80
6,00	0,9994	1,0757	11,9042	11,90

F. Determinación de la actividad proteolítica

Las Figuras 3, 4 y 5 muestran la actividad proteolítica del extracto del micelio; se observó que a pH 6,0, 7,0 y 8,0 hubo degradación de la proteína estándar utilizada, mientras que a pH 5,0 y 9,0 fue negativa (Figuras 6 y 7).

Figura 3. SDS–PAGE al 12 % de muestras de digestión proteolítica de ASB por proteínas extraídas del micelio de una cepa de *Cladosporium* sp. con PBS a pH 6,0

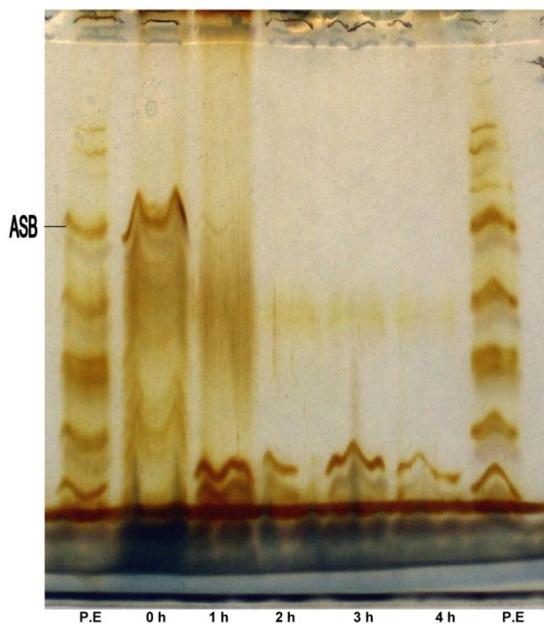


Figura 4. SDS –PAGE al 12 % de muestras de digestión proteolítica de ASB por proteínas extraídas del micelio de una cepa de *Cladosporium sp.* con PBS a pH 7.0

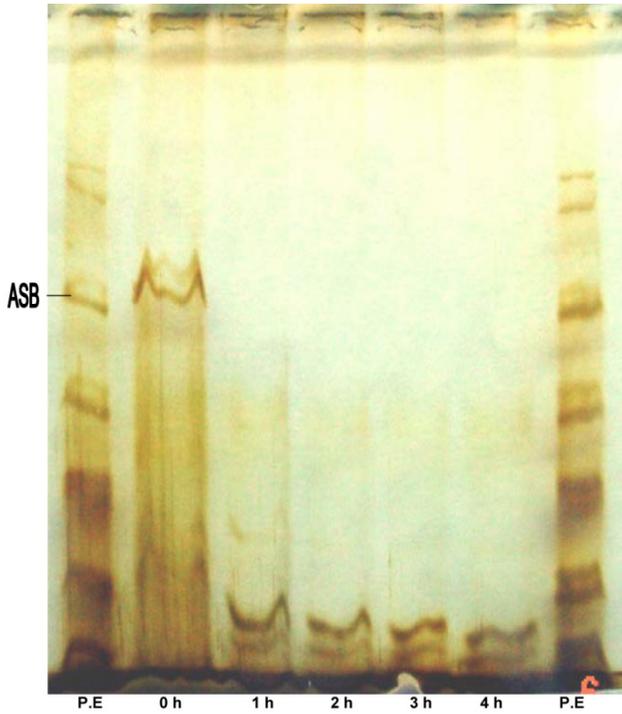


Figura 6. SDS–PAGE al 12 % de muestras de digestión proteolítica de ASB por proteínas extraídas del micelio de una cepa de *Cladosporium sp.* con PBS a pH 5.0.

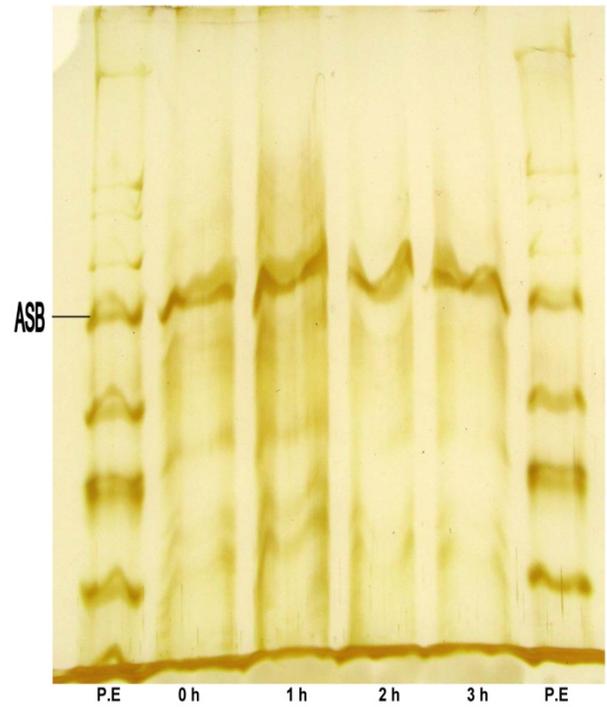


Figura 5. SDS –PAGE al 12 % de muestras de digestión proteolítica de ASB por proteínas extraídas del micelio de una cepa de *Cladosporium sp.* con PBS a pH 8.0

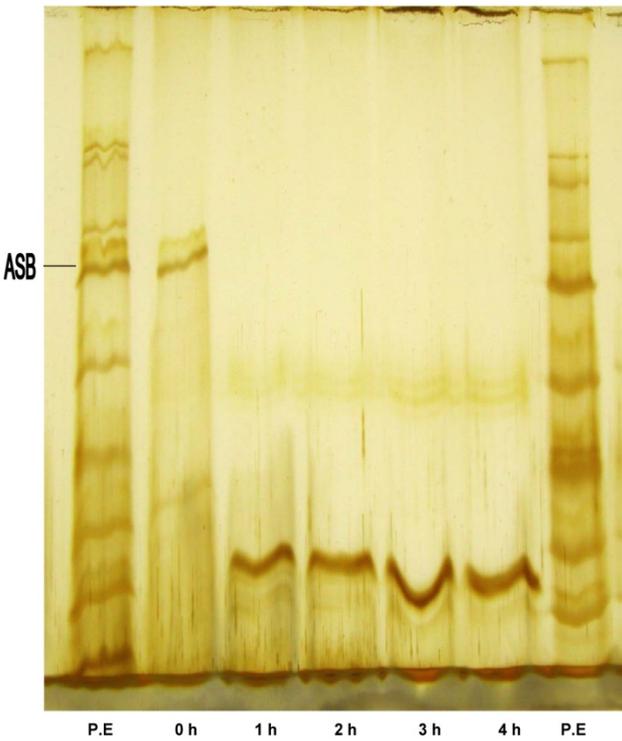
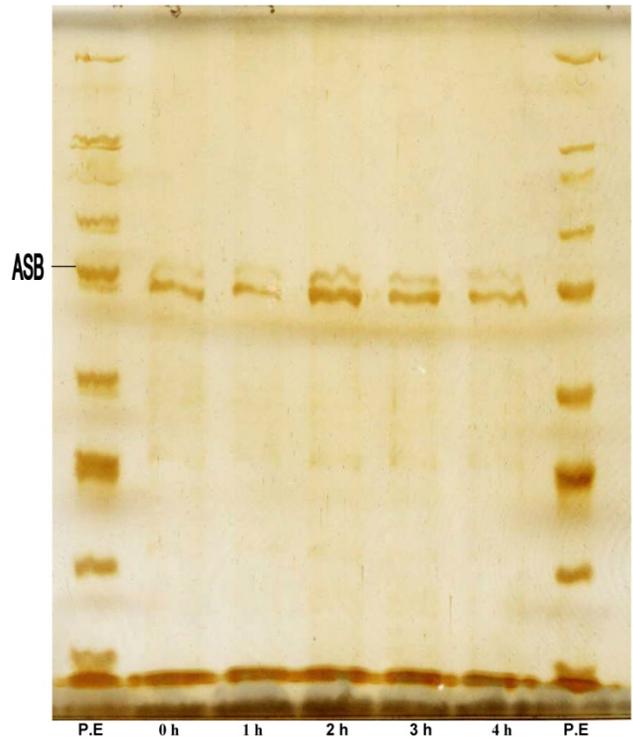


Figura 7. SDS –PAGE al 12 % de muestras de digestión proteolítica de ASB por proteínas extraídas del micelio de una cepa de *Cladosporium sp.* con PBS a pH 9.0



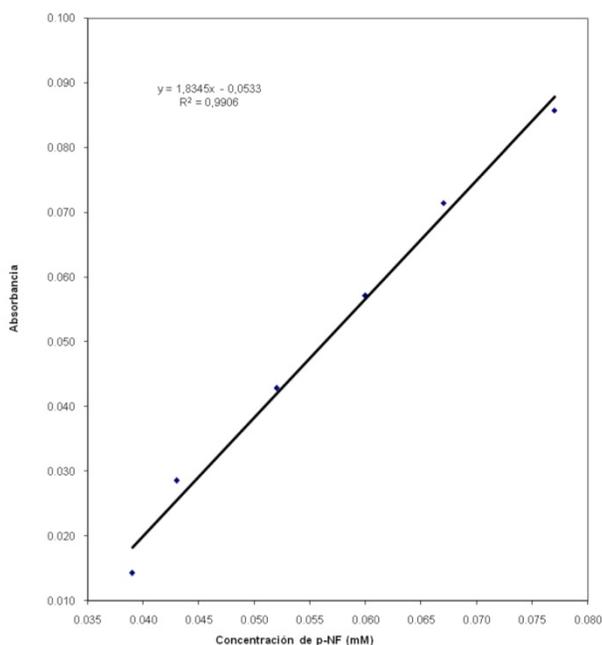
### G. Determinación de la actividad de fosfatasa

En la Tabla 4 y en la Figura 8 se muestra la curva de calibración que midió la absorbancia de p-NF a diferentes concentraciones. De los ensayos realizados a diferentes valores de pH, para evidenciar actividad de fosfatasa en las proteínas obtenidas del extracto del micelio, no se observó actividad a los pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0.

**Tabla 4. Medidas espectrofotométricas de la concentración de p-NF**

Absorbancia	p-NF (mM)
0,039	0,014
0,043	0,029
0,052	0,043
0,060	0,057
0,067	0,071
0,077	0,086

**Figura 8. Curva estándar para la determinación de la actividad de fosfatasas**



## IV. DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas en el estudio de las alergias producidas por hongos es la variación antigénica que presentan, en relación con las condiciones de crecimiento, la temperatura, el pH, la concentración de nitrógeno, los carbohidratos y los medios de cultivo utilizados para su crecimiento (Dales et al, 2000)

*Cladosporium* spp se ha aislado con mayor frecuencia en el medio ambiente del perímetro urbano de la ciudad de

Cali y, de acuerdo con una comunicación verbal, es uno de los hongos que causa más problemas de alergias en esta ciudad (Caicedo, Díaz, Henao, & Ocampo, 2002).

De los extractos del hongo, solo se obtuvieron proteínas en el extracto del micelio, lo que puede indicar que el hongo no excretó proteínas en el medio de cultivo o estas se degradaron al estar expuestas a la temperatura ambiente por un largo periodo de tiempo.

La curva estándar para la cuantificación del extracto fúngico obtenido del micelio, muestra un coeficiente de determinación de 98.51%; este coeficiente es relativamente alto y por lo tanto se considera ideal, de ahí, el valor obtenido de 5.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la muestra del micelio es confiable (Montgomery, Peck, & Vining, 2006).

En la determinación de P.M. relativos para las P.E. se obtuvo un  $R^2 = 0.9821$  lo que indica que  $r_f$  explica en un 98.21% la variable Log P.E. De acuerdo con lo anterior, los P.M. relativos obtenidos para las proteínas en el extracto del micelio son confiables en este porcentaje y el resto de la variabilidad que influye en la determinación de estos pesos se le atribuye al error "e" que es de 1.79% (Montgomery, Peck, & Vining, 2006).

La SDS-PAGE confirmó la presencia de proteínas en el extracto del micelio de la cepa de *Cladosporium* sp. con P.M. de 11 a 74 kDa, comparables con los resultados obtenidos en una investigación similar de 34 a 79 kDa. Esto permite sugerir que en el extracto del micelio se encontraron bandas de proteínas con P.M, similares a las reportadas en otros trabajos (Horner, Helbling, Salvaggio, & Lehrer, 1995; Al-Suwaine, Bahkali, & Hasnain, 1999; Bisht, Kukreja, Singh, Arora, & Sridhara, 2003; Belmonte, Gómez, & Torres, 2005; Viswanath & Banerjee, 2000).

Se encontraron pequeñas diferencias en la expresión de ciertas bandas de proteínas, lo que podría sugerir una variación en la liberación de antígenos, lo cual depende de la cepa aislada y de las condiciones fisicoquímicas o biológicas presentes en el ambiente donde se aisló el hongo.

Las bandas de proteínas con P.M. de 11, 13, 22, 48 y 53 kDa, son descritas en otros trabajos como antígenos alergénicos purificados y caracterizados de *Cladosporium Herbarum*, entre los que se encuentran: dos alérgenos mayores, Cla h 1, un alérgeno ácido de 13 kDa que ocasiona el mayor número de sensibilizaciones; más del 60% de los pacientes alérgicos a *C. herbarum* reaccionan con él y Cla h 2, una glucoproteína de 20 a 22 kDa.

Además de Cla h 3, un aldehído deshidrogenasa de 53 kDa; Cla h 4, una proteína ácida ribosomal de 11 kDa; Cla h 5, una proteína de 22 kDa; y Cla h 6 una enolasa de 48 kDa (Horner, Helbling, Salvaggio & Lehrer, 1995; Al-Suwaine, Bahkali, & Hasnain, 1999; Bisht, Singh, Arora & Sridhara, 2003; Belmonte, Gómez, & Torres 2005; Viswanath & Banerjee, 2000). Se han realizado trabajos específicos en los que se ha aislado una proteína de 18 kDa, un inhibidor de  $\alpha$ -amilasa, de gran importancia como agente terapéutico y dietético, altamente específico para  $\alpha$ -amilasas de mamíferos (Saito, 1982).

Además de las bandas de proteínas descritas en la literatura como alergénicas, se obtuvo bandas de proteínas cuyos P.M. no se encuentran aún reportados. Estas bandas, al hacer parte del contenido proteico presente en el extracto, podrían ser consideradas como antígenos en un tratamiento específico de sensibilización.

Los ensayos de actividad proteolítica, mostraron que el efecto del pH es una variable importante para la estabilidad de las proteínas. En los ensayos realizados, se demostró dicha actividad a pH 6.0, 7.0 y 8.0, mientras que fue negativa a pH 5.0 y 9.0, lo que indica que el extracto del micelio contiene proteínas proteolíticas cuya actividad depende del pH del medio en el cual se encuentren, es decir, que además de participar en procesos de adhesión, penetración e interacción con el sistema inmunológico, degradan otras proteínas. Este factor se debe tener en cuenta en todo proceso de extracción, con el fin de garantizar que los extractos obtenidos sean estables y constantes en su composición (Ardusso, 2002; Monod, Capoccia, Léchenne, Zaugg, Holdom, & Jousson, 2002).

Para la determinación de la actividad de fosfatasa se obtuvo un  $R^2 = 0.9906$ , lo que indica que la concentración de p-NF explica en un 99.06% la absorbancia y el porcentaje restante 0.94% se debe a los distintos factores que no se pueden controlar, por lo que se le atribuye al error. Sin embargo, la ausencia de actividad de fosfatasa de las proteínas obtenidas del extracto del micelio, tanto en el rango ácido como en el alcalino, muestran que dichas proteínas no hacen parte del contenido proteico presente en el extracto (Montgomery, Peck, & Vining, 2006).

Este es el primer trabajo en Cali, que permitió caracterizar los extractos de una cepa de *Cladosporium spp.*, aislada en esta ciudad. Se encontraron diferencias con cepas estudiadas en otras partes del mundo, a pesar de seguir el mismo protocolo para la separación y

caracterización de las proteínas antigénicas de este hongo.

Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en otras investigaciones. Se espera continuar con otros estudios que permitan caracterizar los componentes alergénicos de especies de este hongo, que es, como se indicó, el más prevalente en el ambiente de esta ciudad (Al-Suwaine, Bahkali, & Hasnain, 1999; Caicedo, Díaz, Henao, Ocampo, 2002).

## V. CONCLUSIONES

En el extracto del micelio se obtuvo un valor 5.88  $\mu\text{g/mL}$ , en la cuantificación de proteínas, con una confiabilidad del 98.51%, mientras que en el extracto acuoso no se encontraron proteínas.

Las proteínas obtenidas del extracto del micelio de *Cladosporium sp.* muestran componentes con distinto peso molecular y diferente movilidad relativa, que son electroforéticamente separables.

Los componentes proteicos obtenidos en el extracto del micelio poseen P.M. calculados de 74, 67, 55, 50, 48, 39, 36, 34, 30, 28, 22, 19, 17, 13, 12 y 11 kDa, con una confiabilidad del 98.21%.

Algunos de los componentes proteicos del presente trabajo, con P.M. de 11, 13, 22, 48 y 53 kDa, aparecen descritos en otros trabajos como antígenos alergénicos purificados y caracterizados de *Cladosporium herbarum*.

El rango de bandas de las proteínas obtenidas del extracto del micelio, entre 11 y 74 kDa, comparado con el reportado en un estudio similar, entre 34 y 79 kDa, indica la importancia de un patrón electroforético definido en el momento de establecer diferencias y semejanzas sobre la existencia o ausencia de una proteína liberada.

Las bandas de proteínas reportadas en el presente trabajo cuyos P.M. no se encuentran reportados en la literatura, podrían ser consideradas como antígenos en un tratamiento específico de sensibilización.

Las proteínas obtenidas del extracto del micelio muestran actividad de proteasa a valores de pH entre 6 y 8, lo cual sugiere que para que los antígenos permanezcan viables y estables, se debe tener un adecuado control en los niveles de pH.

Las proteínas obtenidas del extracto del micelio, no muestran actividad de fosfatasa ácida, ni alcalina. La ausencia de componentes proteicos en el extracto acuoso,

puede inducir que las proteínas secretadas por el hongo en este medio son susceptibles de degradación, en especial si se comparan con el extracto del micelio que tiene actividad proteolítica.

Los procedimientos utilizados en la obtención de extractos antigénicos deben ser objeto de una adecuada estandarización, con el fin de garantizar que sean estables y constantes en su composición.

## VI. REFERENCIAS

- Al-Suwaine, A S., Bahkali, A H., & Hasnain, S M. (1999). Seasonal incidence of airborne fungal allergens in Riyadh, Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 145(1), 15-22
- Al-Suwaine, A S., Bahkali, A H., & Hasnain, S M. (2001). Airborne viable fungi in Riyadh and allergenic response of their extracts. *Mycoses*, 44(9-10), 401-406
- Arduoso, LRF. (2002). Alérgenos. Características que deben presentar para realizar pruebas cutáneas de lectura inmediata. *Archivos de alergia e inmunología clínica*, 33(2), 543-550
- Bisht, V., Arora, N., Singh, B P., Gaur, S.N., & Sridhara, S (2004). Purification and characterization of a major cross-reactive allergen from *Epicoccum purpurascens*. *International Archives of Allergy Immunology*, 133(3), 217-224
- Bisht, V., Kukreja, N., Singh, B., Arora, N., & Sridhara S. (2003). Current Status of Fungal Allergens. *Indian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 17(1), 9-19
- Braun, R., Kinkl, N., Zischka, H., & Ueffing, M (2008). 16-BAC/SDS-PAGE analysis of membrane proteins of yeast mitochondria purified by free flow electrophoresis. En M.J. Peirce & R. Wait (Eds.), *Membrane proteomics: Methods in biomolecular biology*, Vol. 528, (pp. 83-107). New York, NY: Humana Press / Springer
- Caicedo, L.D., Díaz, M.H., Henao, J.V, & Ocampo, G. (2002). Hongos ambientales del perímetro urbano de Santiago de Cali Colombia [ponencia en XXXVII congreso nacional de ciencias biológicas. Universidad de Nariño-Asociación de Ciencias Biológicas]
- Dales, R.E., Cakmak, S., Burnett, R.T., Judek, S., Coates, F., & Brook, J.R. (2000). Influence of ambient fungal spores on emergency visits for asthma to a regional children's hospital. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 162(6), 2087-2090
- Das, S., & Gupta-Bhattacharya, S. (2008). Enumerating outdoor aeromycota in suburban West Bengal, India, with reference to respiratory allergy and meteorological factors. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 15(1), 105-112
- Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., & Bartley, R. (2007). *Descriptions Of Medical Fungi*. Adelaide, Australia: Universidad de Adelaide
- García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida Fundamentos actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-41
- Gómez, A., Zarante, I., Martínez, J.C., Valdivieso, M.A., Rubio, L.L., Tarazona, G.P., & Sánchez-Medina, M. (2005). Evaluación de alérgenos presentes en polvo y ambiente de algunas bibliotecas de Bogotá, D.C. *Universitas Médica*, 46(1), 13-20
- Gómez-Guiñan, Y. (2004). Actividad de las fosfatasa ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizosfera de *Arachis hypogaea* (Papilionaceae). *Revista de Biología Tropical*, 52(1), 287-295
- Grier, T.J., LeFevre, D.M., Duncan, E.A., Esch, R.E., & Coyne, T.C. (2012). Allergen stabilities and compatibilities in mixtures of high-protease fungal and insect extracts. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 108(6), 439-447
- Hall, A.G. & de Shazo, R.D. (2012). Immunotherapy for allergic fungal sinusitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(6), 629 -634
- Harlow, E. & Lane, D. (1988). *Antibodies a laboratory manual. Protein Quantitation by Lowry*. New York, NY: Cold Spring Harbor
- Hasnain, S.M., Akhter, T., & Waqar, M.A. (2012). Airborne and allergenic fungal spores of the Karachi environment and their correlation with meteorological factors. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(3), 1006-1013
- Hoog, G.S., de Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M.J. (2011). *Atlas of Clinical Fungi* (3a ed.) [CD]. Washington DC: American Society for Microbiology
- Horner, W.E., Helbling, A., Salvaggio, J.E., & Lehrer, S.B. (1995). Fungal allergens. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(2), 161-179
- Larone, D. (2011). *Medical important fungi a guide to identification* (5a ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology
- Meng, J., Barnes, C.S., Rosenwasser, L.J. (2012). Identity of the fungal species present in the homes of asthmatic children. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(10), 1448-1458
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., & Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(5-6), 405-419
- Montgomery, D., Peck, E., & Vining, G. (2006). *Introducción al análisis de regresión lineal* (3a ed.). México D.F., México: Continental
- Naegele, A., Reboux, G., Scherer, E., Roussel, S., & Millon, L. (2013). Fungal food choices of dermatophagoides farinae affect indoor fungi selection and dispersal. *International Journal of Environmental Health Research*, 23(2), 91-95
- Nosanchuk, J.D., & Taborda, C. (2013). Vaccines and immunotherapy against fungi: the new frontier. *Frontiers in Microbiology*, 4(6) [en línea]. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554959/>
- Saito, N. (1982). Amylase inhibitor from fungus *cladosporium herbarum* F-828. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 3120-3125
- Shah, R., & Grammer, L. C. (2012). Chapter 1: an overview of allergens. *Allergy Asthma Proceedings*, 33(1), 2-5
- Viswanath, P.K., Shen, H.D, & Banerjee, B. (2000). Respiratory fungal allergy. *Microbes and Infection*, 2(9), 1101-1110

## CURRÍCULOS

*José Iván Rengifo Ramos*. Tecnólogo Químico de la Universidad del Valle (Cali, Colombia); Químico de la Universidad Santiago de Cali [USC]; Especialista en Higiene y Seguridad Industrial (Universidad Autónoma de Occidente, Cali); y Magister en Educación Ambiental y Desarrollo Sostenible. Se desempeña como laboratorista en la Universidad del Valle.

*Flavio Cerón*. Biólogo Molecular de la Universidad del Valle (Cali, Colombia, 1995). Al momento de esta investigación trabajaba con en el Laboratorio de Biología Molecular de Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Actualmente forma parte del grupo de investigadores del Centro de investigación en anomalías congénitas y enfermedades raras [CIACER], de la Universidad Icesi (Cali, Colombia)

*Luz Dary Caicedo Bejarano*. Licenciada en Ciencias de la Educación (USC, 1986); Magister en Microbiología (Universidad del Valle, 1995); Especialista en Docencia para la Educación superior (USC, 2001); y estudiante de Maestría en Micología Médica de la Universidad Nacional del Nordeste [UNNE] (Argentina). Trabaja con el Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle en el área de Micología Médica. Es docente hora cátedra y directora del Grupo de Investigación en Micología de la USC. Su línea de investigación en la UNNE es *Diagnóstico de micosis sistémicas oportunistas*.