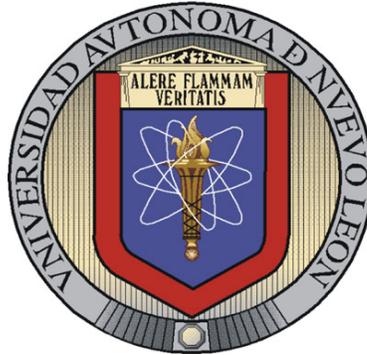


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PAPEL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA
VIRULENCIA DE *Nocardia brasiliensis***

Por:

M. en C. MC. IGOR ISRAEL MEDINA VILLANUEVA

**Como requisito parcial para obtener el
Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con orientación en Inmunología**

2008

**PAPEL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA
VIRULENCIA DE *Nocardia brasiliensis***

Aprobación de la Tesis:



DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Director de la Tesis



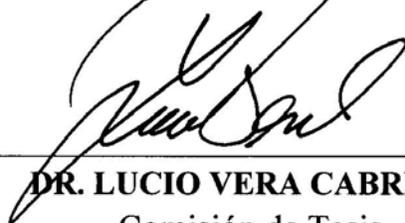
DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Comisión de Tesis



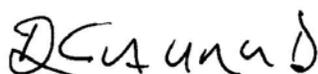
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis



DR. JUAN MANUEL SOLÍS SOTO
Comisión de Tesis



DR. LUCIO VERA CABRERA
Comisión de Tesis

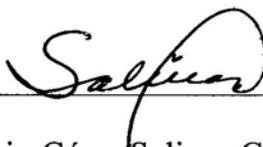


DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

PAPEL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA VIRULENCIA DE *Nocardia brasiliensis*

Presentado por: M. en C. MC. Igor Israel Medina Villanueva

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona con el apoyo del PAICYT SA-1465-06.



Dr. Mario César Salinas Carmona

Asesor doctoral

DEDICATORIA

A mis PADRES:

Elmer y Vilma por todo el amor y apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mi TÍA:

Lupita por su apoyo, comprensión y cariño desde siempre.

A mi ABUELA:

Vilma por siempre tenerme presente y quererme mucho.

A mi FAMILIA:

Porque siempre me han estimulado a seguir adelante.

A mi AMIGO:

Eric por su apoyo y esos grandes momentos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por su confianza y apoyo, pero sobretodo, por enseñarme Inmunología.

A la Dra. Agnès Revol por sus sabias recomendaciones y puntos de vista, aun en la distancia.

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza por todo su apoyo y colaboración para la realización de este proyecto.

A la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez por brindarme su apoyo en momentos difíciles.

Al Dr. Lucio Vera Cabrera y al Dr. Juan Manuel Solís Soto por sus valiosas recomendaciones y sugerencias.

A mis profesores: Dra. María de los Ángeles Castro Corona, Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza y Dra. Luz Isabel Pérez Rivera.

A Lulú y July por brindarme su amistad y todos esos momentos realmente inolvidables.

A mis compañeros de generación: Mary, Humberto, Adrián, Maricela, Pily, Marisol y Lupita.

A todo el personal del Departamento de Inmunología por las facilidades para la elaboración de la tesis.

A Aracely y Lizzy por todas sus atenciones.

Al Dr. Jun Ishikawa (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) por facilitarme los vectores de *Nocardia*.

A Iram por su auxilio en las secuenciaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al PAICYT por el apoyo financiero para el estudio.

CONTENIDO GENERAL

	Página
Portada	i
Aprobación de tesis.....	ii
Lugar de trabajo	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Contenido general.....	vi
Lista de figuras.....	xiv
Lista de tablas	xviii
Lista de cuadros	xix
Abreviaturas.....	xx
Resumen.....	xxiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 El género <i>Nocardia</i>	5
2.1.1 Taxonomía.....	5
2.1.2 Características básicas de <i>Nocardia sp.</i>	6
2.1.3 Especies patógenas de <i>Nocardia</i>	7
2.2 <i>Nocardia brasiliensis</i>	8
2.2.1 Características de <i>N. brasiliensis</i>	8
2.2.2 Factores de virulencia de <i>N. brasiliensis</i>	9

2.3 Micetoma eumicetómico y actinomicetómico.....	11
2.3.1 Descubrimiento del micetoma.....	11
2.3.2 Características del micetoma.....	12
2.3.3 Epidemiología del micetoma.....	14
2.4 Actinomicetoma experimental en ratones.....	14
2.5 Mecanismo de defensa del huésped contra el actinomicetoma.....	16
2.5.1 Respuesta inmune innata.....	16
2.5.2 Respuesta inmune celular.....	18
2.5.3 Respuesta inmune humoral.....	20
2.5.4 Papel de las citocinas.....	22
2.6 Estallido respiratorio.....	23
2.7 Superóxido dismutasa.....	27
2.7.1 Características generales.....	27
2.7.2 Regulación de la expresión de SOD.....	29
2.7.3 SOD como factor de virulencia microbiana.....	30
2.7.4 Papel de la SOD en la patogenicidad de <i>N. brasiliensis</i>	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo general.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1 MATERIALES.....	37
6.1.1 Lugar de trabajo.....	37
6.1.2 Biológicos.....	37
6.1.2.1 Cepas bacterianas.....	37
6.1.2.2 Vectores.....	38
6.1.2.3 Animales de experimentación.....	38
6.1.3 Reactivos.....	39
6.1.4 Equipo.....	39
6.1.5 Software.....	41
6.2 MÉTODOS.....	42
6.2.1 Cultivos bacterianos.....	42
6.2.1.1 Cultivo y almacenaje estándar de <i>N. brasiliensis</i>	42
6.2.1.2 Cultivo y almacenaje estándar de <i>E. coli</i>	43
6.2.1.3 Obtención de <i>E. coli</i> calcio-competente.	43
6.2.1.4 Obtención de <i>N. brasiliensis</i> electro-competente.....	44
6.2.1.5 Cultivo de <i>N. brasiliensis</i> con sales metálicas.....	45
6.2.2 Determinación de la actividad SOD de <i>N. brasiliensis</i>	46
6.2.2.1 Obtención del extracto celular crudo de <i>N. brasiliensis</i>	46
6.2.2.2 Obtención de los extractos soluble y membranoso de <i>N. brasiliensis</i>	47
6.2.2.3 Obtención del filtrado de medio de cultivo de <i>N. brasiliensis</i>	48

6.2.2.4	Visualización de la actividad SOD de <i>N. brasiliensis</i>	49
6.2.2.5	Inhibición de la actividad SOD de <i>N. brasiliensis</i>	50
6.2.2.6	Cuantificación de la actividad SOD de <i>N. brasiliensis</i>	50
6.2.3	Clonación molecular del gen <i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i>	51
6.2.3.1	Extracción de ADN genómico de <i>N. brasiliensis</i>	51
6.2.3.2	Diseño de los iniciadores de amplificación.....	52
6.2.3.3	Amplificación del gen <i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i>	53
6.2.3.4	Obtención de la clona pZSAorf con el gen <i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i>	53
6.2.3.5	Caracterización del vector pZSAorf.....	54
6.2.3.6	Análisis in silico de la secuencia del gen <i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i>	54
6.2.4	Generación de <i>N. brasiliensis sodA</i> ⁻	55
6.2.4.1	Estrategia general.....	55
6.2.4.2	Construcción del vector de integración con resistencia a tetraciclina (<i>tet</i> ^R).....	56
6.2.4.2.1	Amplificación del gen de resistencia a tetraciclina.....	56
6.2.4.2.2	Obtención del vector de integración con resistencia a tetraciclina.....	56
6.2.4.3	Construcción del vector con <i>sodA</i> antisentido con resistencia a tetraciclina.....	57
6.2.4.4	Obtención del vector de replicación autónoma con resistencia	

a gentamicina (gn^R).....	58
6.2.4.5 Construcción del vector de integración con resistencia	
a gentamicina.....	58
6.2.4.5.1 Amplificación del gen de resistencia a gentamicina.....	58
6.2.4.5.2 Obtención del vector de integración con resistencia a	
gentamicina.....	59
6.2.4.6 Construcción del vector con <i>sodA</i> antisentido con resistencia	
a gentamicina.....	59
6.2.4.7 Transformación de <i>N. brasiliensis</i>	59
6.2.4.8 Extracción de ADN plasmídico de <i>N. brasiliensis</i>	61
6.2.5 Producción de SodA recombinante (rSodA) de <i>N. brasiliensis</i>	61
6.2.5.1 Obtención del vector de expresión de rSodA (pSANBex).....	61
6.2.5.2 Ensayo piloto para la expresión de rSodA.....	62
6.2.5.3 Expresión de rSodA en condiciones optimizadas.....	63
6.2.5.4 Determinación de la expresión de rSodA.....	64
6.2.5.4.1 Obtención de los extractos soluble y no soluble de	
<i>E. coli</i> productora de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	64
6.2.5.4.2 Western blot anti-His de los extractos soluble y	
no soluble.....	65
6.2.5.5 Aislamiento de los cuerpos de inclusión de rSodA.....	66
6.2.5.6 Purificación de rSodA con resina de níquel.....	66
6.2.6 Inmunogenicidad de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	67

6.2.6.1 Estrategia general.....	67
6.2.6.2 Inmunogenicidad de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	67
6.2.6.2.1 Obtención de los sueros hiperinmunes anti-rSodA.....	67
6.2.6.2.2 Western blot anti-rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	68
6.2.6.2.3 Obtención de los sueros hiperinmunes anti- <i>N. brasiliensis</i> ...	69
6.2.6.2.4 Western blot anti- <i>N. brasiliensis</i>	69
6.2.7 Inducción de protección anti-micetoma por la rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	69
6.2.7.1 Estrategia general.....	69
6.2.7.2 Esquema general de inmunización e infección.....	70
6.2.7.3 Preparación de los inmunógenos.....	71
6.2.7.4 Infección con <i>N. brasiliensis</i> en ratones.....	72
6.2.7.5 Obtención de los sueros.....	73
6.2.7.6 Medición de las lesiones plantares.....	73
6.2.7.7 Determinación de los títulos de anticuerpos.....	73
6.2.8 Análisis estadístico.....	74
7. RESULTADOS	76
7.1 Actividad SOD de <i>N. brasiliensis</i>	76
7.1.1 Actividad SOD en fases de crecimiento logarítmica y estacionaria....	76
7.1.2 Actividad SOD en los extractos crudos soluble y membranoso.....	78
7.1.3 Actividad SOD en cultivos incubados con sales metálicas.....	78
7.1.4 Actividad SOD en extractos incubados con calor.....	80

7.1.5 Actividad SOD en extractos incubados con inhibidores.....	81
7.2 Clonación del gen <i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i>	83
7.2.1 Amplificación del gen <i>sodA</i>	83
7.2.2 Clonación de <i>sodA</i> en el vector de clonación pZErO-2.....	84
7.3 Análisis de secuencia de SodA de <i>N. brasiliensis</i>	85
7.3.1 Análisis nucleotídico.....	85
7.3.2 Análisis aminoacídico.....	86
7.3.3 Análisis <i>in silico</i>	86
7.4 Generación de <i>N. brasiliensis sodA</i> ⁻	89
7.4.1 Amplificación del gen de resistencia a tetraciclina (<i>tet</i> ^R).....	89
7.4.2 Construcción del vector de integración con resistencia a tetraciclina.....	90
7.4.3 Construcción del vector con <i>sodA</i> antisentido con resistencia a tetracilina.....	91
7.4.4 Construcción del vector de replicación autónoma con resistencia a gentamicina (<i>gn</i> ^R).....	92
7.4.5 Construcción de los vectores de integración y <i>sodA</i> antisentido con resistencia a gentamicina.....	93
7.4.6 Transformación de <i>N. brasiliensis</i> con los vectores con resistencia a tetraciclina.....	93
7.4.7 Transformación de <i>N. brasiliensis</i> con el vector con resistencia a gentamicina.....	93

7.5 Expresión de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	95
7.5.1 Clonación de <i>sodA</i> en vector de expresión.....	95
7.5.2 Condiciones de cultivo de la cepa productora de rSodA.....	96
7.5.3 Determinación de la expresión de rSodA.....	97
7.5.4 Inmunogenicidad de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	99
7.5.5 Inmunogenicidad de SodA nativa de <i>N. brasiliensis</i>	100
7.6 Inducción de protección anti-actinomicetoma por rSodA de	
<i>N. brasiliensis</i>	101
7.6.1 Inducción de protección anti-micetoma por la rSodA de	
<i>N. brasiliensis</i>	101
7.6.2 Titulación de anticuerpos anti-rSodA y anti- <i>N. brasiliensis</i>	105
8. DISCUSIÓN	115
9. CONCLUSIONES	128
10. PERSPECTIVAS	129
REFERENCIAS.....	130
APÉNDICES.....	139
APÉNDICE A.....	140
APÉNDICE B.....	141

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 5-1. Esquema general de inmunización e infección.....	71
Figura 7-1. Ensayo piloto de actividad SOD.....	77
Figura 7-2. Actividad SOD en los extractos de <i>N. brasiliensis</i>	77
Figura 7-3. Actividad SOD de las fases soluble y membranosa de los extractos crudos de <i>N. brasiliensis</i>	78
Figura 7-4. Actividad SOD en gel de extractos crudos de <i>N. brasiliensis</i> incubadas con sales metálicas.....	79
Figura 7-5. Cuantificación de la actividad SOD en extractos crudos de <i>N. brasiliensis</i> incubadas con sales metálicas.....	80
Figura 7-6. Actividad SOD en filtrado de cultivo de <i>N. brasiliensis</i> incubado con calor.....	81
Figura 7-7. Actividad SOD en filtrado de cultivo de <i>N. brasiliensis</i> incubado con inhibidores.....	82
Figura 7-8. Caracterización enzimática del amplicón <i>sodA</i>	84
Figura 7-9. Caracterización enzimática del plásmido pZSAorf.....	84
Figura 7-10. Alineamiento aminoacídico de SodA.....	87
Figura 7-11. Esquema del vector de integración con resistencia a tetraciclina pNbrSAT.....	90

Figura 7-12. Caracterización enzimática de los vectores pZTET y pNbrSAT.....	90
Figura 7-13. Esquema del vector sodA antisentido con resistencia a tetraciclina pVASAT.....	91
Figura 7-14. Caracterización enzimática del vector pVASAT.....	91
Figura 7-15. Esquema del vector con resistencia a gentamicina pRUAL.....	92
Figura 7-16. Caracterización enzimática del vector pRUAL.....	92
Figura 7-17. Amplicones del gen gnR en <i>N. brasiliensis</i> transformadas con pRUAL.....	95
Figura 7-18. Construcción del vector pSANBex productor de SodA recombinante de <i>N. brasiliensis</i>	96
Figura 7-19. Western blot anti-His para evidenciar la expresión de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	97
Figura 7-20. Purificación de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	98
Figura 7-21. Actividad SOD en extractos de <i>E. coli</i> productora de rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	98
Figura 7-22. Western blot anti-rSodA de <i>N. brasiliensis</i>	99
Figura 7-23. Western blot anti- <i>N. brasiliensis</i>	100
Figura 7-24. Desarrollo del actinomicetoma en ratones infectados al día 7 post-inmunización.....	102
Figura 7-25. Desarrollo del actinomicetoma en ratones infectados al día 15 post-inmunización.....	103

Figura 7-26. Desarrollo del actinomicetoma en ratones infectados al día 21 post-inmunización.....	104
Figura 7-27. Desarrollo del actinomicetoma en ratones infectados al día 30 post-inmunización.....	105
Figura 7-28. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 7 post-inmunización.....	106
Figura 7-29. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los ratones infectados al día 7 post-inmunización.....	107
Figura 7-30. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 15 post-inmunización.....	108
Figura 7-31. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los ratones infectados al día 15 post-inmunización.....	109
Figura 7-32. Títulos de anticuerpos anti-Nbr del tipo IgG de los ratones infectados al día 15 post-inmunización.....	109
Figura 7-33. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 21 post-inmunización.....	111
Figura 7-34. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los ratones infectados al día 21 post-inmunización.....	111
Figura 7-35. Títulos de anticuerpos anti-Nbr del tipo IgG de los ratones infectados al día 21 post-inmunización.....	112
Figura 7-36. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 30 post-inmunización.....	113

Figura 7-37. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los
ratones infectados al día 30 post-inmunización.....114

Figura 7-38. Títulos de anticuerpos anti-Nbr del tipo IgG de los
ratones infectados al día 30 post-inmunización.....114

LISTA DE TABLAS

Tabla 7-1. Condiciones de PCR para la amplificación de <i>sodA</i> de <i>Nocardia brasiliensis</i>	83
Tabla 7-2. Homología del gen <i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i> con el de especies relacionadas.	85
Tabla 7-3. Condiciones de PCR para la amplificación de <i>tet^R</i>	89
Tabla 7-4. Condiciones de transformación de <i>N. brasiliensis</i> con el vector pRUAL.....	94
Tabla 7-5. Condiciones de PCR para la amplificación de <i>gn^R</i>	94

LISTA DE CUADROS

Cuadro 7-1. Resultados de predicción *in silico* del programa pSORTb. 88

Cuadro 7-2. Resultados de predicción *in silico* del programa SecretomeP. 88

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
ASB	Albúmina sérica bovina
BHI	Medio de infusión cerebro-corazón
BMC	Bacterias muertas por calor
cbp	Cuanto baste para
cm	Centímetro (s)
°C	Grados centígrados
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
ECC	Extracto crudo celular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FMC	Filtrado de medio de cultivo
g	Gramos
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
h	Hora (s)
IFN	Interferón

IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IL	Interleucina
KAT	Catalasa
kDa	Kilodaltones
Kpb	Kilopares de bases
kV	Kilovoltios
L	Litros
LB	Medio Luria-Bertani
M	Concentración molar
M9CA	Medio de sales mínimo con casaminoácidos
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
μg	Microgramo (s)
μL	Microlitro (s)
μM	Concentración micromolar
NADPH	Nicotinamida-Adenina dinucleótido fosfato

ng	Nanogramo (s)
nm	Nanómetro (s)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos
PBST	Amortiguador de fosfatos más Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	$-\log[H^+]$
PMN	Célula polimorfonuclear
PMSF	Fluoruro de sulfonilmetilfenilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
rSod	Superóxido dismutasa recombinante
s	Segundo (s)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TEMED	N,N,N',N' - tetrametilendiamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Unidades internacionales de enzima
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

V	Voltios
X	Número de veces concentrado

RESUMEN

Igor Israel Medina Villanueva

Obtención de Grado: Julio, 2008

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: **PAPEL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA VIRULENCIA DE *Nocardia brasiliensis***

Número de páginas: 142

Candidato para el grado de Doctorado
en Ciencias con Orientación en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que juega un papel fundamental en la patogenicidad de muchos microorganismos. En este estudio se investigó el papel de la SOD en el desarrollo del actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. Se determinaron la actividad y principales características de la SodA de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358). El gen *sodA* fue clonado, secuenciado y expresado en *E. coli*. Se estudió la inmunogenicidad de la proteína recombinante (rSodA) en ratones BALB/c. Se realizaron ensayos de inmunización activa con rSodA en ratones para determinar su capacidad inductora de protección contra el establecimiento del actinomicetoma, cuando los animales fueron infectados con la bacteria. También se determinaron los niveles de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM e IgG durante la evolución de las lesiones.

Contribuciones y Conclusiones: Se evidenció la presencia de solamente una actividad SOD en *N. brasiliensis*, correspondiente al tipo A. La enzima es muy estable y se encuentra tanto en el extracto celular como en el medio de cultivo. La secuencia de la proteína (207 aa) mostró alta homología con otras del género *Nocardia*. La conservación de dominios apoya la asociación de la enzima con hierro y manganeso como grupos prostéticos. Tanto la SodA propia como la rSodA de *N. brasiliensis* resultaron con capacidad inmunogénica en ratones. La inmunización activa con rSodA protegió a los ratones contra el establecimiento del micetoma cuando estos fueron infectados a los 15, 21 ó 30 días post-inmunización, pero no a aquellos infectados al día 7. Se encontró una correlación significativa entre los niveles de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG al día de la infección y la protección anti-micetoma. Estos hallazgos sugieren que la SodA de *N. brasiliensis* juega un papel importante en la virulencia bacteriana.

Firma del Asesor:


Dr. Mario César Salinas Carmona

A PAME†

In memoriam

“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente...Preguntaos primero; ¿Qué he hecho por instruirme? Y después, a medida que vayáis progresando: ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis tener la íntima satisfacción de pensar en que habéis contribuido de alguna manera al progreso y al bienestar de la humanidad”.

Discurso de Louis Pasteur a los jóvenes estudiantes.
Paul de Kruif (1890-1971)

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos intracelulares han representado desde siempre un problema de salud para la humanidad, y no solo por los millones de vidas humanas que son afectadas cada año y por la carga económica que de ello resulta. Existen dos hechos notorios que dan a estos microbios una importancia trascendental. i) No se ha logrado la creación de vacunas eficaces para el control efectivo de las infecciones causadas por estos microorganismos, excepto por algunas obtenidas para ciertos virus. Para la gran mayoría de intracelulares: bacterias, protozoarios, levaduras, microorganismos intermedios (p.ej. *Rickettsia*) e incluso virus (importantemente VIH) todavía no se cuenta con métodos de protección eficaces. ii) Los mecanismos de patogenicidad y las interacciones microbio-huésped son mucho más complejas para los microorganismos intracelulares. Un claro ejemplo es el género *Mycobacterium*. Siendo un grupo de bacterias, por lo demás tal vez las más ampliamente estudiadas, ni se ha conseguido obtener una vacuna eficaz para las enfermedades que causan, ni se ha logrado establecer a ciencia cierta los mecanismos clave involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Por el contrario, han surgido cada vez más

interrogantes acerca de la manera en que estos microorganismos son capaces de evitar los mecanismos de defensa del huésped y causar enfermedad en ciertos casos, mientras que en otros permanecen latentes o incluso, nunca se manifiestan en patología evidente. Así, la literatura científica se encuentra plagada de un sinnúmero de *porqués* a los cuales tenemos respuesta parcial o nula. ¿Por qué solo un bajo porcentaje de individuos infectados desarrolla la enfermedad mientras que el resto nunca lo hace o la desarrolla años después? ¿Por qué la aparición de la enfermedad está asociada con la presencia de patologías aparentemente no relacionadas, p. ej. diabetes? ¿Por qué miembros del mismo género causan enfermedades tan distintas? Finalmente: ¿Por qué después de haber invertido tanto esfuerzo, tiempo, y dinero en su estudio siguen muriendo por su causa miles de personas en todo el mundo? ¿Por qué aún no se vislumbra vacuna alguna? He aquí el gran reto de los microorganismos intracelulares.

Interesantemente, *Nocardia brasiliensis* así como muchos otros microorganismos (*Rickettsia*, *Ehrlichia*), es una bacteria intracelular facultativa que es patógena para el ser humano sólo de manera accidental. El hombre no es su reservorio natural ni tampoco su huésped final. Es más, de manera similar a lo que ocurre con *M. tuberculosis*, solo un bajo porcentaje de individuos inoculados accidentalmente con la bacteria desarrolla la enfermedad. Esto es corroborado en los modelos experimentales de actinomicetoma en ratones, donde es necesario un inóculo bacteriano relativamente grande para la aparición de la enfermedad. De hecho, condiciones tales como la cepa bacteriana, la cepa de animal, el medio de

cultivo y la fase de crecimiento, entre otros, son capaces de condicionar el desarrollo del actinomicetoma en ratones. No hay reportes de que la enfermedad se produzca de manera natural en estos animales. Luego, los resultados de estudios en modelos experimentales de la enfermedad deben ser tomados con suma cautela a la hora de sacar conclusiones e implicaciones sobre la evolución de la misma en los seres humanos.

Aclarado aquel punto, surge la interrogante de por qué una bacteria que no ha evolucionado para desarrollarse en el hombre es capaz de producirle enfermedad. Definitivamente, *N. brasiliensis* no se encuentra dentro de la categoría de microorganismo oportunista, tal como lo demuestran los casos de micetoma en individuos con sistema inmune aparentemente competente. Entonces, ¿Qué sucede? ¿Posee la bacteria, de manera fortuita, todos los elementos necesarios y suficientes para causar la enfermedad *per se*? ¿Son los individuos de alguna manera susceptibles, los únicos que desarrollan la enfermedad? ¿Existe un fallo accidental en el sistema inmune del huésped o un fallo inducido por la bacteria? O planteado de otra manera, ¿Dirige el sistema inmune sus efectores para eliminar a la bacteria de una manera equivocada, o por el contrario, mantiene a la bacteria en una lesión localizada antes de permitir la muerte del huésped? En suma, ¿Es acaso una combinación de todas estas cosas?

Éstas son algunas de las interrogantes que nos hemos planteado en nuestro Departamento y a cuya búsqueda de respuestas hemos enfocado nuestros esfuerzos. En este contexto, un servidor quiere contribuir con el presente estudio

el cual se encuentra más relacionado hacia el lado del patógeno: Investigar el papel de la superóxido dismutasa de *N. brasiliensis* como uno de sus probables mecanismos de virulencia.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 El género *Nocardia*.

2.1.1 Taxonomía.

El género *Nocardia* fue introducido por Trevisan en 1889 en honor a Edmond Nocard quien realizó el primer reporte de una enfermedad producida por bacterias de este género (“*farcin du boeuf*”) cuando las aisló de lesiones granulomatosas en bovinos. *Nocardia farcinica*, como así se nombró a la bacteria causante de esta enfermedad, fue la especie prototipo del recién creado género *Nocardia* (Nocard, 1888; Trevisan, 1889; Beaman y Beaman, 1994). Roth *et al.* (2003) realizaron un estudio donde incluyen hasta 74 especies de nocardias, algunas agrupadas en taxones sin clasificar. No obstante, como ocurre con otros géneros bacterianos, el advenimiento de las herramientas de biología molecular ha supuesto un reordenamiento y descubrimiento de nuevas especies. De hecho, en la clasificación taxonómica de *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature* (<http://www.bacterio.cict.fr>) se mencionan 85 especies de *Nocardia* aceptadas oficialmente (Serrano *et al.*, 2007), mientras que el listado taxonómico del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) menciona más de 300, si

bien en este último caso, muchas entradas son producto de ambigüedades clasificatorias o de disparidades en las secuencias de ARN 16S.

El género se encuentra incluido dentro del orden de los *Actinomycetales* donde también se encuentran otros géneros importantes desde el punto de vista clínico, tales como *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, etc (Beaman y Beaman, 1994). Algunas especies de *Nocardia* no son patógenas para el hombre y otras incluso han sido utilizadas en diversas áreas productivas. Por ejemplo, dada su capacidad para la degradación de hidrocarburos, especies de *Nocardia* se utilizan en procesos de biorremediación de suelos y aguas contaminadas (Baek *et al.*, 2004, Benavides *et al.*, 2006). Sin embargo, algunas otras especies son consideradas patógenas para el hombre y son causantes de diversas enfermedades que se agrupan bajo el término médico de nocardiosis (Beaman y Beaman, 1994).

2.1.2 Características básicas de *Nocardia sp.*

Las especies de *Nocardia* son bacterias saprofitas del suelo, forman hifas aéreas que pueden fragmentarse en formas cocobacilares, son gram +, con alto contenido de GC en su genoma (64-72 %, aproximadamente). Estas bacterias son aerobios facultativos, catalasa positiva, la mayoría parcialmente ácido-alcohol resistentes y entre sus características quimiotaxonómicas se encuentran: pared celular tipo IV con contenido de ácido meso-diaminopimélico, pared celular con patrón de azúcares tipo A (arabinosa y galactosa) y residuos N-glicosilados,

presencia de ácidos micólicos de 46-60 átomos de carbono con tres dobles enlaces y con cadenas insaturadas (ácidos nocardiomicólicos). Además, estas especies poseen ácido tuberculoesteárico y menaquinonas, la mayoría son resistentes a la acción de la lisozima y algunas producen pigmentos, generalmente carotenoides (Beaman y Beaman, 1994; Serrano *et al.*, 2007).

2.1.3 Especies patógenas de *Nocardia*.

Como se mencionó, el término nocardiosis agrupa diversas entidades clínicas causadas por bacterias del género *Nocardia*. Las manifestaciones de la enfermedad son muy distintas dependiendo del microorganismo causal y de la vía de inoculación, entre otras variables. Además, el pronóstico y las complicaciones también son heterogéneos. El primer caso de infección por *Nocardia* en humanos fue descrito por Eppinger en 1890, quien aisló un microorganismo aerobio ramificado y filamentoso a partir de un absceso cerebral, llamándolo *Cladothrix asteroides*. Blanchard (1896) renombra esta bacteria como *Nocardia asteroides* seis años después y en 1981, Gordon propone a *Nocardia asteroides* como especie tipo para el género, lo cual fue oficialmente aceptado.

Beaman y Beaman (1994) han propuesto una clasificación de las nocardiosis humanas según su localización, reconociendo seis tipos básicos de nocardiosis:

1. Pulmonar
2. Sistémica
3. Sistema nervioso central

4. Extrapulmonar
5. Cutánea, subcutánea y linfocutánea
6. Actinomicetoma

Las especies más frecuentemente implicadas en patologías humanas son “*Nocardia asteroides*”, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia otitidiscaviarum* (*Nocardia caviae*), *Nocardia transvalensis*, entre otras (Beaman y Beaman, 1994; Saubolle y Sussland, 2003; Serrano *et al.*, 2007).

2.2 *Nocardia brasiliensis*.

2.2.1 Características de *N. brasiliensis*.

Nocardia brasiliensis pertenece al grupo morfológico III, es parcialmente ácido-alcohol resistente y había sido considerada una especie homogénea hasta que Wallace *et al.*, (1995) y Rodríguez-Nava *et al.*, (2004) describieron dos nuevos taxones derivados de ésta: *Nocardia pseudobrasiliensis* y *Nocardia mexicana*, respectivamente. Esta bacteria crece bien aunque lentamente en medios ricos como el Sabouraud y el BHI, en un rango de 10-45 °C y a un pH óptimo de 6.0-9.0, formando colonias granulares, con hifa aérea escasa, de color anaranjado pardo y blanco en los bordes. *Nocardia brasiliensis* es patógena para el ser humano ya que es el agente causal de un tipo de nocardiosis conocido como actinomicetoma (Serrano *et al.*, 2007).

2.2.2 Factores de virulencia de *N. brasiliensis*.

Es poco lo que se sabe acerca de los factores de virulencia del género *Nocardia* y especialmente, de *N. brasiliensis*. De manera similar a otros microorganismos intracelulares, estas bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir en el huésped, incluso dentro de las células fagocíticas, escapando al sistema inmunológico. Utilizando *Nocardia asteroides* como modelo experimental, Beaman y Beaman (1994) propusieron que los factores de virulencia y patogenicidad de *Nocardia* pueden ser muy parecidos a los reportados para el género *Mycobacterium*. Con base en experimentos realizados en *N. asteroides*, estos autores proponen algunos mecanismos que pudieran ser clave en la virulencia de *Nocardia* (Beaman y Beaman, 1994):

- a) Inhibición de la fusión del fagosoma-lisosoma: aunque los mecanismos de esta inhibición aun no están completamente claros, la presencia de α,α -trehalosa-6,6-dimicolato (TMC, “*cord factor*”) en la pared celular bacteriana podría contribuir en parte, tal como se ha demostrado que ocurre en *Mycobacterium tuberculosis* donde este componente también se encuentra presente.
- b) Bloqueo de la acidificación fagolisosomal: la respuesta normal de acidificación intrafagolisosomal (pH 5) que sigue a la ingestión de bacterias y otras partículas, se encuentra bloqueado en la infección con *Nocardia*. Este evento es independiente de la fusión fagosoma-lisosoma por lo que pudiera ser causado por las mismas sustancias que inhiben esta unión.

- c) Modulación del contenido y actividad fagolisosomal: La actividad de la fosfatasa ácida se encuentra disminuida en fagocitos infectados con *Nocardia*. Estos niveles bajos de fosfatasa parecen ser debidos a la preferencia que tiene esta bacteria para utilizar este compuesto como fuente de carbono durante su crecimiento dentro de los fagocitos. Este hecho junto con la inhibición de la acidificación del fagolisosoma, podrían jugar un papel importante en la supervivencia de la bacteria al bloquear la activación de los efectores microbicidas.
- d) Toxinas: La participación de ciertas exotoxinas en la virulencia de *Nocardia* parece ser específica de especie. Se ha reportado que la toxina HS-6 producida por ciertas cepas de *N. otitidiscaviarum* podría tener efectos significativos en la células del huésped durante la invasión bacteriana. También se ha reportado otro grupo de toxinas, del tipo hemolisinas, en diversas cepas de *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*. Estas hemolisinas son tóxicas en ratones y causan su muerte cuando son inyectadas por vía peritoneal. En *N. asteroides*, esta hemolisina se encuentra dentro de la pared celular mientras que en *N. otitidiscaviarum* es secretada al medio. El papel de esta toxina y el de algunos compuestos aislados recientemente en cepas de *N. brasiliensis* (brasilbactinas y brasilicardinas) en la patogénesis de *Nocardia* está aún por aclararse.
- e) Resistencia a la actividad microbicida oxidativa: La interacción de los fagocitos con la mayoría de los microorganismos resulta en el llamado

estallido respiratorio, en el cual se liberan hacia el fagolisosoma, metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno que causan eventualmente, la muerte del microorganismo. Enzimas tales como superóxido dismutasa y catalasa, son capaces de bloquear esta actividad microbicida mediante la eliminación de los metabolitos reactivos de oxígeno. Este tipo de resistencia ha sido reportada para diversos microorganismos, incluido *Nocardia*. En particular, se demostró que la resistencia de *N. asteroides* a la actividad microbicida dependiente de oxígeno de neutrófilos humanos, se correlaciona positivamente con sus actividades catalasa y superóxido dismutasa. Es más, la virulencia de la bacteria fue mayor cuando la infección se realizó con inóculos en la fase exponencial de crecimiento, justo cuando la producción de SOD se encontraba aumentada. Estos y otros hallazgos indican que la presencia de estas actividades enzimáticas representan un importante mecanismo para la supervivencia de *N. asteroides* durante la infección.

2.3 Micetoma eumicetómico y actinomicetómico.

2.3.1 Descubrimiento del micetoma.

La enfermedad conocida como micetoma fue descrita primeramente por Gill en 1842 en Madura, India (“pie de Madura”). En 1846, Godfrey reporta cuatro casos de una nueva enfermedad que nombre “*morbus tuberculosis pedis*”, rebautizada por Carter como “*mycetoma*” en 1860 considerando su etiología

fúngica. Más tarde, en 1913, Pinoy hace la descripción de micetomas causados por bacterias aeróbicas y establece una distinción entre micetomas causados por bacterias de los géneros *Actinomyces* y *Nocardia* a los cuales llamó actinomicetomas, de aquellos que eran causados por hongos verdaderos o eumicetomas. No obstante, las manifestaciones clínicas de ambos tipos de micetoma son muy similares, si bien el tratamiento será distinto según el caso (Hay *et al.*, 1992; Serrano *et al.*, 2007).

2.3.2 Características del micetoma.

Los micetomas son pseudotumores granulomatosos, generalmente fistulados causados por la proliferación de los agentes infecciosos en los tejidos. El desarrollo es lento, crónico y de carácter inflamatorio. La principal característica de la enfermedad es la formación de abscesos que se abren en la piel a través de fistulas, emergiendo como pus que contiene granos, que no son más que cúmulos de microcolonias del agente causal rodeadas de células inflamatorias. A nivel histológico, la lesión muestra infiltración por células PMN (neutrófilos) y mononucleares (linfocitos y macrófagos), así como fibroblastos que circunscriben estos gránulos (Salinas-Carmona, 2000; Welsh *et al.*, 2007).

El micetoma a menudo comienza como un nódulo indoloro que se desarrolla lentamente en el sitio de la inoculación. Eventualmente, la lesión crece y se vuelve purulenta y necrótica a causa del compromiso vascular. Generalmente, el micetoma permanece como lesión localizada, pero puede diseminarse a órganos y

tejidos subyacentes. Así, las lesiones tardías pueden involucrar tanto al músculo como el hueso (osteomielitis destructiva), causando compromiso motor de la parte afectada. El tratamiento de la enfermedad está basado principalmente en la quimioterapia antibiótica y hasta la fecha no existe vacuna alguna reportada. Desgraciadamente, una vez establecida, la lesión es progresiva y tiende a no responder a los antibióticos en las fases más tardías, por lo que en estos casos se suele recurrir a la cirugía (Welsh *et al.*, 2007).

El micetoma no es contagioso y se produce como resultado de la inoculación traumática del microorganismo en piel y tejido subcutáneo. En principio, cualquier parte del cuerpo puede ser afectada, pero los sitios más frecuentes en orden descendente son: pie (47.5 %), pierna y muslo (25.5), espalda (10 %), tronco (10 %), cabeza y cuello (3.0), hombro (2.4 %), brazo y mano (1.5 %), región perianal y glúteos (0.1 %). El grupo etario más afectado comprende a población económicamente activa de entre 20 a 40 años de edad, con una proporción hombre-mujer de 5:1. Debido al hábitat propio de la bacteria, los pacientes afectados tienen predominantemente ocupaciones relacionadas al campo: agricultores (60.2%), amas de casa que realizan también labores del campo (20.3 %) (Salinas-Carmona, 2000; Welsh *et al.*, 2007, Serrano *et al.*, 2007).

2.3.3 Epidemiología del micetoma.

Aunque el micetoma se ha reportado en 60 % de los países del mundo, la frecuencia más alta de la enfermedad se presenta en países tropicales y subtropicales. Los agentes causales son muy diferentes entre regiones y continentes, ya que en África, por ejemplo, los reportes más frecuentes de micetomas son causados por hongos mientras que en México, del total de micetomas que se presentan, el 97.8 % corresponden al tipo actinomicótico, mientras que el restante 2.2 % son eumicetomas. En nuestro país, *N. brasiliensis* es el agente causal más frecuente con un 86.6 %, seguida de *Actinomadura madurae* con un 10.2 %. La incidencia reportada para el micetoma puede estar subestimada debido a las características de la enfermedad y a aspectos socioculturales. Aún así, la incidencia de micetoma en nuestro país, es una de las más altas a nivel mundial junto con las de Venezuela, Sudan, Senegal y Arabia Saudita: aproximadamente 70 casos al año (Salinas-Carmona, 2000; Welsh *et al.*, 2007, Serrano *et al.*, 2007).

2.4 Actinomicetoma experimental en ratones.

Los experimentos de reproducción experimental del micetoma en animales de laboratorio comenzaron desde principios del siglo pasado, cuando diferentes tipos de animales, palomas, conejos, cobayos o ratones, fueron inoculados con los agentes causales del actinomicetoma incluido *Nocardia*. Estos primeros ensayos tuvieron resultados variables, ya que no siempre fue posible reproducir en todos

los animales la enfermedad, a la vez que las condiciones interexperimentales ensayadas fueron muy distintas. Los primeros experimentos reproducibles en ratones fueron realizados por González-Ochoa (1969), quienes inocularon diferentes dosis de *Nocardia* (en peso) en las patas de los ratones y después de la sexta semana lograron establecer la enfermedad en el 100 % de los ratones infectados. Otros experimentos realizados por estos mismos autores, demostraron que el actinomicetoma se producía sin necesidad de agregar adyuvante al inóculo y que progresión de la enfermedad correlacionaba con la dosis de *Nocardia* administrada. Más tarde, Zlotnik y Buckley en 1980, realizaron ensayos para definir las dosis infecciosas óptimas para la producción del micetoma a partir de unidades formadoras de colonia (UFC). Infectaron ratones en la pata a dosis de 1×10^4 - 1×10^6 UFC de *Nocardia* resuspendidas en adyuvante incompleto de Freund o en solución salina y confirmaron los hallazgos anteriores, viendo que no sólo la dosis afectaba el curso de la enfermedad sino también el uso de adyuvante. Aunque todos los animales eventualmente desarrollaron micetoma, aquellos inoculados con bacterias más adyuvante tuvieron una progresión mucho más rápida (Serrano *et al.*, 2007). En 1996, Salinas-Carmona y Torres-López reprodujeron experimentalmente el micetoma en ratones BALB/c utilizando *N. brasiliensis* a dosis de 1×10^6 UFC resuspendidas en solución salina con resultados satisfactorios, observando que la inoculación de la bacteria en la fase logarítmica de crecimiento era más virulenta que en la fase estacionaria. Además, estos autores demostraron que la respuesta de los anticuerpos de ratón a *N.*

brasiliensis en este modelo experimental es idéntica a aquella de los pacientes con micetoma (Salinas-Carmona *et al.*, 1992; Salinas-Carmona *et al.*, 1993).

El establecimiento de un modelo experimental satisfactorio ha mostrado ser de suma importancia para el estudio de esta enfermedad, como lo demuestran muchos resultados discordantes que se han reportado. Por ejemplo, Conde *et al.* (1982) reportaron que la fase de crecimiento bacteriano no afectaba la virulencia para el desarrollo del micetoma mientras que Beaman y cols. señalaron lo contrario. Asimismo, Beaman y cols. encontraron que la ruta de inoculación, el medio de cultivo e incluso la cepa bacteriana afectaban sensiblemente la virulencia, como lo demostraron al utilizar la cepa de *N. brasiliensis* 17E (aislada originalmente de un micetoma humano), la cual no indujo micetoma en ratones en ningún caso cuando eran inoculadas en las patas pero si lo hacía cuando fue inyectada por vía intravenosa (Serrano *et al.*, 2007).

2.5 Mecanismo de defensa del huésped contra el actinomicetoma.

2.5.1 Respuesta inmune innata.

En un caso típico, *Nocardia* es introducida en forma traumática en la piel y si bien muchas personas llegan a inocularse con estas bacterias, pocas son la que desarrollan actinomicetoma. Inmediatamente después de la inoculación de estas bacterias, se produce una reacción inflamatoria del huésped que consiste en la llegada de abundantes células polimorfonucleares (neutrófilos) que fagocitan

estos microorganismos aun en ausencia de anticuerpos opsonizantes. En la mayoría de los casos de infecciones humanas por *Nocardia*, la infección termina gracias a la fagocitosis y destrucción de estas bacterias *in situ*, pero en algunas personas la infección persiste y se hace crónica, con desarrollo eventual de actinomicetoma. Todavía se desconoce la razón de este hecho ya que aunque los pacientes poseen un sistema inmune totalmente competente, la bacteria es capaz de evadir la respuesta inflamatoria y adaptarse a vivir en el citoplasma de los macrófagos. La bacteria es capaz de multiplicarse tanto dentro de los fagocitos como en el espacio extracelular, donde comienza a agruparse en colonias que posteriormente formarán los gránulos característicos de la enfermedad (Beaman *et al.*, 1995).

Guimares *et al.* (2003) caracterizaron la respuesta *in situ* del huésped humano al actinomicetoma y encontraron la presencia de linfocitos T CD4 y CD8 rodeados por agregados de neutrófilos y macrófagos, aunque no observaron linfocitos B en las lesiones. Asimismo, en las fases tardías, las células epidérmicas de Langerhans parecían estar ausentes, lo que podría reflejar una respuesta inmunocelular deprimida. De hecho, Filice (1985) encontró que los polimorfonucleares no son muy efectivos al momento de eliminar las bacterias, pero en cambio, sí son capaces de inhibir su crecimiento. Ellos creen que esto es debido a que las células se activan y secretan varios tipos de citocinas (p.ej. IFN- γ), las cuales activan a su vez a los macrófagos y a los linfocitos T. La función exacta de las distintas células del huésped y los componentes activos en la

prevención y eliminación del actinomicetoma no se ha establecido (Serrano *et al.*, 2007).

2.5.2 Respuesta inmune celular.

Las primeras investigaciones sobre la respuesta celular contra *Nocardia* estuvieron encaminadas al estudio de la hipersensibilidad tardía en pacientes con micetoma contra diferentes extractos bacterianos. Los primeros ensayos con antígenos totales de *Nocardia* dieron reacciones cruzadas de hipersensibilidad en pacientes con otras enfermedades (tuberculosis, lepra) pero luego se pudieron aislar antígenos (poli II Na y poli II Nb, para *N. asteroides* y *N. brasiliensis* respectivamente) que no mostraron tal ambigüedad. Resultados similares fueron obtenidos por Salinas-Carmona *et al.* (1993) cuando utilizaron antígenos citoplasmáticos de *Nocardia* para las pruebas de hipersensibilidad, en los que no se presentaron reacciones cruzadas. Muy probablemente, este tipo de reacciones cruzadas está dado por antígenos de la pared celular que como se ha mencionado, son compartidos por muchas bacterias del orden *Actinomycetales* (Zamora *et al.*, 1963; Ortiz-Ortiz *et al.*, 1972).

Otra evidencia del papel clave de la inmunidad celular en la defensa del actinomicetoma la dio Mahgoub (1978) quien reportó respuestas defectuosas de células T en pacientes con micetoma, lo que sugería que eran necesarias para generar una adecuada resistencia del huésped contra *Nocardia*. Este resultado fue similar al reportado por Folb *et al.* (1977) quienes infectaron ratones atímicos

(*nu/nu*) con *N. asteroides* y *N. brasiliensis* y encontraron que ambas especies producían una infección diseminada y con alta mortalidad en comparación con los controles. Además, vieron que los ratones atímicos perdieron la habilidad de producir granuloma en respuesta a *N. brasiliensis*, lo que sugirió el papel crucial que tienen los linfocitos T en la formación del mismo. Estos hallazgos fueron confirmados más tarde por Beaman y Scates (1981) en ensayos con *N. otitidiscaviarum*. En estos experimentos, ellos infectaron ratones normales, atímicos y anesplénicos por diferentes vías y encontraron lo siguiente: i) los ratones atímicos y anesplénicos fueron mas susceptibles a los agentes infecciosos que los controles sin importar la vía de inoculación; ii) los micetomas crónicos causados por esta especie solo se presentaron en los ratones inoculados por vía intravenosa; iii) las formas L de *N. otitidiscaviarum* (sin pared celular) fueron inducidas en los huéspedes control, pero no fueron observadas en los animales inmunodeficientes; iv) los ratones deficientes en células T fueron incapaces de desarrollar micetomas típicos (Beaman, 1994, Serrano, 2007). En resumen, se cree que el papel de los linfocitos T durante la infección por *Nocardia* es principalmente la activación de los macrófagos y la estimulación de la respuesta inmune celular (Beaman y Beaman, 1990). No obstante, Deem *et al.* (1983) reportaron que los linfocitos T podrían estar involucrados directamente en la eliminación de *N. asteroides*.

2.5.3 Respuesta inmune humoral.

Aunque es muy clara la importante participación de la respuesta inmune innata y celular en la resistencia a la infección contra *Nocardia*, no hay mucha información acerca del papel desempeñado por la respuesta inmune humoral y de hecho, algunos reportes son contradictorios. Las conclusiones de los primeros experimentos realizados para evidenciar la participación de la respuesta humoral en la infección por *Nocardia* fueron que ni los linfocitos B ni los anticuerpos protegen al huésped contra el establecimiento del micetoma. De hecho, en algunos reportes se sugiere que los anticuerpos anti-*Nocardia* empeoran la inflamación durante el curso del micetoma, cuando son utilizados para opsonizar las bacterias del inóculo (Rico *et al.*, 1982).

Dos reportes, sin embargo, chocan con estas ideas establecidas sobre la poca o nula participación de la respuesta humoral en la infección por *Nocardia*. El primero fue el proporcionado por Beaman *et al.* (1985) en un estudio sobre el papel de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (KAT) en la infección por *N. asteroides* GUH2. En ese trabajo, se realizaron ensayos de infección *in vitro* de neutrófilos humanos con *N. asteroides* incubada con anticuerpos purificados anti-SOD y/o anti-KAT del tipo IgG y lo que observaron fue que el 50% de las bacterias fueron eliminadas al cabo de 3 horas mientras que los controles permanecían viables. Estos experimentos se repitieron con mutantes carentes de catalasa y con restitución de ambas enzimas y los resultados fueron similares (Beaman *et al.*, 1985). También observaron que cepas no virulentas de *N.*

asteroides carecían de la asociación de SOD en su pared celular, contrario a lo que sucede con la cepa GUH2 (virulenta), cuya asociación había quedado demostrada con ensayos de inmunofluorescencia anti-SOD (Beaman *et al.*, 1983). Concluyeron que ambas enzimas juegan un papel importante en la resistencia de *N. asteroides* a la eliminación por las células fagocíticas. Pero de este estudio, también se deduce que los anticuerpos estarían participando en la eliminación de las bacterias, aun cuando es su propiedad neutralizante de las actividades enzimáticas SOD y KAT la que desempeña el papel principal en este evento (Beaman *et al.*, 1985).

Otro reporte sobre la participación de los anticuerpos en la infección por *Nocardia* fue dado por Salinas-Carmona y Torres-López en experimentos realizados con *N. brasiliensis*. Estos autores demostraron que el suero hiperinmune proveniente de ratones BALB/c inmunizados con *N. brasiliensis* muerta por calor, era capaz de conferir protección parcial contra el establecimiento del micetoma cuando fue transferido a ratones de la misma cepa que luego fueron retados con la bacteria. En otro de sus trabajos, demostraron también que la protección se daba solamente al utilizar sueros hiperinmunes recuperados de las primeras fases de la infección (30-60 días) ya que los sueros de las fases más tardías (90-120 días) no mostraban actividad protectora, aun cuando presentaban títulos mayores de anticuerpos IgG anti-*N. brasiliensis* (Licón-Trillo *et al.*, 2003). Estos ensayos sugerían que no eran los anticuerpos IgG sino otro tipo de anticuerpos o factores séricos, los responsables de conferir

la protección anti-micetoma en los ratones inmunizados. Esta última observación fue corroborada en recientes experimentos en los cuales los mismos autores encontraron que la actividad protectora de los sueros hiperinmunes correlacionaba con la presencia en ellos de niveles altos de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* del tipo IgM pero no del tipo IgG, lo cual apoya la hipótesis del papel clave que juegan este tipo de anticuerpos durante la infección por *Nocardia*. Esta actividad protectora pudiera ser dependiente de la activación del complemento de tal forma que se limita la diseminación bacteriana, dando tiempo para la llegada de los leucocitos para facilitar la destrucción de los microorganismos. Con todo, la participación de otros factores séricos en las primeras fases de la infección y el papel de los anticuerpos IgM de alta especificidad todavía tiene que ser más estudiada (Salinas-Carmona y Pérez-Rivera, 2004; Salinas-Carmona *et al.*, 2006).

2.5.4 Papel de las citocinas.

En un estudio, Méndez-Tovar *et al.* (2004) realizaron la determinación de diversas citocinas en cultivos de células mononucleares periféricas de pacientes con actinomicetoma, estimulados con un extracto citoplasmático de *N. brasiliensis*. Observaron que las concentraciones de IL-4 y TNF- α se encontraban aumentadas con respecto a los controles, pero no así los niveles de IFN- γ , los cuales estaban disminuidos. Los niveles de IL-10, IL-12 y la proliferación celular fueron similares en ambos grupos. De aquí concluyeron que los pacientes con

actinomicetoma presentaban un reconocimiento antigénico normal, pero que el patrón de citocinas apuntaba hacia el de un tipo Th2.

2.6 Estallido respiratorio

Los fagocitos PMN tienen un papel esencial en la defensa innata del organismo frente a agentes patógenos y actúan como mediadores primarios de la respuesta inflamatoria. Para defender al organismo, los neutrófilos utilizan una amplia variedad de productos microbicidas, tales como oxidantes, péptidos, enzimas líticas, etc. La generación de oxidantes microbicidas por los neutrófilos se debe al complejo multiproteico NADPH oxidasa, responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH al O_2 , con la simultánea producción de radical superóxido. Durante la activación de la oxidasa, diversas proteínas citosólicas se translocan a la membrana plasmática que rodea al fagosoma, donde se ensamblan a otro complejo unido a membrana: el flavocitocromo b558. Este proceso se encuentra estrictamente regulado e implica fosforilaciones, translocación y múltiples cambios conformacionales (Cascales-Angosto, 2005). El producto de la reacción catalizada por la NADPH oxidasa, se identificó al principio como H_2O_2 por su capacidad para oxidar el formato. Posteriormente se demostró que el H_2O_2 procedía de la dismutación del radical superóxido (O_2^-). Cuando los neutrófilos fagocitan partículas, el anión superóxido se produce en aquella región de la membrana plasmática en contacto directo con la partícula.

Después transcurre un período (fase “lag”), que proporciona al fagocito el tiempo requerido para la formación y cierre de una vacuola que limita la salida al exterior de las especies de oxígeno formadas. La mieloperoxidasa, uno de los principales constituyentes de los gránulos, puede utilizar el H_2O_2 para oxidar los haluros y convertirlos en compuestos reactivos tóxicos, como el $OHCl$ y las cloraminas. Sin embargo, también están implicados otros factores en el efecto del estallido respiratorio y en la destrucción de las proteínas de los gránulos. Uno de ellos es el bombeo hacia el interior de la vacuola de concentraciones milimolares de electrones, no acompañada de protones, que origina el consumo de iones de hidrógeno en el lumen de dicha vacuola, con la consiguiente elevación del pH. El contenido de los gránulos se mantiene en estado inactivo a pH 5.0 y las proteasas neutras se activan cuando se exponen al medio relativamente alcalino de la vacuola (pH 6 – 8). Los fagocitos circulantes (leucocitos polimorfonucleares y monocitos) y los macrófagos de los tejidos, como las células de Kupffer en el hígado y las células de la microglia en cerebro, son capaces de generar cantidades sustanciales de radical superóxido. Los neutrófilos, son los más activos en este aspecto, puesto que llegan a producir hasta 100 nmoles de radical superóxido por millón de células, cuando se estimulan con 10 ng del éster de forbol 12 miristato 13 acetato (PMA). La NADPH oxidasa fagocítica es un complejo ligado a membrana, denominado también “oxidasa del estallido respiratorio”, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular con la consiguiente producción del radical superóxido (Hampton *et al.*, 1998).

En fagocitos quiescentes, la NADPH oxidasa no es activa, pero adquiere actividad catalítica cuando las células se estimulan con agentes apropiados. El estímulo fisiológico de la NADPH oxidasa en fagocitos incluye la fagocitosis de bacterias u otras partículas opsonizadas, complejos inmunes, citocinas, tales como el TNF, la linfotoxina, el IFN, péptidos quimiotácticos como el producto C5a de la fragmentación del complemento y los péptidos N-formilados derivados de bacterias. Estímulos poderosos no fisiológicos son el PMA, activador de la proteína quinasa C y el agente activador de las proteínas G (AIF₃). La NADPH oxidasa, responsable del estallido respiratorio de los fagocitos, genera el radical superóxido como producto primario, el cual en sí mismo es un oxidante débil. Sin embargo, en una serie de reacciones posteriores, este radical da origen a oxidantes más potentes, tales como:

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), vía dismutación espontánea o catalizada enzimáticamente por las superóxido dismutasas;
- Radical hidroxilo (•OH) por reacción del O₂⁻ con el H₂O₂, en presencia de hierro bivalente (reacción de Fenton);
- Hipohaluros, como el ácido hipocloroso (HOCl), generado al reaccionar el anión Cl⁻ con el H₂O₂, mediante la acción catalítica de la mieloperoxidasa (Hampton *et al.*, 1998).

De esta manera, la NADPH oxidasa juega un papel crítico en la producción de un grupo complejo de especies reactivas del oxígeno (ROS). En los fagocitos, estas especies reactivas van a ser utilizadas como agentes microbicidas,

particularmente frente a las bacterias y hongos catalasa positivos. Los fagocitos cuentan también con otros recursos antimicrobianos oxidativos, como el radical óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y otros no oxidativos, como proteasas y péptidos bactericidas procedentes de los gránulos. Por último, la interacción del $\text{NO}\bullet$ con el O_2^- da origen al peroxinitrito ($\text{ONOO}\bullet$), agente que también puede formar oxígeno singlete al reaccionar con el H_2O_2 (Henle y Linn, 1997; Hampton *et al.*, 1998; Cascales-Angosto, 2005).

Los mecanismos microbicidas de las ROS no están totalmente establecidos y son muy complejos. Además de las especies reactivas descritas aquí, es indudable la generación de otros radicales de vida ultra corta que también podrían participar en el daño a moléculas microbianas. Por tanto, resulta muy difícil estudiar las interacciones moleculares suscitadas durante el estallido respiratorio. Sin embargo, ya han sido establecidos algunos mecanismos de daño que como cabría esperar, son dependientes de reacciones REDOX dentro del fagolisosoma. Los más estudiados son:

- Peroxidación de proteínas: causada principalmente por la reacción de O_2^- y H_2O_2 con los grupos tioles nucleofílicos de las proteínas, alterando la conformación y actividad de las mismas.
- Peroxidación de lípidos: es un factor determinante de daño ya que la existencia de lipoperóxidos (LPOs) produce también modificaciones de las proteínas asociadas a las membranas, enzimas, receptores y proteínas formadoras de canales lo que provoca trastornos de los sistemas

transportadores de membranas con aumento de la permeabilidad para algunos elementos como el calcio produciéndose por consiguiente la activación de enzimas dependientes de Ca_2^+ .

- Daño al ADN: Los daños oxidativos por las ROS a los ácidos nucleicos incluyen aductos de bases y grupos azúcares, rompimientos de cadena simples y dobles, y enlaces cruzados a otras moléculas. El espectro de aductos en la cromatina oxidada de mamíferos *in vitro* e *in vivo* incluye más de 20 productos conocidos, incluyendo daños a las 4 bases nitrogenadas y enlaces cruzados timina– tirosina. Algunos daños en las bases han resultado tener propiedades premutagénicas (Keyer e Imlay, 1996; Henle y Linn, 1997).

2.7 Superóxido dismutasa.

2.7.1 Características generales.

La SOD es una enzima reductora polimérica (EC: 1.15.1.1), que cataliza la conversión de ion superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular según la siguiente reacción química: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Esta enzima es ancestral y se halla ampliamente distribuida en la naturaleza ya que es producida por todos aquellos organismos que utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones durante la respiración (organismos aeróbicos). Esto se debe a que durante la reducción del oxígeno se generan de manera inevitable metabolitos

muy reactivos de éste (O_2^- , OH^- , $O\bullet$), que deben ser eliminados o transformados a compuestos menos reactivos con la finalidad de contrarrestar el daño que pudieran ocasionar a los componentes celulares. La enzima acelera la reacción en aproximadamente 1×10^9 veces la tasa de decaimiento normal del sustrato. De esta manera, la eliminación del ion superóxido llevada a cabo por la SOD es la principal función que tiene esta enzima dentro del metabolismo celular (Fridovich, 1975).

Se han distinguido y clasificado diferentes tipos de SOD con base a su asociación con algunos metales de transición (cobre, hierro, manganeso, níquel, zinc). Estos metales son cofactores de la holoenzima por lo que son indispensables para su actividad catalítica. En bacterias, se han reportado SOD asociadas a hierro (FeSOD), a manganeso (MnSOD), a cobre (CuSOD) y a níquel (NiSOD). Cabe mencionar que las apoenzimas son codificadas por genes diferentes (*sodA*, *sodC* y *sodN*, entre otros) que no se relacionan filogenéticamente. Además de las asociaciones con un solo metal, se han reportado diversas combinaciones de metales, generalmente en proporción equimolar, por ejemplo cobre-zinc (CuZnSOD) y hierro-manganeso (FeMnSOD). A la fecha, se han descrito enzimas diméricas, tetraméricas y hexaméricas. Típicamente se encuentran compartimentalizadas, aunque ya se ha descrito la secreción de SOD para algunas especies, incluidos importantemente los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia* (Beaman et al., 1983; Fridovich, 1997; Schäfer y Kardinahl, 2003; Barondeau et al., 2004).

2.7.2 Regulación de la expresión de SOD.

Estudios realizados en bacterias han evidenciado que la expresión de las SOD puede ser constitutiva o inducible. Se han identificado algunos factores que se asocian al aumento de la cantidad de SOD y que por lo mismo, han sido propuestos como reguladores de la expresión de la proteína. Entre estos se encuentran: la presencia de los metales a los que se asocian (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn), reguladores de flujo de metales (Fur), proteínas de choque térmico (Hsp), presencia de oxígeno y glucosa, por mencionar algunos. Un ejemplo se ha observado en *Streptomyces coelicolor* que cuando es cultivada en medio suplementado con níquel, induce una sobreproducción de SOD asociada al mismo (NiSOD), y una disminución de otros tipos de SOD; no obstante, este mecanismo no ha sido extensamente estudiado y se ignora si pudiera estar presente en otro tipo de microorganismos (Chung *et al.*, 1999).

En *E. coli* se ha descrito la regulación de la expresión de la MnSOD por el regulón SoxRS. Este sistema activa la expresión de ésta y otras enzimas en respuesta a la presencia de ciertos compuestos generadores REDOX (p.ej. paraquat). Al principio se pensó que podría tratarse de un mecanismo de retroalimentación en respuesta a los radicales O_2^- generados por la droga, tal como se cree que sucede con el regulón OxyR, que activa la producción de catalasa presumiblemente en respuesta al aumento de H_2O_2 en el medio. Sin embargo, estudios recientes muestran que el mecanismo de regulación de SoxRS no es dependiente de los radicales O_2^- generados por las drogas REDOX *per se*,

por lo que el funcionamiento de este sistema regulatorio aún no está claro (Strohmeier-Gort e Imlay, 1998).

2.7.3 SOD como factor de virulencia microbiana.

Se ha observado que en muchos organismos, principalmente bacterias, existe una concentración de SOD más elevada (hasta 1×10^5 veces en *E. coli*) de la que es necesaria teóricamente para neutralizar el O_2^- intracelular. Por lo tanto, se ha propuesto la participación de SOD en funciones alternas. Muchos organismos son capaces de generar metabolitos reactivos de oxígeno (entre ellos, el ion O_2^-) para destruir parásitos invasores o para eliminar a la competencia del medio, y la SOD podría constituir un mecanismo de defensa contra tales ataques. Este supuesto ha sido estudiado sobretodo en bacterias, donde se ha notado que organismos mutantes con una producción muy elevada de SOD son más resistentes a la destrucción por las células fagocíticas (Strohmeier-Gort e Imlay, 1998).

De esta manera, se ha visto que algunas SOD microbianas están vinculadas a la virulencia de muchos microorganismos patógenos al bloquear los efectores oxidativos del estallido respiratorio iniciado por las células fagocíticas en el fagolisosoma. La cascada de generación de radicales libres de oxígeno (importantemente iones $OH\bullet$) es desviada hacia la generación de agua y oxígeno molecular con ayuda de otras enzimas (catalasa, glutatión oxidorreductasas) que por cierto, también están involucradas como factores de virulencia. De esta

manera, dichos patógenos son capaces de resistir el mecanismo inicial de eliminación de la respuesta inmune y pueden sobrevivir, multiplicarse e infectar más células (Nunoshiba *et al.*, 1999; Lynch y Karamitsu, 2000; Hwang *et al.*, 2002; Battistoni, 2003; Ghosh *et al.*, 2003). Entre las bacterias en las cuales se ha descrito este mecanismo se encuentran los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia* (Beaman *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1998; Lynch y Kuramitsu, 2000; Piddington *et al.*, 2001; Smith, 2003; Bartos *et al.*, 2004).

Experimentos más recientes han podido corroborar estas dos principales funciones desempeñadas por la SOD en algunos microorganismos (*Brucella*, *Helicobacter*, *Streptococcus*). En estos trabajos se ha conseguido bloquear la actividad de SOD por diversos medios (anticuerpos, interrupción génica, ARN antisentido) y se han observado dos principales efectos sobre el microorganismo: i) la inhibición del crecimiento en condiciones aeróbicas (que se presenta cuando los microorganismos únicamente cuentan con una SOD), y ii) una disminución de la supervivencia de los microorganismos dentro de las células fagocíticas cuando éstas son infectadas. Es más, el hecho de que exista más de un tipo de SOD en algunos microorganismos y que los elementos de regulación de cada una de ellas se hallen diferenciados, ha terminado de convencer a muchos del papel definitivo que tiene esta enzima en la patogenicidad microbiana. De hecho, la creación de vacunas anti-SOD (convencionales o de ADN), ha permitido demostrar la efectividad de éstas en conferir protección contra la infección por algunos microorganismos (*Brucella*, *Schistosoma*) en diversos

modelos de infección *in vitro* e *in vivo* (Seyler *et al.*, 2001; Oñate *et al.*, 2003; Muñoz-Montesino *et al.*, 2004; Carvalho-Queiroz *et al.*, 2004).

2.7.4 Papel de la SOD en la patogenicidad de *N. brasiliensis*.

A diferencia de lo observado en *N. asteroides*, en el caso de *N. brasiliensis*, aún no hay reportes que involucren definitivamente la participación de las enzimas de oxidorreducción bacterianas (KAT, SOD, glutatión oxidorreductasa) en la patogenicidad. Salinas-Carmona *et al.* (1993) se han enfocado al estudio de las interacciones de *N. brasiliensis* con el sistema inmune. Gracias a esto, ahora se conocen varias proteínas inmunodominantes de la bacteria (P24, P26, P38, P61), lo cual ha permitido la elaboración de una prueba diagnóstica de ELISA de alta sensibilidad y especificidad. Asimismo, se han iniciado varios experimentos encaminados a explorar el papel de estas proteínas en la virulencia y establecimiento del actinomicetoma por *N. brasiliensis*. Una de estas proteínas (P61) ha sido identificada como una catalasa mediante ensayos de actividad enzimática en gel (Vera-Cabrera *et al.*, 1999). Algunos ensayos de inmunización activa y pasiva con esta proteína en modelos de actinomicetoma en ratones, han mostrado que pudiera estar jugando un papel importante en la virulencia de *N. brasiliensis* (Vera-Cabrera *et al.*, 1992, Salinas-Carmona *et al.*, 1997).

Recientemente, Revol *et al.* (2006) clonaron la secuencia parcial de una SOD correspondiente al tipo A (*sodA*), que muestra similitud con la reportada para *N.*

asteroides, por lo que podría corresponder a una SOD asociada a manganeso (MnSOD). Estos mismos autores demostraron *in vitro* que al menos durante la primera hora después de la infección de macrófagos de ratón por *N. brasiliensis*, la expresión de *sodA* se encuentra significativamente disminuida con respecto al control. Ellos proponen varias hipótesis para explicar estos resultados aparentemente contradictorios con la idea de la participación de la SodA como factor de virulencia: i) la enzima pudiera no ser indispensable en esta fase temprana de la infección del macrófago, aunque pudiera ser requerida en fases posteriores para el crecimiento bacteriano o para la infección *in vivo*; ii) la estabilidad de la proteína pudiera ser suficiente como para mantener niveles altos de actividad sin la necesidad de un aumento en la transcripción; iii) otra actividad SOD (p.ej. SodC) pudiera sustituir o compensar los bajos niveles transcripcionales observados para SodA en esta fase (Revol *et al.*, 2006).

No obstante estas observaciones, a la fecha no se ha reportado ni caracterizado la actividad de SOD en *N. brasiliensis*, y no se conoce tampoco si desempeña un papel importante en la virulencia de esta bacteria. Por tanto, antes de investigar el papel de SOD en el proceso infeccioso de *N. brasiliensis*, es indispensable evidenciar la(s) actividad(es) SOD y establecer las características de la enzima en este microorganismo.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Estudios con microorganismos mutantes carentes de superóxido dismutasa (*sod*⁻) o en los cuales la actividad SOD ha sido bloqueada, demuestran la participación de la enzima en la patogenicidad de los mismos. Sin embargo, estudios similares para el caso de *Nocardia brasiliensis* no han sido realizados.

El estudio de modelos de infección, donde la actividad SOD de *N. brasiliensis* sea bloqueada (mutantes *sod*⁻, anticuerpos) permitirá aclarar la participación de esta enzima como un posible factor de virulencia del microorganismo.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

La superóxido dismutasa de *Nocardia brasiliensis*
constituye un factor de virulencia bacteriana.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de la superóxido dismutasa como factor de virulencia de *Nocardia brasiliensis* en la inducción del actinomicetoma en ratones BALB/c.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener una clona *sod*⁻ a partir de la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC: 700358)
2. Obtener y caracterizar una superóxido dismutasa recombinante de *N. brasiliensis*.
3. Determinar la inmunogenicidad de la superóxido dismutasa recombinante de *N. brasiliensis*
4. Determinar la capacidad inductora de protección anti-actinomicetoma de la superóxido dismutasa de *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Lugar de trabajo.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología Molecular del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

6.1.2 Biológicos.

6.1.2.1 Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron:

Nocardia brasiliensis ATCC 700358, una cepa virulenta aislada de un paciente con actinomicetoma cuya identificación quimiotaxonómica fue confirmada por June Brown en el centro para el control y prevención de enfermedades en E.U.A. (CDC; Atlanta, GA, USA) y por Patrick Boiron en el Observatorio Francés para la Nocardiosis (León, Francia).

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) se utilizó para la propagación de los vectores y para los ensayos de expresión de rSodA.

Escherichia coli LMG194 (Invitrogen) se utilizó para los ensayos de expresión de superóxido dismutasa recombinante de *N. brasiliensis*.

6.1.2.2 Vectores.

Se utilizaron los plásmidos pZErO-2 (Invitrogen), pBluescript II KS (Stratagene; La Jolla, CA, USA) para la clonación de las construcciones génicas. Los plásmidos pBR322 (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) y pRU1701 (Addgene Inc.; Cambridge, MA, USA) fueron utilizados como fuente para la amplificación de los genes de resistencia a tetraciclina y gentamicina, respectivamente. El plásmido pNV18.0 fue gentilmente donado por el Dr. Jun Ishikawa (Universidad de Tokio, Japón) y fue utilizado como esqueleto para la creación de los vectores de replicación autónoma en *Nocardia*. El vector pBAD/HIS-A (Invitrogen) se utilizó para la expresión de la SodA recombinante de *N. brasiliensis*.

6.1.2.3 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa BALB/c de 10 a 12 semanas de edad, los cuales son descendientes de animales adquiridos de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH; Bethesda MD, USA). Se manejaron condiciones estándar de bioterio: temperatura de 20-25 °C, agua destilada estéril y alimento especialmente balanceado (Purina; México) *ad libitum*.

6.1.3 Reactivos.

Los medios de cultivo utilizados fueron: medio Luria-Bertani [LB] (Sigma; St. Louis, MO, USA), medio mínimo suplementado con casaminoácidos [M9CA] (Amresco; Solon, Ohio, USA) y medio enriquecido de infusión cerebro-corazón [BHI] (Difco Laboratories Detroit, MI, USA). Para la realización de las reacciones en cadena de la polimerasa [PCR] se utilizó el kit comercial MasterAmp *Taq* DNA Polymerase (Epicentre; Madison, WI, USA) así como el kit Accuzyme DNA Polymerase (Bioline; Taunton, MA, USA). Para los cortes enzimáticos de ADN se utilizaron endonucleasas de restricción del sistema NEB (New England Biolabs) y REact (Invitrogen). Las reacciones de ligación de ADN se realizaron con el kit T4 DNA ligase (Invitrogen). Se emplearon los sistemas de purificación siguientes: Wizard *Plus* SV Minipreps (Promega; Madison, WI, USA) para ADN y HisLink Protein Purification Resin (Promega) para la proteína recombinante. La cuantificación de la actividad SOD se realizó con el kit comercial SOD Assay Kit (Fluka Chemie, Buchs SZ). La mayoría de los reactivos restantes que fueron utilizados son de las marcas Sigma o Amresco, a lo cual se hará mención cuando corresponda.

6.1.4 Equipo.

El principal equipamiento utilizado en este trabajo incluyó: centrifuga refrigerada modelo Centrifuge 5417R (Eppendorf AG; Hamburg, Germany),

centrífuga refrigerada modelo Centrifuge 5403 (Eppendorf), concentrador con vacío modelo Concentrator 5301, congelador de -20°C modelo TORREY CV-16 (Fabricantes de Equipos para Refrigeración S.A. de C.V.; Guadalupe, Nuevo León, México), congelador de -80°C modelo VIP Series (SANYO Electric Co.; Wood Dale, IL, USA), campana para PCR modelo P-036-02 (C.B.S. Scientific Company Inc.; Del Mar, CA, USA), termociclador modelo PTC-200 (MJ, Research Inc.; Reno, NV, USA), termociclador modelo DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer; Waltham, MA, USA), horno de microondas modelo MS-1144DP (LG Electronics México S.A. de C.V. Tlalnepantla, Estado de México, México), balanza electrónica modelo SA-210 (Sciencetech Inc; Boulder, CO, USA), cámara de electroforesis horizontal modelo E1-1408 (FOTODYNE Inc; Hartland, WI, USA), cámara de electroforesis vertical modelo SE-250 (Pharmacia Biotech; San Francisco, CA, USA), fuente de poder modelo EC3000-90 (Thermo EC; Holbrook, NY, USA), transiluminador UV modelo T1201(Sigma-Aldrich Co; St Louis, MO, USA), filtro óptico modelo DS-34 (Polaroid Corp; Cambridge, MA, USA), sistema purificador de agua modelo EASYpure II RF (Barnstead International; Dubuque, IA, USA), estufa a 37 °C modelo 143A (FELISA; Zapopan, Jalisco, México), agitador orbital modelo 4625 (Lab-Line Instruments Inc; Melrose Park, IL, USA), agitador orbital modelo 3519 (Lab-Line Instruments Inc.), agitador magnético modelo SPA1025B (Thermolyne Corp; Dubuque, IA, USA), micropipetas ajustables modelo Labpette (Labnet International Inc;

Woodbridge, NJ, USA), micropipetas ajustables Pipetman (Gilson Inc; Middleton, WI, USA)

6.1.5 Software.

Los programas de computadora utilizados fueron: sistema operativo Windows XP Profesional Edition SP2 (Microsoft Corp.; Redmond, WA, USA), paquete de oficina Office 2007 (Microsoft Corp.), Prism 5 for Windows v.5.0 (GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA, USA), GeneDoc for Windows v.2.7 (Free Software Foundation Inc.; Boston, MA, USA), BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 (Ibis, Biosciencias; Carlsbad, CA, USA), Basilisk II Emulator (<http://basilisk.cebix.net/>), Amplify v.1.0 (University of Wisconsin; Madison, WI, USA), Oligo v.4 (Molecular Biology Insights Inc.; Cascade. CO, USA), NEBcutter v.2.0 (New England Biolabs), CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), CBS Prediction Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services>), PSORTb v.2.0.4 (<http://www.psort.org/psortb>), RasMol v.2.7.3 (RasWin Molecular Graphics).

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Cultivos bacterianos.

6.2.1.1 Cultivo y almacenaje estándar de *N. brasiliensis*.

A partir de un vial almacenado a -70°C de *N. brasiliensis* (HUJEG-1; ATCC 700358), se realizó una siembra en placas de petri con medio BHI agar suplementado con ampicilina $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a 37°C durante 72 horas. Una colonia fue recuperada y sembrada en un matraz Erlenmeyer con 30 mL de medio BHI suplementado con ampicilina $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a 37°C durante 72 horas con agitación a 150 rpm. Luego, el cultivo fue transferido a un tubo cónico estéril de 50 mL y centrifugado a 4000 g por 10 min a 4°C ; al término, el sobrenadante fue desechado. La masa bacteriana fue resuspendida en 30 mL de solución de lavado (NaCl 0.9 %) a 4°C y estéril y se centrifugó nuevamente según las condiciones anteriores. Después, se desechó el sobrenadante y la masa bacteriana fue resuspendida en 15 mL de solución de lavado a 4°C y estéril y fue homogenizada con ayuda de un homogenizador manual de vidrio (*dounce*) hasta obtener una suspensión de apariencia lechosa y color rosa pálido. La suspensión fue transferida a un nuevo tubo cónico estéril de 50 mL y centrifugada a 1000 g por 10 min a 4°C ; al término, el sobrenadante fue desechado. Finalmente, la masa bacteriana fue resuspendida en 2 mL de medio de almacenaje estéril (BHI suplementado con glicerol 40 %) a 4°C y distribuida en alícuotas de $500\ \mu\text{L}$ que fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

6.2.1.2 Cultivo y almacenaje estándar de *E. coli*.

A partir del vial comercial de *E. coli*, se realizó cultivo en matraz Erlenmeyer con 30 mL de medio LB suplementado con estreptomicina 25 µg/mL y se incubó a 37°C durante toda la noche con agitación a 100 rpm. El cultivo fue transferido a un tubo cónico estéril de 50 mL y centrifugado a 1000 g por 10 min a 4°C; al término, el sobrenadante fue desechado. La masa bacteriana fue resuspendida en 2 mL de medio de almacenaje estéril (BHI suplementado con glicerol 40%) a 4°C y distribuida en alícuotas de 200 µL que fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

6.2.1.3 Obtención de *E. coli* calcio-competente.

A partir de un vial de *E. coli* almacenado a -70°C, se tomaron 10 µL de la suspensión bacteriana, se sembraron en un tubo de cultivo con 5 mL de medio LB suplementado con estreptomicina 25 µg/mL, y se incubó el tubo a 37°C durante toda la noche con agitación a 100 rpm. Al día siguiente, se tomó 1 mL del cultivo y se sembró en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio LB sin antibióticos y se dejó incubando por 2.5 h en las condiciones ya descritas. (Los pasos a continuación se realizaron en frío). Pasado ese tiempo, el cultivo se incubó a 4°C durante 20 min sin agitación. Luego, el cultivo fue transferido a un tubo cónico estéril de 50 mL y centrifugado a 1000 g por 10 min a 4°C; al término, el sobrenadante fue desechado. La masa bacteriana fue resuspendida suavemente en

30 mL de solución de lavado (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂) a 4°C y estéril e incubada a 4°C por 10 min. Luego, la suspensión fue centrifugada como ya se describió y al término el sobrenadante fue desechado. La masa bacteriana se resuspendió suavemente en 15 mL de solución de almacenaje (100 mM CaCl₂) y se incubó por 10 min a 4°C. Después, la suspensión fue centrifugada de nuevo como ya se ha descrito y el sobrenadante fue desechado. Finalmente, la masa bacteriana se resuspendió suavemente en 2 mL de solución de almacenaje y se distribuyó en alícuotas de 100 µL que fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

6.2.1.4 Obtención de *N. brasiliensis* electro-competente.

A partir de un vial de *N. brasiliensis* almacenado a -70°C, se tomaron 500 µL de la suspensión bacteriana, se sembraron en un matraz Erlenmeyer con 30 mL de medio BHI suplementado con ampicilina 50 µg/mL, y se incubó el tubo a 37°C durante 48 h con agitación a 100 rpm. (Los pasos siguientes se llevaron a cabo en frío). Luego, el cultivo fue transferido a un tubo cónico estéril de 50 mL y centrifugado a 4000 g por 10 min a 4°C; al término, el sobrenadante fue desechado. La masa bacteriana fue resuspendida en 30 mL de solución de lavado (NaCl 0.9%) a 4°C y estéril y se centrifugó nuevamente según las condiciones anteriores. Después, se desechó el sobrenadante y la masa bacteriana fue resuspendida en 15 mL de solución de lavado a 4°C y estéril y fue homogenizada con ayuda de un homogenizador manual de vidrio (*dounce*) hasta obtener una

suspensión de apariencia lechosa y color rosa pálido. La suspensión fue transferida a un nuevo tubo cónico estéril de 50 mL y centrifugada a 1000 g por 10 min a 4°C; al término, el sobrenadante fue desechado. Después, la masa bacteriana fue resuspendida en 30 mL de agua miliQ a 4°C estéril y centrifugada como en el paso anterior; al término, el sobrenadante fue desechado. Este paso se repitió una vez más y finalmente, la masa bacteriana fue resuspendida suavemente en 1 mL de solución de electroporación (glicerol al 10% en agua miliQ) a 4°C y estéril. La suspensión bacteriana fue distribuida en alícuotas de 200 µL y almacenada a -70°C hasta su uso.

6.2.1.5 Cultivo de *N. brasiliensis* con sales metálicas.

A partir de un vial de *N. brasiliensis* almacenado a -70°C, se tomó 20 µL de la suspensión bacteriana y se sembró en tubos de cultivo con 5 mL de medio M9CA suplementado con glucosa 0.2%, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 0.1 mM, ampicilina 50 µg/mL y con la sal metálica correspondiente (CuSO₄, FeSO₄, MnSO₄, NiSO₄, ZnSO₄ 100 µM cada uno). También se sembraron tubos con combinaciones de sales metálicas (CuSO₄ + ZnSO₄, FeSO₄ + MnSO₄, FeSO₄ + MnSO₄ + ZnSO₄) y tubos controles: uno con todas las sales metálicas y otro sin ellas. Cada tubo de cultivo se procesó por duplicado y la mitad de ellos se incubaron a 37°C por 72 h en agitación a 100 rpm mientras que la otra mitad se incubó por 120 h bajo las mismas condiciones. (Los pasos siguientes fueron realizados en frío). Al término, los cultivos fueron centrifugados a 4000 g por 10

min a 4°C, los sobrenadantes fueron recolectados y adicionados con PMSF 100 µM, luego fueron filtrados en membrana de nilón de 0.2 µm y almacenados a -20°C hasta su uso. Por otro lado, la masa bacteriana fue resuspendida en 100 µL de solución de lisis (PBS 1X, Triton X-100 0.5%, PMSF 100 µM) y se incubó a 4°C por 20 min en agitación constante. Luego, la suspensión fue macerada con ayuda de un minipistilo una vez transferida a microtubos de 1.5 mL estériles. Después, se adicionó a la mezcla ADNasa 0.5 µg/mL y ARNasa 0.5 µg/mL y se dejó incubando a 25°C y en agitación constante hasta que la consistencia viscosa desapareciera. En este momento, la suspensión fue centrifugada a 25000 g por 30 min a 4°C y el sobrenadante fue recuperado y adicionado con PMSF (100 µM concentración final). Finalmente, el extracto fue filtrado con membrana de nilón de 0.2 µm y almacenado a -20°C hasta su uso.

6.2.2 Determinación de la actividad SOD de *N. brasiliensis*.

6.2.2.1 Obtención del extracto celular crudo de *N. brasiliensis*.

N. brasiliensis fue cultivada y procesada como se ha señalado en 6.2.1.1 hasta antes de la adición de medio de almacenaje. (Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo en frío). En este punto, la masa bacteriana se resuspendió en 1 mL de solución de lisis (PBS 1X, lisozima 10 mg/mL, Triton X-100 0.5%, PMSF 100 µM) y se incubó a 4°C por 20 min en agitación constante. Luego, se adicionó 0.5 g de polvo de vidrio estéril y la suspensión fue macerada con ayuda de un

minipistilo una vez transferida a microtubos de 1.5 mL estériles. Después, se adicionó a la mezcla ADNasa 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y ARNasa 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se dejó incubando a 25°C y en agitación constante hasta que la consistencia viscosa desapareciera. En este momento, la suspensión fue centrifugada a 25000 g por 30 min a 4°C y el sobrenadante fue recuperado y adicionado con PMSF (100 μM concentración final). Finalmente, el extracto fue filtrado con membrana de nilón de 0.2 μm y almacenado a -20°C hasta su uso.

6.2.2.2 Obtención de los extractos soluble y membranoso de *N. brasiliensis*.

Se utilizó la técnica descrita por Bordier (Bordier, 1981) para separación de proteínas de membrana y solubles. En resumen, 200 μL de extracto crudo de *N. brasiliensis* se mezclaron con el mismo volumen de solución de separación (10 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1.0% Triton X-114) a 0°C. En un microtubo de 2.0 mL se depositaron 300 μL de solución colchón (6% [w/v] sacarosa; 10 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.06% Triton X-114) y luego se agregó la mezcla de proteínas lentamente y se incubó la suspensión a 25°C por 5 min o hasta que la mezcla mostrara un aspecto turbio. En ese momento, la suspensión se centrifugó a 300 g por 5 min a 25°C con rotor de columpio. La fase superior soluble se recuperó en un nuevo tubo, se agregó Tritón X-114 (concentración final 0.5%) y se incubó a 0°C hasta que se disolviera el detergente y la mezcla mostrara un aspecto claro. Después, se repitió la extracción con la solución colchón como se ha descrito. Por último, se recuperó de nuevo la fase

superior (acuosa) y se mezcló con Triton X-114 (concentración final 2%) y se incubó a 0°C hasta que se disolviera el detergente y la mezcla mostrara un aspecto claro. Luego, la mezcla se incubó a 25°C hasta que se enturbiara y se centrifugó como arriba (sin mezclar con solución colchón). La fase superior (acuosa) se transfirió a un nuevo microtubo y se almacenó a -20°C hasta su uso. Por otro lado, la fase del detergente del fondo del tubo (fase con las proteínas de membrana) de la primera extracción se transfirió a un microtubo nuevo y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.2.2.3 Obtención del filtrado de medio de cultivo de *N. brasiliensis*.

N. brasiliensis fue cultivada como se ha señalado en 6.2.1.1 Después de la centrifugación del medio de cultivo, se recuperó el sobrenadante, se le adicionó PMSF 100 µM y se filtró con membrana de nilón de 0.2 µm. Una alícuota del filtrado fue almacenada a -20°C hasta su uso mientras que el filtrado restante fue concentrado por per-evaporación de la manera siguiente. El filtrado fue transferido a microtubos de 2.0 mL estériles y colocados en un concentrador con vacío donde se centrifugaron a temperatura ambiente y con la tapa abierta. El filtrado fue concentrado de esta manera hasta que la muestra tuvo un volumen de 200 µL (se concentró ~5X) y luego fue almacenada a -20°C hasta su uso.

6.2.2.4 Visualización de la actividad SOD de *N. brasiliensis*.

La visualización de la actividad SOD de los extractos se realizó en gel según técnicas ya descritas (Beauchamp y Fridovich, 1971; Flohe, 1984). En resumen, se elaboró un gel discontinuo de poliacrilamida al 10% y en condiciones nativas (sin SDS) según protocolos convencionales (Sambrook, 2001), luego se realizó electroforesis de las muestras depositando 15 µg de proteínas totales de cada muestra por carril. La electroforesis se realizó en frío y con una corriente de 20 mA por (10 cm x 10 cm x 1 mm). Al término, el gel fue transferido a un contenedor con agua destilada e incubado a 25°C con agitación constante por 10 min; este paso se repitió una vez más. Luego, el gel fue incubado en 20 mL de solución de revelado I (1 mg/mL nitroazul de tetrazolio en dH₂O) en agitación constante y en oscuridad durante 20 min. Después, se realizó un breve enjuague del gel con dH₂O para después incubarlo en 20 mL de solución de revelado II (10 µg/mL riboflavina en amortiguador de fosfatos potásicos; TEMED 28 mM agregado justo antes de incubar) durante 20 min en agitación constante y en oscuridad. Finalmente, el gel fue expuesto a la luz solar y se esperó a que aparecieran poco a poco las bandas de actividad, en ese momento se desechó la solución de revelado y el gel se enjuagó con dH₂O. El gel se documentó mediante escaneo digital convencional.

6.2.2.5 Inhibición de la actividad SOD de *N. brasiliensis*.

Los ensayos de inhibición de la actividad SOD se realizaron a partir del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* concentrado ya obtenido. Como control de inhibición se corrieron en paralelo muestras de SodC bovina (Sigma), cuya actividad se inhibe en presencia de H₂O₂ y KCN por tratarse de una CuZnSod. Se normalizó la muestra de filtrado de cultivo a una concentración de 0.5 mg/mL y se corrieron dos ensayos a la par: uno en gel y otro con kit comercial. El ensayo en gel fue similar al ya descrito para la visualización de actividad SOD, con la adición de un paso de incubación por 20 min con los respectivos inhibidores H₂O₂, KCN y NaN₃ (10 mM concentración final de cada uno), previo a los pasos del revelado. Para el ensayo con kit, 30 µL de la muestra se incubaron por 20 min con los respectivos inhibidores (10 mM concentración final de cada uno) y luego se realizaron los pasos convencionales mencionados por el fabricante. La metodología para el análisis estadístico se menciona en el último apartado del capítulo.

6.2.2.6 Cuantificación de la actividad SOD de *N. brasiliensis*.

La cuantificación de la actividad SOD se realizó mediante kit comercial (Fluka Chemie) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se incluyeron los controles respectivos (SodC bovina). Los valores netos son dados en porcentaje de actividad SOD respecto a

los controles. Para el caso de las actividades SOD en los ensayos con incubación con metales y en los ensayos de inhibición, se realizaron pruebas estadísticas para determinar la significancia estadística de las diferencias encontradas. La metodología para el análisis estadístico se menciona en el último apartado del capítulo.

6.2.3 Clonación molecular del gen *sodA* de *N. brasiliensis*.

6.2.3.1 Extracción de ADN genómico de *N. brasiliensis*.

Se utilizó la técnica de extracción de ADN bacteriano en minipreparación (Ausubel, 1999). En resumen: se realizó un cultivo estándar de *N. brasiliensis* en 2 tubos del cultivo con 5 mL de medio BHI cada uno, el cultivo se transfirió a tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 5000 g por 10 min. La masa bacteriana fue resuspendida en 5 mL de solución salina (NaCl 0.9%) y homogenizada con ayuda de un *dounce*. La suspensión bacteriana se transfirió a microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 5000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y la masa bacteriana fue resuspendida en 400 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0), luego se adicionaron 30 μ L de SDS 10% y 5 μ L de proteinasa K 10 mg/mL y la suspensión se incubó a 37°C por 1 h con agitación constante. Luego se agregaron 100 μ L de NaCl 5 M y 80 μ L de solución CTAB/NaCl (CTAB 10%; NaCl 0.7 M) y se incubó la suspensión a 65°C por 10 min. Al término, se agregó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico

(24:1), se mezcló varias veces por inversión y se centrifugó a 5000 g por 10 min. El sobrenadante fue recuperado en un microtubo nuevo, se agregó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló varias veces por inversión y se centrifugó a 10000 g por 5 min. Se recuperó el sobrenadante en un microtubo nuevo y se realizó precipitación convencional con isopropanol y etanol 70%. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 100 µL de solución TE 1X y almacenado a -20°C hasta su uso.

6.2.3.2 Diseño de los iniciadores de amplificación.

Tomando como molde la secuencia parcial del gen *sodA* reportado por Revol *et al.* (2006), se realizó una búsqueda-alineamiento (BLAST) por internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) y se recuperaron aquellas secuencias con alto grado de homología y que pertenecieran a géneros bacterianos relacionados a *Nocardia* (se incluyeron *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Streptomyces*). Las secuencias fueron alineadas con el programa GenDoc y se seleccionaron aquellas regiones altamente conservadas que incluyeran los codones de inicio y terminación. Sobre estas regiones se elaboraron los iniciadores tomando aquellos nucleótidos consenso e introduciendo como máximo dos degeneraciones. Al final de cada iniciador se introdujo secuencias blanco para la enzimas de restricción *NsiI* y *HindIII* y a continuación, se calcularon las temperaturas medias de desnaturalización, la formación de asas y dímeros de iniciadores y los niveles de primabilidad y estabilidad, con los

programas Oligo y Amplify. Después de introducir los cambios pertinentes para la optimización de la amplificación virtual, se encargó la síntesis de los iniciadores a una concentración de 200 mM (Sigma). La secuencia de todos los iniciadores utilizados en este trabajo se mencionan en el apéndice A.

6.2.3.3 Amplificación del gen *sodA* de *N. brasiliensis*.

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el ADN genómico de *N. brasiliensis* y los iniciadores consenso diseñados en el apartado anterior. Se ensayaron varias condiciones de amplificación hasta optimizar el rendimiento del producto amplificado y ausencia de amplicones no deseados. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de la reacción y luego el gel se tiñó con bromuro de etidio para la visualización y verificación de las bandas de amplificación.

6.2.3.4 Obtención de la clona pZSAorf con el gen *sodA* de *N. brasiliensis*

El amplicón de la sección anterior fue purificado con kit comercial y ligado al vector pZErO-2 previamente digerido con la enzima de restricción EcoRV. La reacción de ligación se realizó con el kit T4 DNA ligase y siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de esta reacción (vector pZSAorf) fue utilizado para transformar una alícuota de *E. coli* calcio-competentes según técnicas convencionales (Sambrook, 2001). Las bacterias fueron sembradas en

placas petri con medio LB-agar suplementado con kanamicina 50 µg/mL e incubadas toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se recuperaron 8 colonias bacterianas, se sembraron en tubo de cultivo con medio LB líquido y se incubaron como en el paso anterior. A los cultivos resultantes se le realizó extracción de ADN plasmídico (miniprep) con técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2001).

6.2.3.5 Caracterización del vector pZSAorf.

Los plásmidos obtenidos de la sección anterior fueron caracterizados enzimáticamente mediante cortes con la enzima de restricción NsiI (que libera el inserto) para confirmar la presencia del inserto deseado. También se digirieron los plásmidos con las enzimas *Bgl*II y *Xho*I, para establecer la orientación del inserto respecto al vector. Una vez corroborado todo lo anterior, se encargó la secuenciación de 3 clonas para establecer la secuencia nucleotídica del gen *sodA* de *N. brasiliensis*.

6.2.3.6 Análisis *in silico* de la secuencia del gen *sodA* de *N. brasiliensis*.

La secuencia obtenida fue comparada contra otras secuencias ya reportadas de *sodA* con el programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y se realizaron diversas predicciones *in silico* sobre algunas características intrínsecas de la secuencia

aminoacídica con ayuda de programas en internet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>; <http://www.psort.org/psortb/>).

6.2.4 Generación de *N. brasiliensis* sodA⁻

6.2.4.1 Estrategia general.

Para la generación de una cepa de *N. brasiliensis* carente de actividad SOD (*sodA*⁻) se siguieron dos estrategias de inactivación génica. Una de ellas consistió en la interrupción del gen *sodA* del genoma bacteriano con ayuda de un vector de integración (sin replicación autónoma o “suicida”) que portara un gen seleccionable flanqueado por secuencias de *sodA* y que por tanto, se integrara al genoma interrumpiendo el marco de lectura de la enzima. La estrategia alterna estuvo basada en la producción de ARNm antisentido de *sodA* dentro de la bacteria del tal modo que el ARNm se hibridara con su opuesto y se bloqueara la traducción del mismo. Esto se lograría con la construcción de un vector de replicación autónoma que poseyera una secuencia antisentido para *SodA* regulada por un promotor funcional en *N. brasiliensis*. Para la construcción de los vectores se utilizaron genes de selección para resistencia a tetraciclina y gentamicina, a los cuales *N. brasiliensis* es conocida como sensible. A continuación se resume la metodología utilizada para la construcción de cada uno de ellos.

6.2.4.2 Construcción del vector de integración con resistencia a tetraciclina.

6.2.4.2.1 Amplificación del gen de resistencia a tetraciclina (*tet^R*).

Se realizó una PCR utilizando el vector comercial pBRR322 y los iniciadores diseñados *ex profeso* los cuales amplifican la región que abarca desde el promotor hasta el codón de terminación del gen *tet^R* y contienen sitios de restricción para *SacII*. Se ensayaron varias condiciones de amplificación hasta optimizar el rendimiento del producto amplificado y ausencia de amplicones no deseados. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de la reacción y luego el gel se tiñó con bromuro de etidio para la visualización y verificación de las bandas de amplificación.

6.2.4.2.2 Obtención del vector de integración con resistencia a tetraciclina.

Se utilizó el plásmido pNbrSODA obtenido por Marisol Espinoza Ruiz (2006) en su tesis doctoral, el cual contiene la secuencia parcial del gen *sodA* de *N. brasiliensis* incluyendo la secuencia de su promotor y que fue construido sobre el esqueleto del vector comercial pCR-XL-TOPO. Previa digestión con la enzima *SacII*, tanto el plásmido pNbrSODA como el amplicón *tet^R* fueron purificados con kit comercial y ligados con T4 ADN ligasa. El producto de esta reacción (pNbrSAT) fue transformado en *E. coli* y se seleccionaron las clonas por su resistencia a tetraciclina y kanamicina. Se recuperaron 4 colonias y se realizó extracción de ADN plasmídico para corroborar la construcción mediante cortes enzimáticos y secuenciación.

6.2.4.3 Construcción del vector con *sodA* antisentido con resistencia a tetraciclina.

Esta construcción se llevó a cabo en tres pasos. Primeramente, se realizó la clonación del gen *sodA* de *N. brasiliensis* en el vector comercial pBS-KS. Se seleccionaron varias clonas por sus resistencia a ampicilina y se verificó la construcción por cortes enzimáticos. Se seleccionó una clona (pBNbrSA) cuyo inserto tuvo su marco de lectura en sentido con el promotor *pm-lac* incluido en el esqueleto del vector comercial. Luego, pBNbrSA fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Bg*III y religado con T4 ADN ligasa. Como resultado, se obtuvo el plásmido pNBbrSAm el cual presentaba una secuencia de ~200-pb del gen *sodA* en contrasentido con su propio promotor (*pm-sod*) y con el promotor *pm-lac*. El segundo paso consistió en la subclonación de la construcción génica que abarca desde el *pm-lac* hasta el final del gen *sodA* en contrasentido (*pm-lac* → *pm-sod* → *sodA* antisentido) hacia el vector de replicación autónoma en *Nocardia* pNV18.0. Se realizó la selección de las clonas (pVASA) por su resistencia a kanamicina y se corroboró la presencia del inserto mediante caracterización enzimática. El último paso consistió en la clonación del gen *tet^R* en el plásmido pVASA corriente debajo de la secuencia *sodA* antisentido. Las clonas obtenidas (pVASAT) fueron seleccionadas por su resistencia a tetraciclina y kanamicina y se corroboró la construcción (*pm-lac* → *pm-sod* → *sodA* antisentido → *tet^R*) mediante cortes enzimáticos y secuenciación.

6.2.4.4 Obtención del vector de replicación autónoma con resistencia a gentamicina (gn^R).

Para la construcción de este vector se utilizó el plásmido pNV18.0 el cual contiene las secuencias *repA* y *repB* que habilitan la replicación autónoma del mismo en especies de *Nocardia*. Por otro lado, el vector pRU1701 contiene un gen de resistencia a gentamicina (gn^R) y un gen para proteína verde fluorescente (GFP) adyacente. El vector pNV18.0 fue digerido con la enzima *NheI* la cual separa los genes *repA* y *repB* del resto del plásmido. El vector pRU1701 fue digerido con la enzima *XbaI* la cual lineariza el vector justo en el sitio múltiple de clonación (MCS). Previa purificación de ambos digestos, se realizó una ligación de los productos con el fin de subclonar los genes *repA* y *repB* hacia el vector pRU1701. El producto obtenido fue transformado en *E. coli* y se seleccionaron las clonas por su resistencia a gentamicina. Se recuperaron 4 colonias con este vector (pRUAL) y se realizó extracción de ADN plasmídico para corroborar la construcción ($gn^R \leftarrow repB \leftarrow repA \rightarrow MCS \rightarrow gfp$) mediante cortes enzimáticos.

6.2.4.5 Construcción del vector de integración con resistencia a gentamicina.

6.2.4.5.1 Amplificación del gen de resistencia a gentamicina (gn^R).

Se realizó una PCR utilizando el vector comercial pRU1701 y los iniciadores diseñados *ex profeso* por María del Refugio Rocha Pizaña (2008) en su tesis doctoral, los cuales amplifican una región que abarca tanto el promotor

como la secuencia codificante del gen de resistencia a gentamicina (gn^R). Se ensayaron varias condiciones de amplificación hasta optimizar el rendimiento del producto amplificado y ausencia de amplicones no deseados. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de la reacción y luego el gel se tiñó con bromuro de etidio para la visualización y verificación de las bandas de amplificación.

6.2.4.5.2 Obtención del vector de integración con resistencia a gentamicina.

La estrategia fue similar a la utilizada para la construcción del vector de integración con resistencia a tetraciclina, salvo la inserción de gentamicina como gen de selección.

6.2.4.6 Construcción del vector con *sodA* antisentido con resistencia a gentamicina.

La estrategia fue similar a la utilizada para la construcción del vector con *sodA* antisentido con resistencia a tetraciclina, salvo la inserción de gentamicina como gen de selección.

6.2.4.7 Transformación de *N. brasiliensis*.

Se realizaron varios ensayos de transformación en *N. brasiliensis* con los vectores obtenidos. Las transformaciones se realizaron por electroporación y se ensayaron varias condiciones de transformación con la finalidad de optimizar la

obtención de clonas recombinantes. Las variables que fueron optimizadas fueron: diámetro de la celda, cantidad de corriente, cantidad de ADN, linearización del plásmido, medio de cultivo y crecimiento en condiciones anaeróbicas. Resumiendo, los pasos de la transformación fueron los siguientes (todos los pasos fueron realizados en frío): se tomó una alícuota de *N. brasiliensis* electrocompetente y se depositó en una celda de electroporación previamente enfriada (de 1 ó 2 mm de diámetro) y se agregó el ADN plasmídico (1, 2 ó 5 μg) mezclando la suspensión por pipeteo de manera suave, se ajustaron las condiciones del electroporador y se dio el pulso eléctrico. Inmediatamente, se depositó la suspensión bacteriana en un microtubo con 1 mL de medio (de BHI o de tioglicolato de sodio) y se incubó el cultivo durante toda la noche a 37°C con agitación suave (en condiciones normales para medio BHI y en condiciones anaeróbicas en medio de tioglicolato de sodio). Al día siguiente, el cultivo fue centrifugado a 1000 g por 5 min y se desechó la mitad del sobrenadante. El resto del cultivo fue resuspendido suavemente por pipeteo y fue sembrado en placas petri con medio (BHI o tioglicolato de sodio) suplementado con los antibióticos correspondientes, en los cuales se incluyeron los respectivos controles de viabilidad bacteriana. Las placas fueron incubadas durante 72 h a 37°C (aeróbica o anaeróticamente), luego se levantaron las colonias obtenidas, se sembraron en tubo de cultivo con 5 mL de medio (BHI o tioglicolato de sodio) suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron por 72 h a 37°C sin agitación (aeróbica o anaeróticamente).

6.2.4.8 Extracción de ADN plasmídico de *N. brasiliensis*.

A partir de los cultivos de *N. brasiliensis* obtenidos, se realizó extracción de ADN plasmídico mediante técnicas convencionales (lisis alcalina) en minipreparación (Sambrook y Russell, 2001). Los plásmidos obtenidos fueron evidenciados en gel de agarosa y se realizó PCR (para amplificar el gen *gn^R*) y así corroborar la identidad del vector.

6.2.5 Producción de SodA recombinante (rSodA) de *N. brasiliensis*.

6.2.5.1 Obtención del vector de expresión de rSodA (pSANBex).

Se realizó digestión del vector pZSAorf con las enzimas NsiI y HindIII de tal manera que el inserto fuera liberado y luego el producto de la digestión fue purificado con kit comercial. El vector de expresión comercial pBAD/HIS-A fue digerido con las enzimas *Pst*I y *Hind*III y luego purificado con kit comercial. Los productos purificados de ambas reacciones fueron ligados con T4 ADN ligasa y luego se transformó una alícuota de *E. coli* con los productos obtenidos. Las bacterias se sembraron en placas petri con medio LB-agar suplementado con 50 µg/mL de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se levantaron 8 colonias bacterianas, se sembraron en tubos de cultivo con medio LB suplementado con 50 µg/mL de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación constante. Los cultivos obtenidos fueron procesados para

obtener los ADN plasmídicos, los cuales fueron caracterizados enzimáticamente para corroborar la presencia del vector deseado.

La caracterización enzimática del vector de expresión (pSANBex) se realizó mediante cortes con *HindIII* y *XhoI*, las cuales separan el inserto *sodA* del esqueleto del vector. Las clonas que resultaron positivas en la caracterización enzimática fueron encargadas para su secuenciación, a fin de corroborar el correcto ensamblaje del marco de lectura. El vector pSANbex también fue introducido en la cepa LMG194 de *E. coli*. Finalmente, las clonas bacterianas con el vector pSANbex fueron procesadas para su almacenaje a -70°C según ya ha sido descrito.

6.2.5.2 Ensayo piloto para la expresión de rSodA.

Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de expresión de la proteína recombinante, primeramente se realizaron ensayos de producción a pequeña escala en tubos de cultivo. Las variables que se optimizaron incluyeron: cepa bacteriana, medio de cultivo, tiempo de incubación y cantidad de inductor.

A partir de las condiciones de base sugeridas por el fabricante (pBAD-HIS; Invitrogen), se realizó un ensayo piloto de expresión de rSodA, donde se probaron diferentes combinaciones de las variables mencionadas con la finalidad de optimizar la producción de la proteína recombinante. Para esto se utilizaron tubos de cultivo con 5 mL de medio ya sea LB o bien M9CA (suplementado con glucosa 0.2%, MgCl 2 mM, CaCl 0.1 mM) ambos adicionados con ampicilina 50

µg/mL. Unos y otros se sembraron con 10 µL de *E. coli* de la cepa TOP10, o bien, de la cepa LMG194, ambas con el vector de expresión pSANbex. Los tubos se incubaron durante 2 horas y luego se adicionaron con L-arabinosa (0.002% ó 0.02% ó 0.2%) a fin de inducir la expresión de la proteína. Los cultivos se incubaron de nuevo por 4 h ó 6 h más y luego fueron transferidos a microtubos de 1.5 mL y centrifugados a 5000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la masa bacteriana se recuperó para continuar con el aislamiento de la proteína recombinante.

6.2.5.3 Expresión de rSodA en condiciones optimizadas.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de producción de rSodA se procedió a escalar el cultivo a matraces. Para esto 10 µL de la clona pSANbex de *E. coli* TOP10 y se sembró en un tubo de cultivo y se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación constante. Se tomó 1 mL del cultivo obtenido y se sembró en matraces de 2 L con 500 mL de medio LB suplementado con glucosa (0.2% concentración final) y ampicilina 50 µg/mL y se dejó incubando a 37°C con agitación a 50 rpm durante 2 h. Luego, se adicionó al medio L-arabinosa (0.2% concentración final) y se dejó incubando por 4 h. más en las mismas condiciones. Al término, los cultivos fueron transferidos a tubos cónicos de 50 mL y centrifugados a 4000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la masa bacteriana se recuperó para continuar con el aislamiento de la proteína recombinante.

6.2.5.4 Determinación de la expresión de rSodA.

6.2.5.4.1 Obtención de los extractos soluble y no soluble de *E. coli* productora de rSodA de *N. brasiliensis*.

A fin de determinar la presencia de la proteína recombinante y si se mantenía en su forma soluble o se agregaba en cuerpos de inclusión, se realizó un ensayo de western blot a partir de los extractos soluble y no soluble de la masa bacteriana. Los extractos se obtuvieron de la manera siguiente. La masa bacteriana fue pesada previamente y el protocolo se estandarizó a partir de 1 g (peso húmedo) de bacterias. Se realizó un lavado de la masa bacteriana con PBS 1X, se resuspendió en 3 mL de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) suplementado con PMSF 100 mM y lisozima 10 mg/mL y se incubó durante 20 min en agitación a 4°C. Posteriormente, se agregó a la mezcla 4 g de ácido desoxicólico y se incubó a 37°C con agitación suave hasta que el lisado mostró una consistencia viscosa; en ese momento se agregó DNasa I 5µg/mL y RNasa 5 µg/mL y se prosiguió con la incubación hasta que el lisado perdiera la consistencia viscosa. Finalmente, el lisado fue centrifugado a 20000 g por 15 min a 4°C, se recuperaron tanto el sobrenadante como el precipitado y ambos se probaron para determinación de rSodA.

6.2.5.4.2 Western blot anti-His de los extractos soluble y no soluble.

Se realizó una PAGE-SDS 14% tanto del sobrenadante como del precipitado obtenidos del apartado anterior. Para esto, el precipitado se resuspendió en 300 μ L de buffer de corrimiento azul 6X, mientras que el sobrenadante se resuspendió en la misma solución en una relación de 1:6. Las muestras fueron calentadas a 100°C por 5 min y luego depositadas en el gel. Una vez terminada la electroforesis, el gel fue incubado en solución de transferencia (20 mM Tris base, 150 mM glicina, 20% metanol) con agitación suave durante 20 min. Luego, se realizó la electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa con poro de 0.2 μ m (Sigma) previamente incubada en solución de transferencia durante 10 min. La electrotransferencia se realizó con el método semi-húmedo durante 50 min un voltaje constante de 20V. Una vez terminada, el gel fue teñido con azul de Coomassie para corroborar que la transferencia se hubiese realizado correctamente. La membrana fue incubada en solución bloqueadora (PBS 1X; leche descremada 5% [Difco]) durante 1 h con agitación suave. Luego, la solución fue desechada y la membrana se incubó con el anticuerpo anti-polihistidinas conjugado con peroxidasa (anti-His-HRP, 1:5000) en solución PBST (PBS 1X; Tween 20 0.01%) durante 4 h en agitación suave. Al cabo, la solución con anticuerpo fue retirada y la membrana fue lavada 3 veces con solución PBST durante 10 min por lavado en agitación suave. Finalmente, la

membrana fue revelada con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno siguiendo técnicas convencionales.

6.2.5.5 Aislamiento de los cuerpos de inclusión de rSodA.

Se realizó el aislamiento de los cuerpos de inclusión según técnicas ya descritas (Sambrook, 2001). Resumiendo, el precipitado obtenido anteriormente fue lavado 2 veces con dH_2O y luego fue resuspendido en solución de lavado (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 4M urea; 5% Triton X-100) y homogenizado con ayuda de un minipistilo (este paso fue repetido 3 veces). Finalmente, la pastilla se disolvió con solución de solubilización (100 mM Tris-HCl pH 8.0; 6M GnHCl; 100 mM PMSF), se filtró la muestra en membrana de nilón de 0.45 μm y se procedió con la purificación con resina de afinidad.

6.2.5.6 Purificación de rSodA con resina de níquel.

Un volumen equivalente a 2.5 mL de resina de afinidad de níquel (Promega; Madison, WI, USA) fue equilibrada con la solución de unión (20 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 5M GnHCl, 5 mM β -ME, 10 mM imidazol, pH 8.0). Luego, se agregaron 2.5 mL del homogenizado de cuerpos de inclusión y se dejó en agitación suave y constante por 1 h a 25°C. Después, se desechó el sobrenadante y la resina fue lavada 10 veces con 2.5 mL de solución de lavado (20 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 5M GnHCl, 5 mM β -ME, 50 mM imidazol, pH 8.0) desechándose cada vez la solución después de 10 min de incubación. A

continuación, la proteína fue recuperada de la resina mediante dos eluciones de 2.5 mL de solución de elusión cada una (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 5M GnHCl, 5 mM β-ME, 500 mM imidazol, pH 7.0). Por último, el volumen eluido (~5 mL) fue dializado contra 1 L de dH₂O durante 24 h a 4°C con un recambio de agua cada 8 h. Para finalizar, la muestra fue concentrada por per-evaporación hasta un volumen final de 1 mL. La calidad y cantidad de la proteína purificada se determinó mediante SDS-PAGE 14% y se corroboró con ensayos de western blot anti-His-HRP como el ya mencionado.

6.2.6 Inmunogenicidad de rSodA de *N. brasiliensis*.

6.2.6.1 Estrategia general.

Para probar la inmunogenicidad de SodA de *N. brasiliensis* se realizaron dos ensayos. En uno, se determinó la inmunogenicidad de la proteína recombinante (rSodA) y en otro se determinó la inmunogenicidad de la proteína nativa durante la infección *in vivo* por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c.

6.2.6.2 Inmunogenicidad de rSodA de *N. brasiliensis*.

6.2.6.2.1 Obtención de los sueros hiperinmunes anti-rSodA

Dos ratones BALB/c fueron inmunizados en el cojinete plantar con 30 µg de la rSodA purificada en pasos anteriores y después de 15 días fueron nuevamente inmunizados con la misma cantidad de proteína. Al día 21 de la

primera inmunización, los animales fueron sacrificados y desangrados. La sangre recolectada fue procesada para obtener el suero que inmediatamente fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6.2.6.2.2 Western blot anti-rSodA de *N. brasiliensis*.

Se realizó una SDS-PAGE 12% donde se incluyeron: la rSodA purificada de *N. brasiliensis*, el extracto crudo de *N. brasiliensis*, el filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* y control de especificidad (antígeno P24 de *N. brasiliensis*). El gel fue procesado y transferido a membrana de nitrocelulosa como se ya se ha explicado. Una vez bloqueada, la membrana se incubó con solución PBST más el suero hiperinmune obtenido (1:100) y se dejó incubando por 1 h a 37°C con agitación suave. Al término, la solución con anticuerpos fue descartada y la membrana se lavó 3 veces con solución PBST desechando cada 5 min la solución de lavado. Luego, la membrana fue incubada con solución PBST más anticuerpo de borrego anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, DE, USA) durante 1 h a 37°C con agitación suave. Después, la membrana fue lavada otras 3 veces como ya se describió y se realizó el revelado con diaminobencidina o tetrametilbencidina y H₂O₂ con técnicas convencionales. Finalmente la membrana fue documentada mediante escaneo digital convencional.

6.2.6.2.3 Obtención de los sueros hiperinmunes anti-*N. brasiliensis*.

Dos ratones BALB/c fueron infectados en el cojinete plantar con 100 μ L de *N. brasiliensis* (1×10^7 UFC / mL) y se dejaron evolucionar durante un mes. Al término, se corroboró que los animales presentaran un actinomicetoma bien establecido y entonces, fueron sacrificados y desangrados. La sangre recolectada fue procesada para obtener el suero que inmediatamente fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6.2.6.2.4 Western blot anti-*N. brasiliensis*.

Se realizó una SDS-PAGE 12% donde se incluyeron: la rSodA purificada de *N. brasiliensis*, el antígeno P61 purificado de *N. brasiliensis*, y control de especificidad (albúmina sérica bovina). El gel fue procesado y transferido a membrana de nitrocelulosa como se ya se ha explicado. Desde aquí, se siguió el mismo protocolo que el señalado en el apartado 6.2.6.2.2 con la única diferencia de que se usó como primer anticuerpo el suero hiperinmune recolectado de los ratones con actinomicetoma.

6.2.7 Inducción de protección anti-micetoma por la rSodA de *N. brasiliensis*.

6.2.7.1 Estrategia general.

Para probar la capacidad inductora de protección de la rSodA contra el actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*, se realizó un ensayo de

inmunización activa con esta proteína. La inmunización se realizó en ratones BALB/c que posteriormente fueron infectados con la cepa virulenta *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358). La inducción de la protección se dedujo a partir de la capacidad de la inmunización para contrarrestar el desarrollo del micetoma en los ratones.

6.2.7.2 Esquema general de inmunización e infección.

Se utilizaron ratones hembras y machos de entre 10-12 semanas de edad. Los ratones fueron divididos en 4 grupos de 5 animales cada uno. Tanto las inmunizaciones como las infecciones fueron realizadas en el cojinete plantar trasero de los animales. Un grupo fue inmunizado con rSodA (30 µg) en una sola ocasión. Otro grupo fue inmunizado con rSodA y re-inmunizado otra vez con la misma proteína al cabo de 15 días desde la primera inmunización (con la misma dosis señalada). Un grupo más fue inmunizado con *N. brasiliensis* muerta por calor (1×10^6 UFC) como control positivo de protección. El último grupo fue inmunizado con adyuvante incompleto de Freund (AIF) como control negativo de protección. Todos los grupos fueron posteriormente infectados con *N. brasiliensis* y se dejaron en evolución durante 90 días, al cabo de los cuales los ratones fueron sacrificados. Durante este tiempo, se recolectó el suero de los animales en los días 0, 7, 15, 21, 30 y 90 y se midió el volumen de la lesión cada 7 días. Al final, se graficaron las medidas de las lesiones de todos ratones y se realizaron pruebas estadísticas señaladas en el apartado final del capítulo. En paralelo, se

determinaron los títulos de anticuerpos anti-rSodA y anti-extracto crudo de *N. brasiliensis* de los sueros de los ratones. También se realizaron gráficas y pruebas estadísticas para estas medidas (figura 5-1).

6.2.7.3 Preparación de los inmunógenos.

La rSodA fue preparada y purificada como ya se ha mencionado y luego se realizó una cuantificación de la proteína por el método de Bradford. Se preparó una emulsión con 30 μg de proteína en 50 μL de PBS 1X más 50 μL de AIF para un volumen final de 100 μL . Cada uno de los ratones de los grupos correspondientes fue inmunizado en el cojinete plantar con esta cantidad de inmunógeno

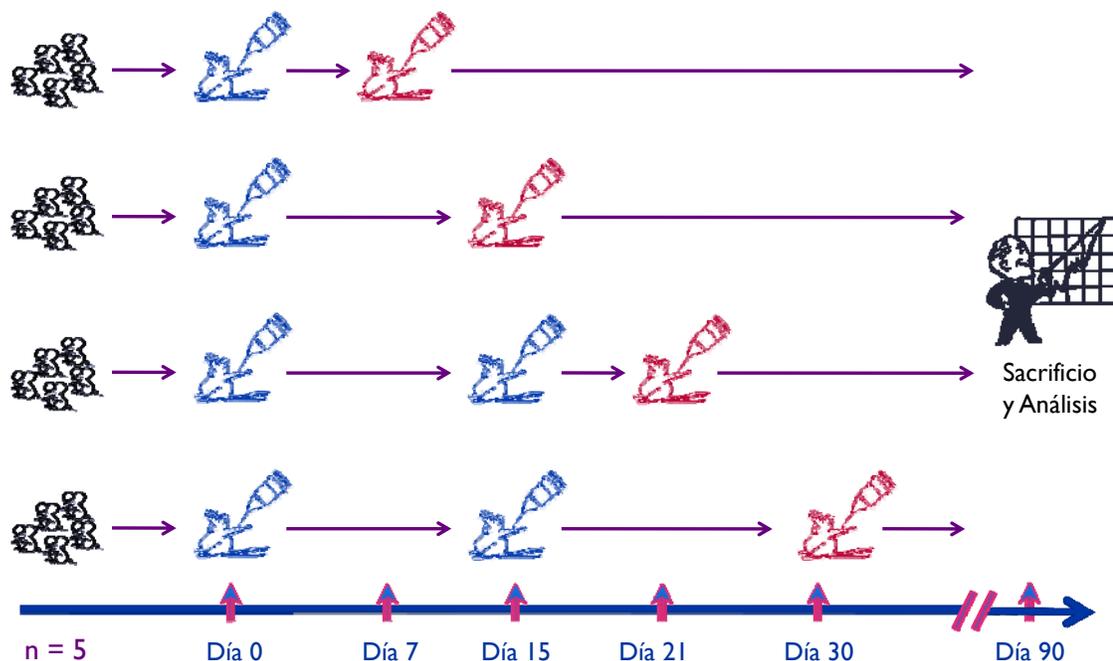


Figura 5-1. Esquema general de inmunización e infección. Cada uno de los grupos de inmunización (AIF, rSodA y BMC) estuvo formado por 5 ratones. Las imágenes en azul denotan los momentos de inmunización, la imágenes en rojo muestran los momentos de infección con *N. brasiliensis*. Los animales se observaron por un período de 90 días post infección.

Para la preparación de las bacterias muertas por calor se realizó un cultivo estándar de *N. brasiliensis* tal como ya se ha descrito. Previa homogenización de la masa bacteriana, la suspensión de *N. brasiliensis* fue ajustada a 1×10^7 UFC / mL según la técnica de Miles y Misra (1938) y luego se inactivaron por calor en autoclave durante 20 min a 121°C y 15 psi. Los ratones del grupo correspondiente fueron inmunizados en el cojinete plantar con 100 μ L de esta suspensión bacteriana (1×10^6 UFC total). Cada uno de los ratones del grupo control negativo fue inmunizado con 100 μ L de una emulsión preparada con 50 μ L de PBS 1X más 50 μ L de AIF.

6.2.7.4 Infección con *N. brasiliensis* en ratones.

La técnica de preparación del inóculo y de infección con *N. brasiliensis* para la inducción del actinomicetoma experimental en ratones fue la misma que se emplea convencionalmente en nuestro departamento y que fue establecida por Salinas-Carmona *et al.* (1996). Resumiendo, se realizó un cultivo estándar de *N. brasiliensis* como ya se ha descrito. Previa homogenización bacteriana en PBS 1X, la suspensión se ajustó a 1×10^7 UFC / mL y 100 μ L de esta suspensión fueron inoculados en el cojinete plantar de los animales.

6.2.7.5 Obtención de los sueros.

Los ratones fueron sangrados en el plexo retroorbitario a los días 0, 7, 15, 21, 30 y 90 a partir del día de las primeras inmunizaciones. La sangre se recolectó mediante pipetas Pasteur estériles y se colocó en microtubos, incubándolos a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo. Después, el suero fue recuperado y se realizó una mezcla de todos los sueros provenientes de los animales de cada grupo correspondiente y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.2.7.6 Medición de las lesiones plantares.

Las lesiones de los animales fueron medidas cada 7 días a lo largo de la evolución de la enfermedad. Esto se realizó calculando el volumen aproximado con ayuda de un vernier y utilizando la fórmula del volumen del elipsoide ($V = 4/3 \pi r_1 r_2 r_3$), donde r corresponde al radio de la lesión en sus secciones tridimensionales x , y y z .

6.2.7.7 Determinación de los títulos de anticuerpos.

La titulación de los anticuerpos anti-rSodA y anti- extracto crudo de *N. brasiliensis* (anti-Nbr) se realizó por el método de ELISA convencional. Se determinaron las subclases de anticuerpos IgG e IgM contra rSodA de *N. brasiliensis* y anticuerpos IgG contra extracto crudo de *N. brasiliensis*. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. En resumen, se depositaron 200 ng / 150 μL de

antígeno (rSodA o extracto crudo de *N. brasiliensis*) por pozo en placas para ELISA de 96 pocillos, la placa fue incubada a 37°C por 2 h sin agitación y luego se bloqueó durante 1 h con 200 µL de solución bloqueadora (PBS 1X; leche descremada 5%) por pozo. Al término, se desechó la solución bloqueadora. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con solución PBST y luego se realizó la incubación con los sueros de los ratones (con dilución 1:10 para determinación de IgG y de 1:5 para determinación de IgM) a razón de 150 µL por pozo. Las placas se incubaron a 37°C por 2 h en agitación suave, luego se descartó la solución con los sueros y se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con solución PBST. Se realizó dilución (1:10000 en solución PBST) del segundo anticuerpo (IgG o IgM, Santa Cruz Biotechnology) y se depositaron 150 µL por pozo, incubando la placa por 1 h a 37°C con agitación suave. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con solución PBST y luego otro lavado con solución de citratos (50 mM, pH 5.0) por 5 min. Finalmente, la ELISA fue revelada según técnicas convencionales con tetrametilbencidina y H₂O₂ y se tomaron las lecturas de absorbancia a 450 nm después de 5 min de incubación y previa inactivación de la reacción con H₂PO₄ 2M.

6.2.8 Análisis estadístico.

Se llevaron a cabo pruebas estadísticas para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratones analizados. Los análisis

se realizaron con las medidas de las lesiones de las patas de los animales y con los promedios de las lecturas de absorbancia obtenidas durante la titulación de anticuerpos. También se realizaron análisis para las diferencias encontradas en las actividades SOD con incubación con metales y con inhibidores. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5 y se incluyeron las siguientes pruebas: análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre todos los grupos y “*t*” de student para determinar las diferencias entre los grupos problema y el control. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue igual o menor que 0.05.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Actividad SOD de *N. brasiliensis*.

7.1.1 Actividad SOD en fases de crecimiento logarítmica y estacionaria.

Para corroborar la correcta elaboración de la técnica, se realizó un ensayo piloto de actividad SOD en gel donde se incluyeron extractos crudos de *E. coli*, *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. La tinción reveló la presencia de bandas de actividad SOD en todos los extractos ensayados. En el extracto crudo de *E. coli* se pudieron observar 3 bandas de actividad correspondientes a las MnSod, FeSod y el híbrido formado entre ambas (FeMnSod). Tanto el extracto de *N. asteroides* como el de *N. brasiliensis* mostraron una sola banda de actividad SOD. La banda de actividad SOD del extracto de *N. brasiliensis* tuvo un retraso mayor que la observada para *N. asteroides* (figura 7-1).

Se realizó cuantificación de proteínas por el método de Bradford a los extractos crudos de *N. brasiliensis* obtenidos a fin de normalizar la concentración de proteínas en cada una de las muestras. Una vez hecho esto, se llevó a cabo la detección de actividad SOD en gel con 15 µg de proteína por muestra. Una vez más, la tinción reveló la presencia de solamente una banda de actividad SOD, tanto en los extractos crudos celulares como en el filtrado de medio de cultivo

(figura 7-2). Esto fue cierto no importando si la muestra correspondió a la fase de crecimiento logarítmica (48 h) o a la estacionaria (120 h).

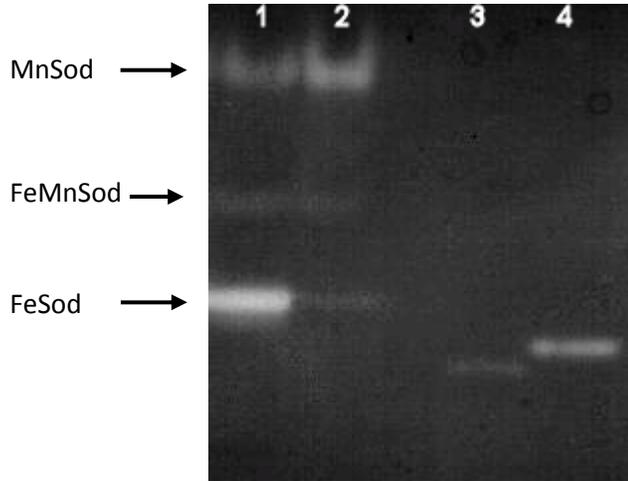


Figura 7-1. Ensayo piloto de actividad SOD. Gel de poliacrilamida nativo 8%. Extractos crudos celulares de: 1-2, *E. coli* TOP 10; 3, *N. asteroides*; 4, *N. brasiliensis*.

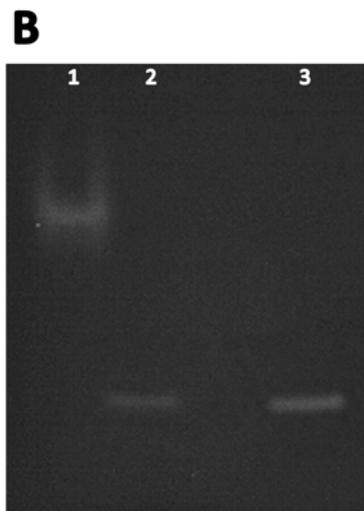
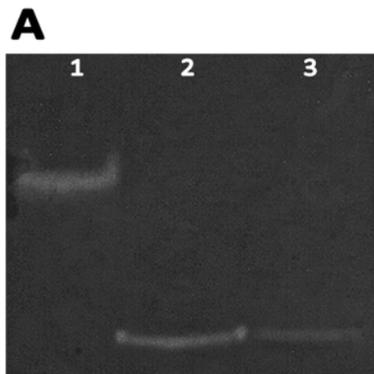


Figura 7-2. Actividad SOD en los extractos de *N. brasiliensis*. Gel de poliacrilamida nativo 8%. **A.** 1, SodC bovina purificada; 2, Extracto crudo celular de *N. brasiliensis* fase exponencial; 3, Filtrado de medio de cultivo de *N. brasiliensis* fase exponencial. **B.** 1, SodC bovina; 2, Filtrado de medio de cultivo de *N. brasiliensis* fase exponencial; 3, igual que 2 pero en fase estacionaria.

7.1.2 Actividad SOD en los extractos crudos soluble y membranoso.

Resultados similares a los anteriores fueron encontrados en los ensayos de actividad SOD realizados con los extractos de las particiones de fase soluble y membranosa. Solamente se evidenció una banda de actividad en la fase soluble (FS) pero no en la membranosa (FM). Lo mismo fue observado tanto en los extractos de *N. brasiliensis*, como en los de *N. asteroides* (utilizados como controles), sin importar si la fase de crecimiento fue exponencial o estacionaria (figura 7-3).

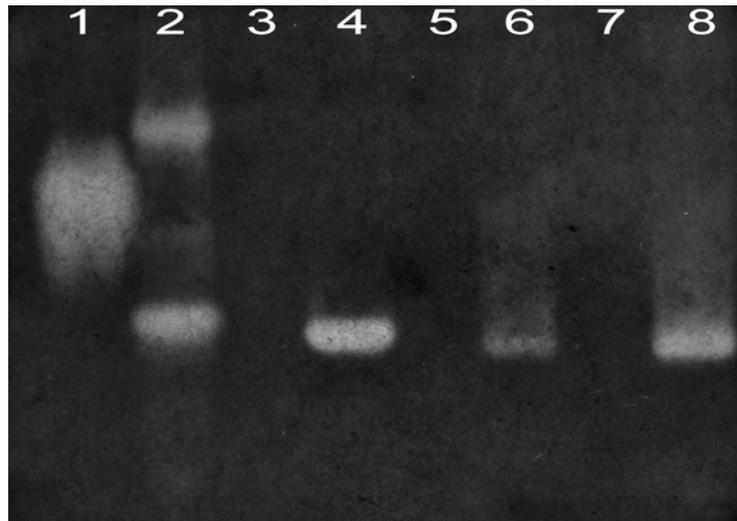


Figura 7-3. Actividad SOD de las fases soluble y membranosa de los extractos crudos de *N. brasiliensis*. Gel de poliacrilamida nativo 8%. 1, SodC bovina; 2, Extracto crudo soluble *E. coli* TOP10; 3, FM *N. asteroides* estacionaria; 4, FS *N. asteroides* estacionaria; 5, FM *N. brasiliensis* exponencial; 6, FS *N. brasiliensis* exponencial; 7, FM *N. brasiliensis* estacionaria; 8, FS *N. brasiliensis* estacionaria.

7.1.3 Actividad SOD en cultivos incubados con sales metálicas.

Los ensayos de actividad SOD en los extractos de *N. brasiliensis* incubadas con metales mostraron la presencia de solo una banda en la tinción en

gel, correspondiente a la actividad de SodA similar a la evidenciada en los ensayos anteriores (figura 7-4). No se observó ninguna actividad SOD adicional en ninguno de los casos. Tampoco se observó incremento estadísticamente significativo en la actividad SodA comparada con el control en ninguna de las muestras. En contraste, las actividades SodA en aquellos extractos obtenidos de cultivos incubados con Cu, Zn, o la combinación de ambos, mostraron una disminución estadísticamente significativa (~35-45 %) comparada con la del extracto control del cultivo incubado sin ningún metal. También se encontró una disminución de la actividad en los extractos incubados con Mn, pero sin significancia estadística (Figura 7-5).

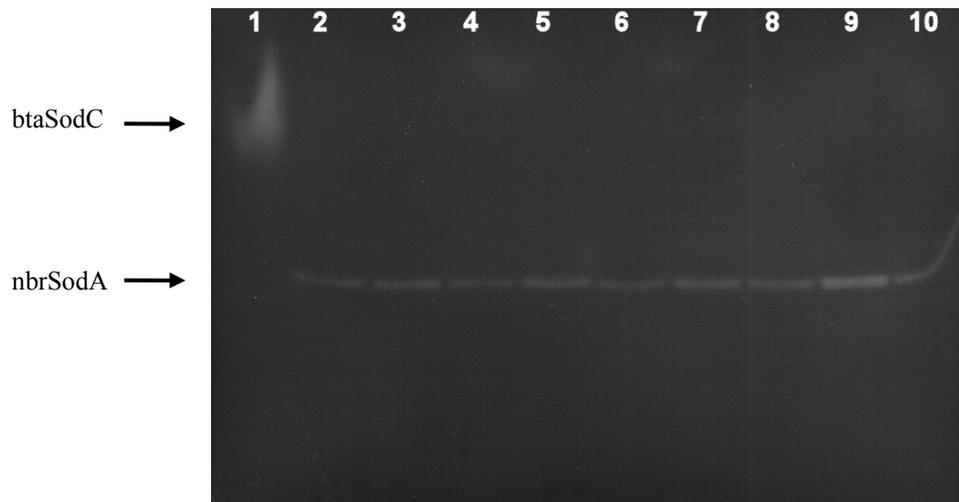


Figura 7-4. Actividad SOD en gel de extractos crudos de *N. brasiliensis* incubadas con sales metálicas (concentración final de 100 μ M de cada una). Gel de poliacrilamida nativo 8%. En cada carril se depositaron 20 μ g de cada uno de los extractos crudos para cada metal. 1, SodC bovina; 2, con todos los metales; 3, sin metales; 4, cobre; 5, hierro; 6, manganeso; 7, níquel; 8, zinc; 9, hierro + manganeso; 10. cobre + zinc.

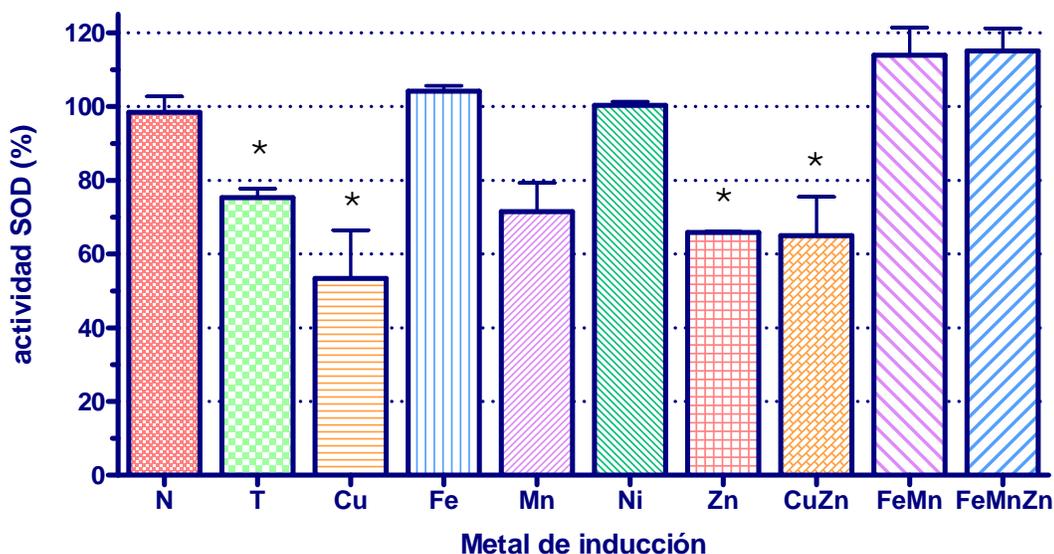


Figura 7-5. Cuantificación de la actividad SOD en extractos crudos de *N. brasiliensis* incubadas con sales metálicas (concentración final de 100 μ M de cada una). Los extractos crudos fueron ensayados por triplicado (15 μ g cada uno). La actividad se cuantificó mediante kit comercial (N: sin metales; T: con todos los metales). Los asteriscos señalan las diferencias significativas respecto al control N (*t*

7.1.4 Actividad SOD en extractos incubados con calor.

Los ensayos de actividad de las muestras incubadas con calor, mostraron que la SodA de *N. brasiliensis* conserva su actividad hasta temperaturas de 70°C y además es activa con concentraciones de hasta 0.1% SDS, a la cual se ensayó en el gel (Figura 7-6).

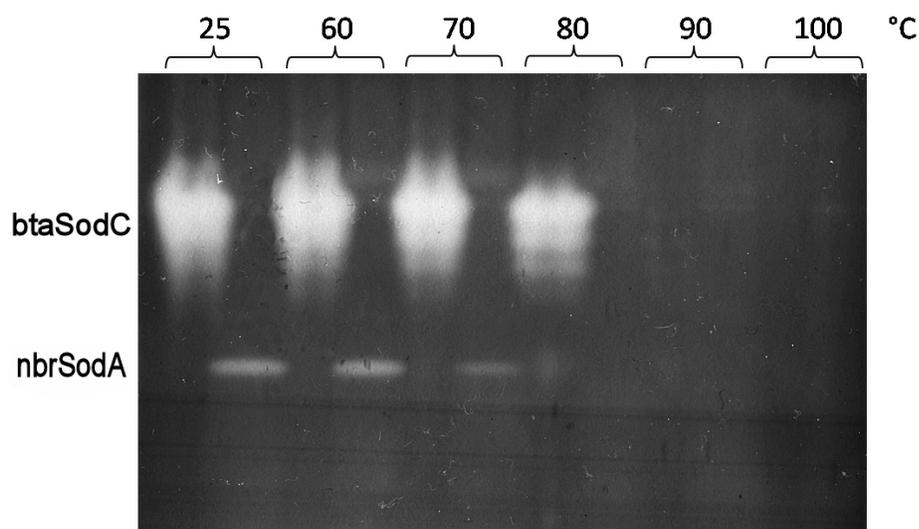


Figura 7-6. Actividad SOD en filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* incubado con calor. El filtrado de cultivo celular de *N. brasiliensis* fue concentrado 5X. Se cargaron 15 μ g de proteína total por muestra (btaSodC: sod bovina; nbrSodA: SodA de *N. brasiliensis*).

7.1.5 Actividad SOD en extractos incubados con inhibidores.

Los ensayos realizados a las muestras incubadas con cada uno los inhibidores revelaron inhibición parcial y significativa de la actividad SOD (disminución del 40-50 %, respecto al control) en todas las muestras excepto en aquellas incubadas con H_2O_2 y NaN_3 , donde no se observó disminución alguna de la actividad. Se incluyeron muestras de SodC bovina como control de inhibición (Figura 7-7).

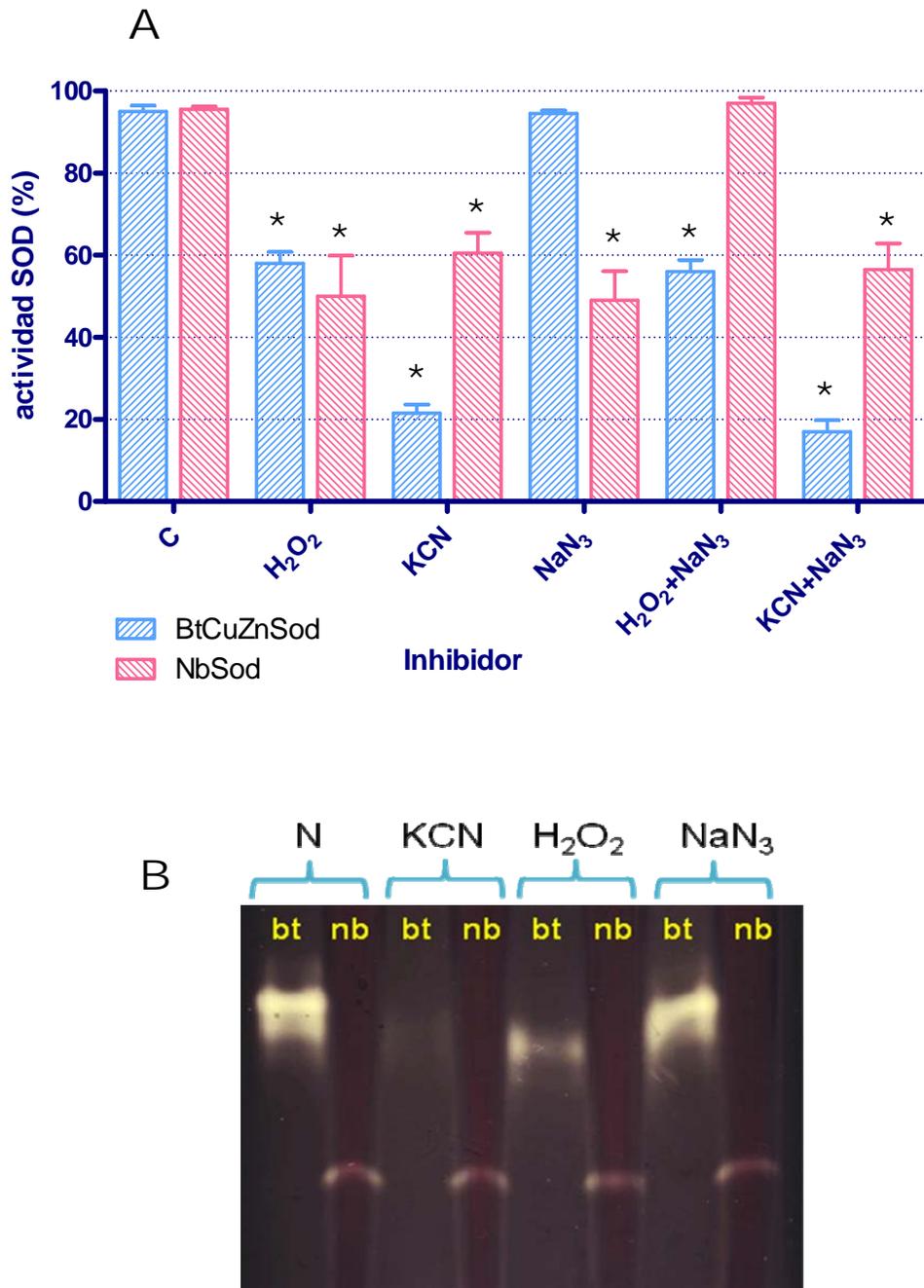


Figura 7-7. Actividad SOD en filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* incubado con inhibidores. Se ensayaron 15 μ g de proteínas totales del filtrado de cultivo de *N. brasiliensis* concentrado 5X. **A.** La actividad se cuantificó mediante kit comercial. Las muestras fueron procesadas por triplicado (C: control sin inhibidor). Los asteriscos señalan las diferencias significativas respecto a C (*t* de student; $p \leq 0.05$). **B.** Inhibición en gel (bt: SodC bovina; nb: filtrado de cultivo de *N. brasiliensis*).

7.2 Clonación del gen *sodA* de *N. brasiliensis*.

7.2.1 Amplificación del gen *sodA*.

La reacción de PCR para la amplificación del gen *sodA* se optimizó utilizando las condiciones descritas en la tabla 7-1.

Tabla 7-1A: Condiciones de PCR para la amplificación de *sodA* de *N. brasiliensis*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Amortiguador 5X	1X
dNTPs 10 mM	200 μ M
Iniciador SODAorf 5 μ M	0.5 μ M
Iniciador SODAfin 5 μ M	0.5 μ M
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
Accuzyme DNA polymerase 1 U/ μ L	1 U/50 μ L
ADNg	100 ng/50 μ L
Agua miliQ	cbp 50 μ L

Tabla 7-1B: Condiciones de PCR para la amplificación de *sodA* de *N. brasiliensis*.

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	30	32
Alineamiento	58	30	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

La tinción con bromuro de etidio del gel de electroforesis del producto de la reacción mostró la presencia de una banda única con el tamaño esperado de 624-pb. El amplicón se caracterizó enzimáticamente mediante cortes con *SalI* (475 y

149 pb), *SacII* (344 y 280 pb) y *PstI* (362, 144 y 118 pb), obteniéndose las bandas esperadas correspondientes con la identidad del gen *sodA* (figura 7-8).

7.2.2 Clonación de *sodA* en el vector de clonación pZErO-2.

El gen *sodA* se clonó satisfactoriamente en el vector de clonación comercial pZErO-2. Se obtuvieron varias clonas (pZSAorf) con el inserto en ambas direcciones, lo cual fue corroborado con cortes enzimáticos y secuenciación (figura 7-9).

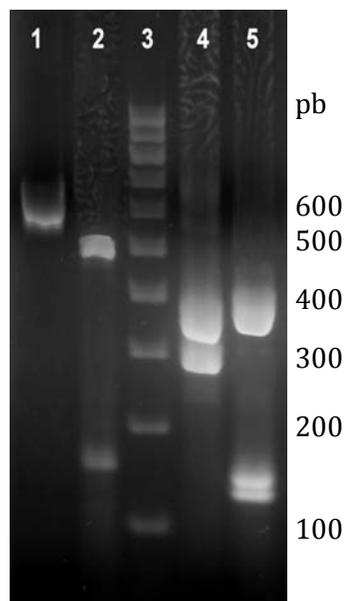


Figura 7-8. Caracterización enzimática del amplicón *sodA*. 1, *sodA* sin digerir; 2, *sodA* + *SalI*; 3, marcador (escalera 100-pb); 4, *sodA* + *SacII*; 5, *sodA* + *PstI*

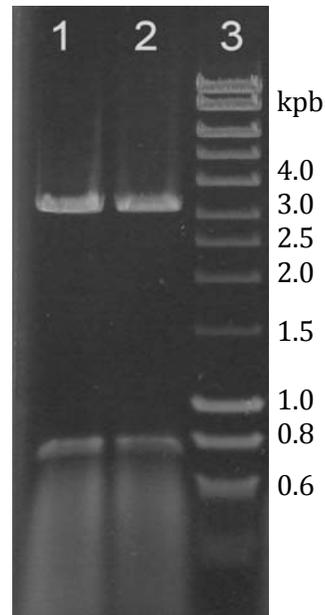


Figura 7-9. Caracterización enzimática del plásmido pZSAorf. 1-2, pZSAorf + *NsiI* (se libera el inserto de *sodA* más el sitio de policlونación del vector ~700-pb); 3, marcador (escalera 1000-pb).

7.3 Análisis de secuencia de SodA de *N. brasiliensis*.

7.3.1 Análisis nucleotídico.

La secuencia nucleotídica final del gen *sodA* de *N. brasiliensis* fue consensuada a partir de las secuencias obtenidas de tres diferentes clonas que se mandaron secuenciar. El gen *sodA* consta de 624-pb desde el codón de inicio (GTG) hasta el de terminación (TGA). La secuencia nucleotídica muestra alta homología con las secuencias de otras *sodA* reportadas dentro del género *Nocardia*, pero la homología es variable con respecto a secuencias de otros géneros del orden *Actinomycetales* (tabla 7-2).

Se obtuvo parcialmente la secuencia promotora del gen y el análisis comparativo con otras secuencias reportadas muestran que al menos la región promotora -10 (GCCCGACA) y la región de unión a ribosomas (AGGAAG) se encuentran conservadas dentro del género *Nocardia*, tal como se observa con la región codificante del gen.

Tabla 7-2. Homología del gen *sodA* de *N. brasiliensis* con el de especies relacionadas.

HOMOLOGÍA	DNA (%)	PROTEÍNA (%)
<i>N. asteroides</i> GUH2	91	95
<i>N. farcinica</i> IFM10152	90	96
<i>M. avium</i> K-10	82	84
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	77	77
<i>C. diphtheriae</i> NCTC13129	68	65
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	66	56

La secuencia de *sodA* de *N. brasiliensis* fue depositada en el GenBank con el número de acceso DQ402038.

7.3.2 Análisis aminoacídico.

El gen *sodA* de *N. brasiliensis* codifica para 207 aminoácidos los cuales corresponden con un peso molecular teórico de ~23-kDa. Tal como se observó con la secuencia nucleotídica, el análisis de la secuencia aminoacídica de Soda de *N. brasiliensis* reveló una gran similitud con las secuencias de Soda reportadas para otras especies del género. La homología fue del 95% para *N. asteroides* GUH2 y del 96% para *N. farcinica* IFN10152. En contraste, la homología mostrada contra géneros relacionados fue más bien baja (tabla 7-2). Los aminoácidos His28, His76, His164, Asp160 determinantes de los sitios activos de la enzima se encuentran conservados en la secuencia. Asimismo, se encuentra presente el aminoácido asociado a unión a manganeso Gln145, al igual que Tyr36 asociado a unión a hierro como grupo prostético (figura 7-10).

7.3.3 Análisis *in silico*.

La secuencia aminoacídica de Soda se introdujo a los servidores de análisis *in silico* señalados en la metodología, los cuales mediante algoritmos y bases de datos preestablecidos, calculan las probabilidades del apartado correspondiente.

```

                                *
nbrSODA : MAEYTLPLDLDYDYSALEPHISGQINELHHSKHHAA : 35
nasSODA : ..... : 35
nfaSODA : ..... : 35
mavSODA : .....A.....T : 35
mtbSODA : .....G.....T : 35

                                +
nbrSODA : YVAGANTALEKLEAARES GDHGAIFLYEKNLAFHL : 70
nasSODA : .....A...S...H..... : 70
nfaSODA : .....Q.....S..... : 70
mavSODA : ..K.V.D..A...E..ANE..A...N..... : 70
mtbSODA : ..K...D..A...E..AKE..S..L.N.....N. : 70

                                *
nbrSODA : GGHVNHHSIWKNLSPNGGDKPVGELAAAI DDQFGS : 105
nasSODA : ..... : 105
nfaSODA : ..... : 105
mavSODA : .....T.....A... : 105
mtbSODA : A.....T.....A.A... : 105

nbrSODA : FDKFRGQFTAANG LQGSGWAVLGYDTLGQKLLTF : 140
nasSODA : .....A..... : 140
nfaSODA : .....A..... : 140
mavSODA : .....A.....S..... : 140
mtbSODA : .....A..H...TT.....A.....N...I. : 140

                                +                                *      *
nbrSODA : QLYDQQANVPLGI I PLLQVDMWEHAFYLQYKNVKA : 175
nasSODA : ..... : 175
nfaSODA : ..... : 175
mavSODA : ..... : 175
mtbSODA : ....H.T.F.....L.....V : 175

nbrSODA : DYVTAFWNVVNWEDVQERFARAVSQGKGLFFG : 207
nasSODA : .....A...D..G...N.....I.. : 207
nfaSODA : .....A...D.....N.....V.- : 206
mavSODA : ...K.....A...K...A.T.KAQ..I.. : 207
mtbSODA : ..AK.....A...S...A.T..T...I.. : 207

```

Figura 7-10. Alineamiento aminoacídico de SodA de *N. brasiliensis* contra SODs de especies relacionadas. (Ver página siguiente). Solamente se muestran las diferencias con la secuencia de SodA de *N. brasiliensis*. Los asteriscos (*) marcan los aminoácidos determinantes del sitio activo de la enzima. Los signos de suma (+) marcan los aminoácidos implicados en la unión a metales específicos. (nbr: *N. brasiliensis*; nas: *N. asteroides*; nfa: *N. farcinica*; mav: *M. avium*; mtb: *M. tuberculosis*).

El análisis de predicción acerca de la localización de la proteína con el programa pSORTb v. 2.0, mostró que la SodA tiene una localización extracelular (con una puntuación de 9.97 sobre 10.00) casi en su totalidad (cuadro 7-1). La predicción de péptidos señaladores de exportación realizada con el programa SecretomeP 2.0, mostró que la secuencia de SodA no cuenta con secuencias de péptido señal conocidas y tampoco pudo establecer su entrada a rutas no clásicas de secreción (cuadro 7-2). Esto fue apoyado también por la predicción del programa SignalIP 3.0 que mostró una probabilidad nula para la presencia de alguna señal de corte para peptidasas. Mediante el programa CPHmodels se realizó una reconstrucción teórica de la estructura tridimensional de rSodA a partir de la secuencia aminoacídica. Algunos fotogramas se exponen en el apéndice B.

Cuadro 7-1. Resultados de predicción *in silico* del programa pSORTb.

Localization Scores:	
Cytoplasmic	0.01
CytoplasmicMembrane	0.00
Cellwall	0.02
Extracellular	9.97
Final Prediction:	
Extracellular	9.97

Cuadro 7-2. Resultados de predicción *in silico* del programa SecretomeP.

Non-classically secreted proteins should obtain an NN-score exceeding the normal threshold of 0.5, but not at the same time be predicted to contain a signal peptide.				
Network 1 name	Network 2	Network 3	SecP score	Sequence
-----	-----	-----	-----	-----
0.284144	0.234154	0.467795	0.328698	nbrSODA

7.4 Generación de *N. brasiliensis* *sodA*⁻.

7.4.1 Amplificación del gen de resistencia a tetraciclina (*tet*^R).

La reacción de PCR para la amplificación del gen *tet*^R se optimizó utilizando las condiciones descritas en la tabla 7-3. El gen fue luego clonado en el vector pZErO-2 para comprobar su compatibilidad con plásmidos de alto número de copias (figura 7-9), obteniéndose el vector pZTET (4653 pb) con resistencia a tetraciclina y kanamicina.

Tabla 7-3A: Condiciones de PCR para la amplificación de *tet*^R.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Amortiguador 5X	1X
dNTPs 10 mM	200 μM
Iniciador TET1 5 μM	0.5 μM
Iniciador TET2 5 μM	0.5 μM
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
Accuzyme DNA polymerase 1 U/μL	1 U/50 μL
ADN (pBR322)	50 ng/50 μL
Agua miliQ	cbp 50 μL

Tabla 7-3B: Condiciones de PCR para la amplificación de *tet*^R.

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	120	1
Desnaturalización	94	30	32
Alineamiento	56	40	
Extensión	72	180	
Extensión final	72	300	1

7.4.2 Construcción del vector de integración con resistencia a tetraciclina.

El gen de selección *tet^R* fue satisfactoriamente subclonado en el plásmido pNbrSODA mediante su inserción en el sitio *Sac*II del gen de *sodA* de *N. brasiliensis* (figura 7-11). De esta manera se obtuvo el vector pNbrSAT (5492-pb) en el cual la secuencia del gen *sodA* fue interrumpida con el gen de selección, lo cual se comprobó por caracterización enzimática (figura 7-12).

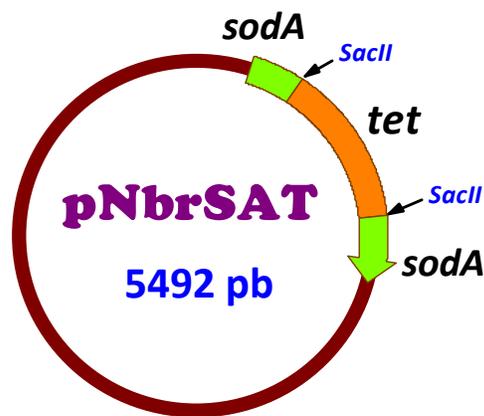


Figura 7-11. Esquema del vector de integración con resistencia a tetraciclina pNbrSAT. El gen *sodA* de *N. brasiliensis* fue interrumpido por inserción del gen *tet^R* subclonado en el sitio *Sac*II.

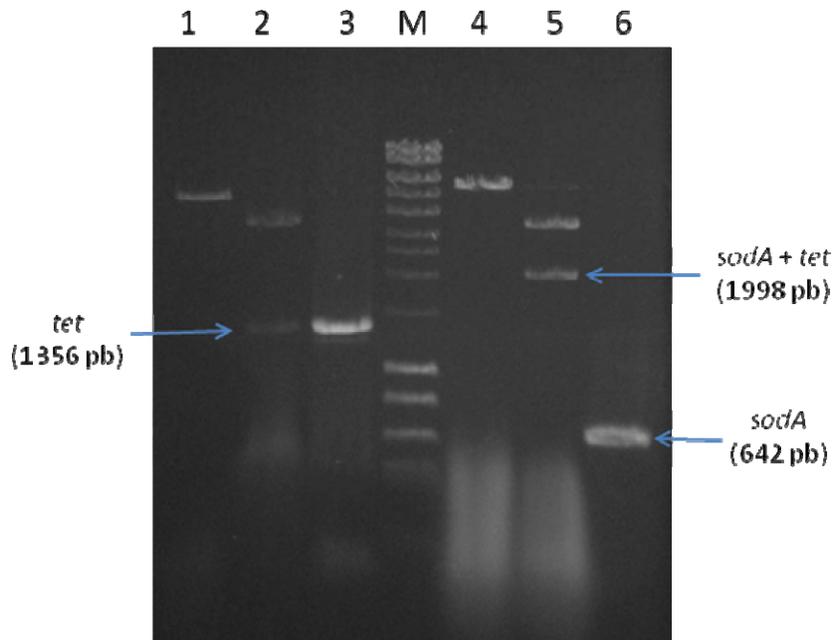


Figura 7-12. Caracterización enzimática de los vectores pZTET y pNbrSAT. 1, pZTET linearizado con *Eco*RI; 2, pZTET + *Sac*II que libera el inserto del gen *tet^R*; 3, producto amplificado del gen *tet^R*; M, marcador (escalera 1000-pb); 4, pNbrSAT linearizado con *Kpn*I; 5, pNbrSAT + *Nsi*I que libera el inserto de *sodA* mas *tet^R*; 6, producto amplificado de *sodA*.

7.4.3 Construcción del vector con *sodA* antisentido con resistencia a tetraciclina.

Después de varias subclonaciones fue posible obtener el vector pVASAT (6024-pb) el cual posee un segmento de la secuencia del gen *sodA* de *N. brasiliensis* en antisentido tanto para el promotor del gen de la β -galactosidasa (*pm-lac*) como para el promotor nativo de *sodA* de *N. brasiliensis* (*pm-sod*) (figura 7-13). Este plásmido posee además del gen para resistencia a tetraciclina (*tet^R*) y kanamicina/neomicina (*aph*), orígenes de replicación tanto para *E. coli* (pMB1) como para *Nocardia* (RepA/RepB). La identidad se confirmó por caracterización enzimática (figura 7-14).

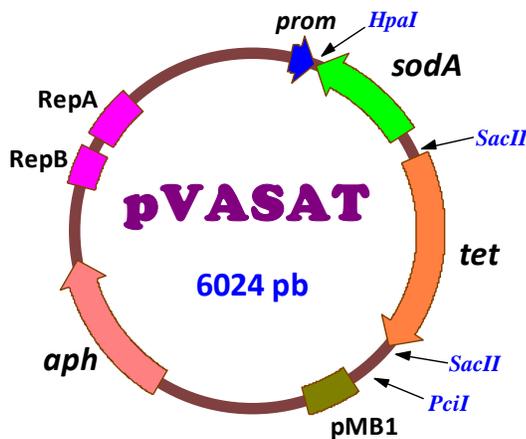
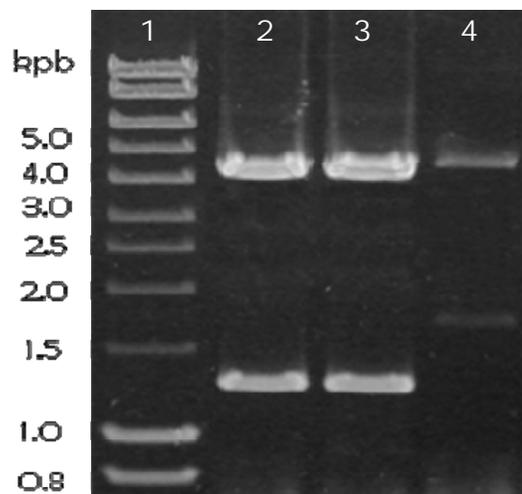


Figura 7-14. Caracterización enzimática del vector pVASAT.
1, marcador (escalera 1000-pb); 2-3, pVASAT + *SacII* (libera gen *tet^R*); 4, pVASAT + *HpaI* + *PciI* (libera *sodA* + *tet^R*).

Figura 7-13. Esquema del vector *sodA* antisentido con resistencia a tetraciclina pVASAT. El gen *sodA* de *N. brasiliensis* se encuentra en contrasentido frente a su promotor nativo.



7.4.4 Construcción del vector de replicación autónoma con resistencia a gentamicina (gn^R).

Se obtuvo el vector pRUAL (7097-pb) por subclonación del origen de replicación para *Nocardia* del plásmido pNV18.0 hacia el vector pRU1701. Esto condujo a que el vector obtenido poseyera orígenes de replicación para *E. coli* (pMB1) y *Nocardia* (RepA/RepB) además del gen de resistencia a gentamicina. El vector también contiene el gen para una proteína verde fluorescente (GFP) pero carente de promotor y por tanto no se expresa (figura 7-15). Se realizó caracterización enzimática para confirmar la identidad del vector (figura 7-16).

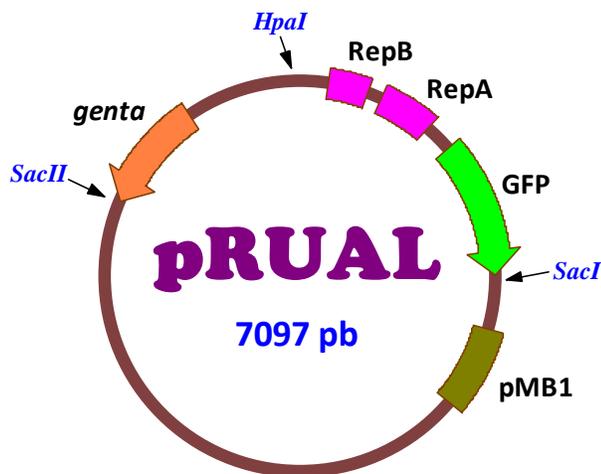


Figura 7-15. Esquema del vector con resistencia a gentamicina pRUAL. Este vector funciona como acreador al poseer orígenes de replicación para *E. coli* y *Nocardia*.

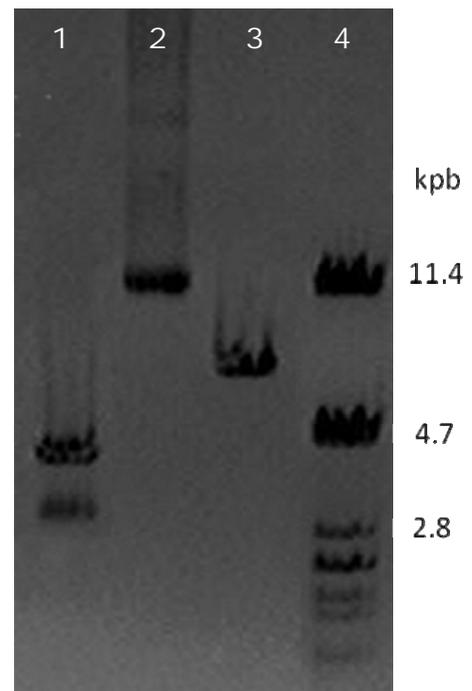


Figura 7-16. Caracterización enzimática del vector pRUAL. 1, pRUAL + *SacI* + *SacII*; 2, pRUAL (sin corte); 3, pRUAL + *HpaI* (linearizado); 4, marcador (λ . + *PstI*)

7.4.5 Construcción de los vectores de integración y *sodA* antisentido con resistencia a gentamicina.

Además de la estrategia utilizada para la construcción de los vectores con resistencia a tetraciclina, se ensayaron otras más con la finalidad de construir los vectores resistentes a gentamicina capaces de bloquear el gen *sodA* de *N. brasiliensis*. Infortunadamente, no se logró obtener vectores con estas construcciones en ninguno de los casos.

7.4.6 Transformación de *N. brasiliensis* con los vectores con resistencia a tetraciclina.

Se llevaron a cabo múltiples intentos de transformación en *N. brasiliensis* (y también en *N. asteroides* utilizada como control) tanto con el vector de integración como con el vector antisentido. Aunque se ensayaron varias combinaciones de las variables descritas en la metodología, no fue posible obtener una sola clona transformada en *Nocardia*.

7.4.7 Transformación de *N. brasiliensis* con el vector con resistencia a gentamicina.

Se logró la transformación de *N. brasiliensis* con el vector pRUAL con las condiciones descritas en la tabla 7-4. Además de la resistencia a gentamicina mostrada por la bacteria, la transformación fue corroborada mediante PCR (tabla 7-5) del ADN total (plasmídico y genómico) extraído de las clonas obtenidas, en

la cual se obtuvo el producto esperado para el gen gn^R (figura 7-17). Cabe recalcar que la eficiencia de la transformación fue muy baja en el mejor de los casos ($< 10 \times 10^1$ transformantes/ μg ADN).

Tabla 7-4. Condiciones de transformación de *N. brasiliensis* con el vector pRUAL.

VARIABLE	CONDICIÓN
Método de transformación	Electroporación
Medio de electroporación	Glicerol 10%
Corriente eléctrica	12.5 kV/cm
Tiempo de pulso eléctrico	~5 ms
Diámetro de celda	2 mm
Cantidad de ADN (pRUAL)	2 μg
Volumen de bacterias	200 μL

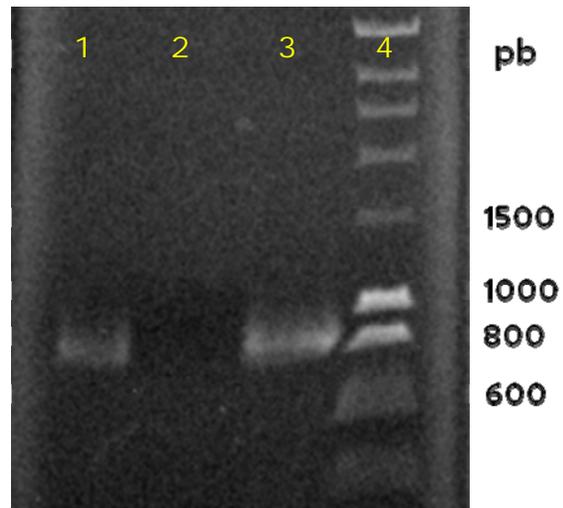
Tabla 7-5A: Condiciones de PCR para la amplificación de gn^R .

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Amortiguador 5X	1X
dNTPs 10 mM	200 μM
Iniciador PCR 5 μM	0.5 μM
Iniciador PCF 5 μM	0.5 μM
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
Accuzyme DNA polymerase 1 U/ μL	1 U/50 μL
ADN total	100 ng/50 μL
Agua miliQ	cbp 50 μL

Tabla 7-5B: Condiciones de PCR para la amplificación de gn^R .

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	30	32
Alineamiento	57	40	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

Figura 7-17. Amplicones del gen gnR en *N. brasiliensis* transformadas con pRUAL. Se realizó PCR a partir del ADN total de las bacterias. 1, *N. brasiliensis* transformada; 2, *N. brasiliensis* sin transformar; 3, pRUAL (control de amplificación); 4, marcador (escalera 1000-pb).



7.5 Expresión de *rSodA* de *N. brasiliensis*.

7.5.1 Clonación de *sodA* en vector de expresión.

El inserto del vector pZ23SA (*sodA* de *N. brasiliensis*) fue subclonado satisfactoriamente en el vector de expresión pBAD-HIS A. Se levantaron varias clonas y se corroboró el marco de lectura abierto tanto con cortes enzimáticos como por secuenciación de los plásmidos (Figura 7-18). Los vectores obtenidos pSANBex (4746-pb) mostraron la presencia de la región codificante del gen *sodA* de *N. brasiliensis* en fase con el marco de lectura del esqueleto del vector de expresión, el cual agrega una marca de polihistidinas al inicio de la traducción. La expresión de la proteína recombinante se encuentra bajo regulación del promotor P_{BAD} que se activa en presencia de L-arabinosa.

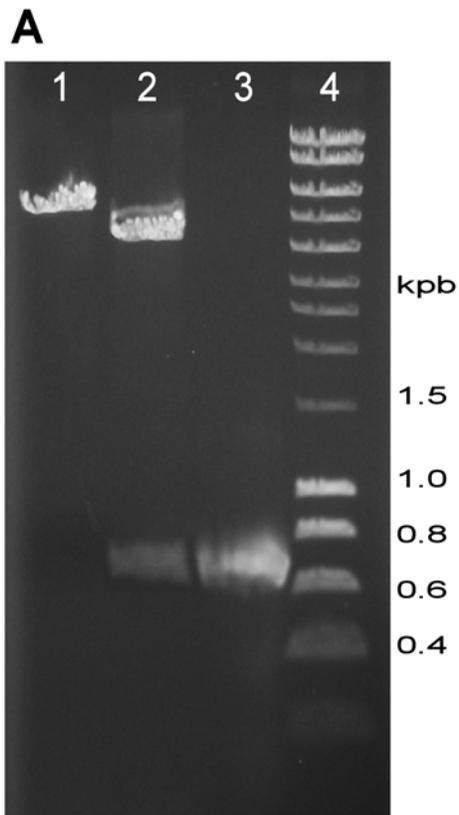
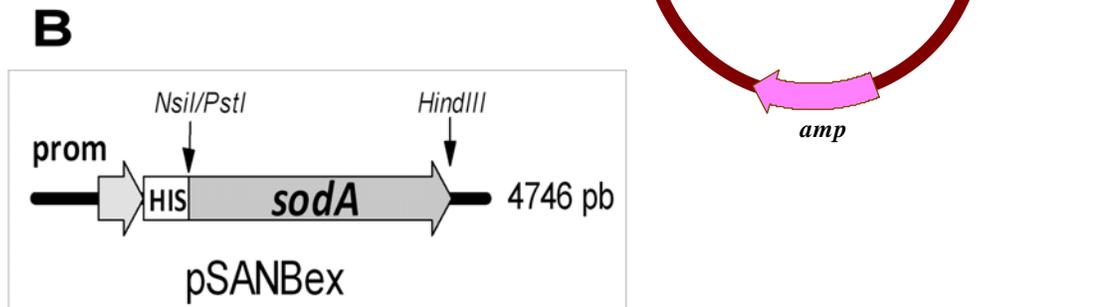


Figura 7-18. Construcción del vector pSANBex productor de SodA recombinante de *N. brasiliensis*. A. Caracterización enzimática (1, pSANBex + *Xho*I; 2, pSANBex + *Xho*I + *Hind*III; 3, amplicón de *sodA* (624-pb); 4, marcador (escala 1000-pb). B. Representación esquemática del vector: la expresión de la proteína recombinante se encuentra bajo el control del promotor de arabinosa (prom) y se agrega una marca de polihistidinas (HIS) en el extremo N-terminal de la proteína.



7.5.2 Condiciones de cultivo de la cepa productora de rSodA.

Se ensayaron varias condiciones de cultivo para maximizar el rendimiento de la producción de la proteína recombinante. Se encontró que la expresión de rSodA fue mayor cuando se cultivó en las siguientes condiciones: medio LB suplementado con glucosa 0.2% y ampicilina 50 μ g/mL, clona bacteriana *E. coli*

TOP10, concentración de inductor 0.2% (L-arabinosa) y tiempo de incubación post-inducción de 4 h.

7.5.3 Determinación de la expresión de rSodA.

Los ensayos de western blot con anticuerpos anti-His-HRP mostraron que la gran mayoría de la proteína recombinante se encontraba en los extractos no solubles de la clona de *E. coli* productora de rSodA. También se evidenció señal en los extractos solubles pero ésta fue más tenue y no fue reproducible en todos los ensayos (figura 7-19). La proteína recombinante se apreció como una banda única con un peso molecular de ~31-kDa. La purificación de la rSodA fue de buena calidad ya que en el gel teñido con Coomassie, pudo apreciarse la presencia de una sola banda correspondiente a la de la proteína recombinante (figura 7-20). Se realizaron ensayos de actividad SOD con la proteína recombinante purificada y con los extractos crudos obtenidos a partir de la cepa productora, pero en ningún caso pudo observarse la presencia de señal (figura 7-21).

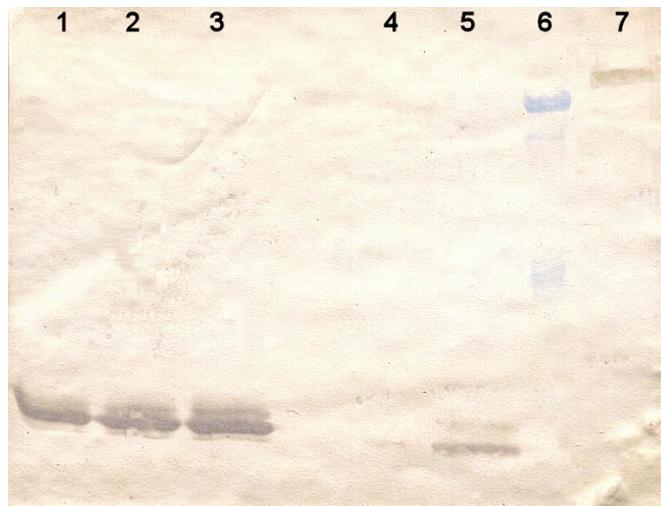


Figura 7-19. Western blot anti-His para evidenciar la expresión de rSodA de *N. brasiliensis*. Se depositaron muestras del extracto crudo no soluble y soluble de la clona de *E. coli* pSANbex productora de SodA recombinante. 1-3, extractos no solubles; 4-5, extractos solubles; 6, marcador; 7, control positivo (β -galactosidasa).

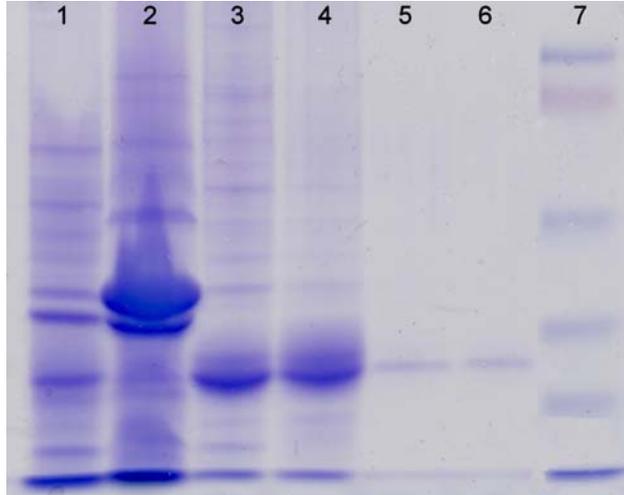


Figura 7-20. Purificación de rSodA de *N. brasiliensis*. Se tomaron muestras de cada uno de los pasos del proceso de purificación y se corrieron en SDS-PAGE 10% para corroborar la calidad de la proteína obtenida. 1, Extracto crudo inicial; 2, lavado; 3-4, elusión inicial con 500 mM de imidazol pH 7.0; 5-6, elusión final; 7, marcador.

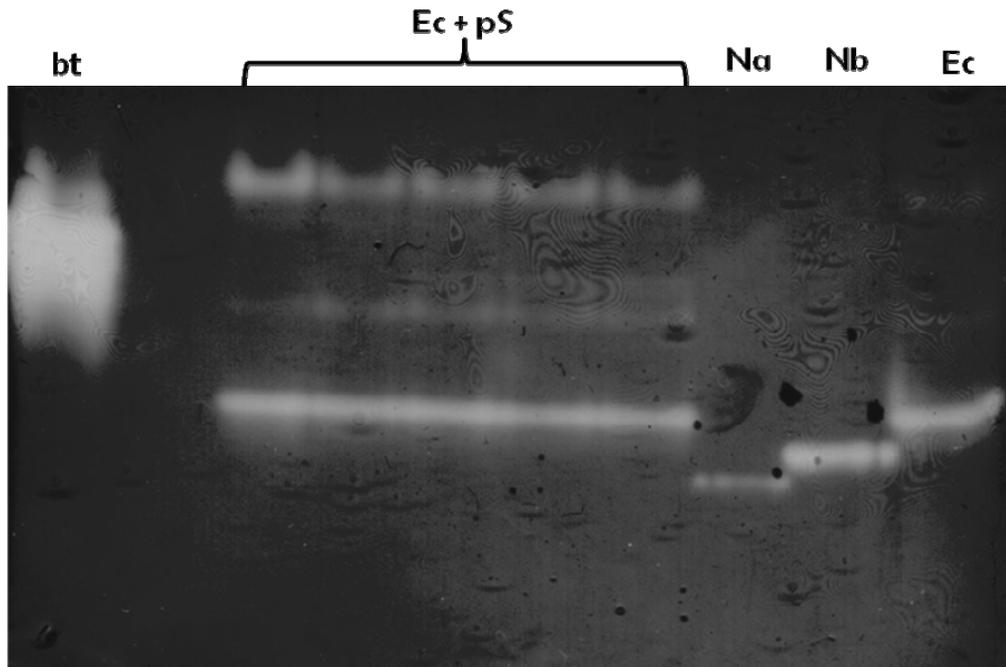


Figura 7-21. Actividad SOD en extractos de *E. coli* productora de rSodA de *N. brasiliensis*. Se ensayaron extractos crudos de *E. coli* productora de rSodA en busca de actividad de la proteína recombinante pero en ningún caso se observó presencia de actividad SOD suplementaria a las propias de *E. coli* (bt: SodC bovina; Ec + pS: extractos de *E. coli* productoras de rSodA; Na: extracto crudo de *N. asteroides*; Nb: extracto crudo de *N. brasiliensis*; Ec: extracto crudo de *E. coli* TOP10 sin transformar).

7.5.4 Inmunogenicidad de rSodA de *N. brasiliensis*.

El ensayo de western blot con el suero anti-rSodA obtenidos de los ratones inmunizados con la proteína recombinante mostró la presencia de señal tanto en el carril correspondiente a la rSodA como en el carril del extracto crudo de *N. brasiliensis*. No se observó la presencia de bandas accesorias en estos carriles. En el carril del control negativo de especificidad (antígeno P24 purificado de *N. brasiliensis*) no se observó señal alguna (figura 7-22).

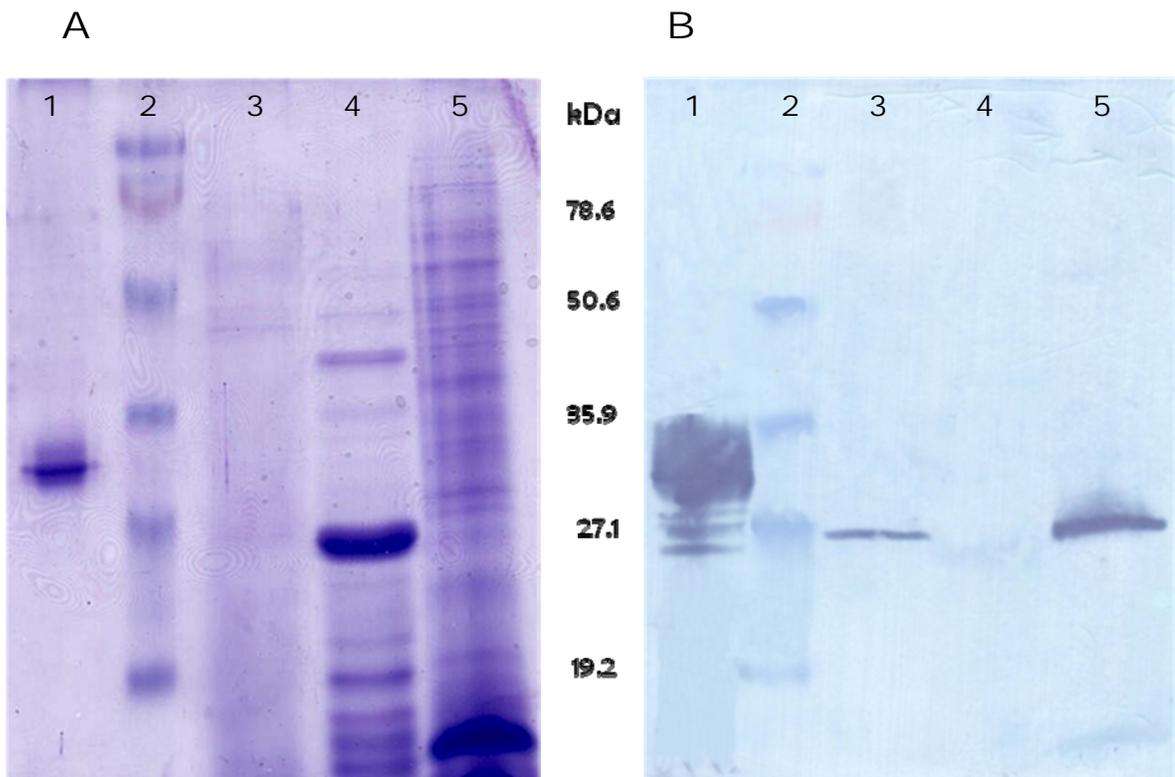


Figura 7-22. Western blot anti-rSodA de *N. brasiliensis*. El ensayo fue realizado utilizando suero hiper-inmune de ratones inmunizados con rSodA. **A.** SDS-PAGE 14%. **B.** Membrana de nitrocelulosa. 1, rSodA purificada; 2, marcador; 3, filtrado de medio de cultivo de *N. brasiliensis*; 4, antígeno P24 de *N. brasiliensis*; 5, extracto crudo de *N. brasiliensis*.

7.5.5 Inmunogenicidad de SodA nativa de *N. brasiliensis*.

El ensayo de western blot con el suero anti-*N. brasiliensis* obtenido de los ratones infectados con la bacteria y que desarrollaron micetoma, reveló la presencia de señal en el carril correspondiente a la rSodA y al carril del control positivo (antígeno P61 purificado de *N. brasiliensis*). No se observó banda de señal en el carril del control negativo de especificidad (ASB) (figura7-23).

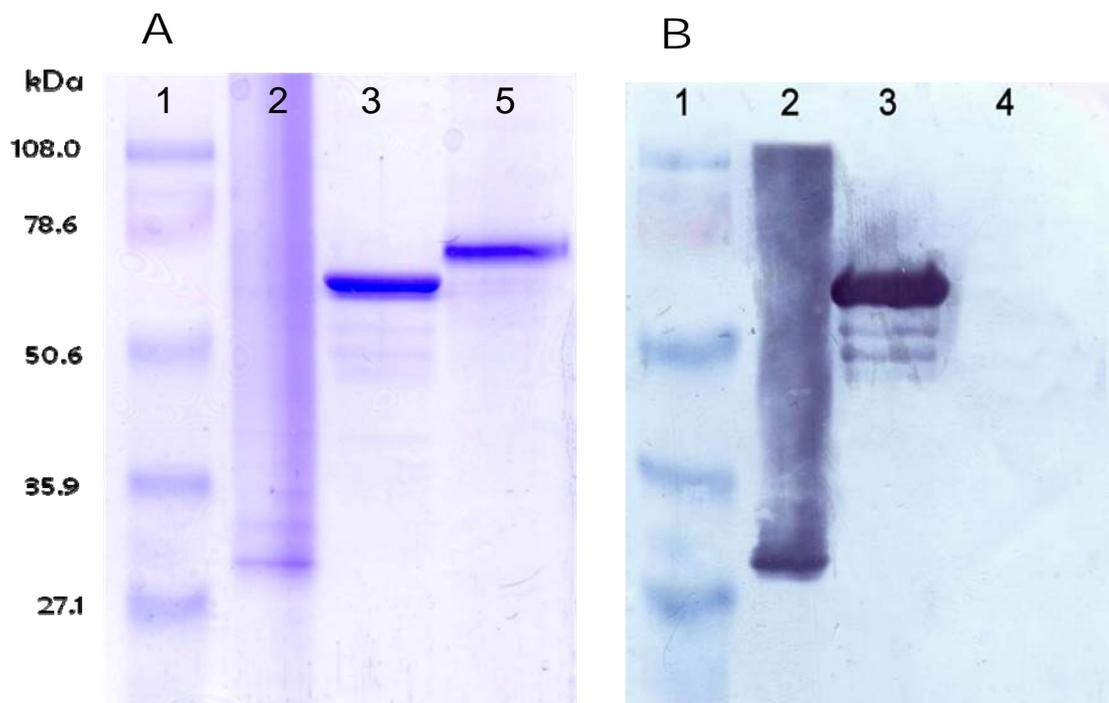


Figura 7-23. Western blot anti-*N. brasiliensis*. El ensayo fue realizado utilizando suero de ratones infectados con *N. brasiliensis* que desarrollaron micetoma. **A.** SDS-PAGE 14%. **B.** Membrana de nitrocelulosa. 1, marcador; 2, rSodA purificada; 3, antígeno P61 de *N. brasiliensis*; 4, ASB.

7.6 Inducción de protección anti-actinomicetoma por rSodA de *N. brasiliensis*.

7.6.1 Inducción de protección anti-micetoma por la rSodA de *N. brasiliensis*.

Todos los grupos de ratones del experimento de inducción de protección anti-micetoma mostraron un comportamiento similar durante los primeros 30 días post-infección con *N. brasiliensis*. El volumen de la inflamación de las patas en los animales fue muy similar en promedio durante esta fase. Sin embargo, a partir de aquí, la inflamación de los ratones que recibieron solamente el AIF fue aumentando paulatinamente hasta el desarrollo de un micetoma bien establecido para el día 45. Algunos de estos animales murieron antes del día 90. Los animales que fueron inmunizados con BMC o rSodA tuvieron comportamientos variados que se comentan a continuación.

Ratones infectados al día 7 post-inmunización. Los animales inmunizados una sola vez con AIF o rSodA y que fueron infectados 7 días después, no mostraron diferencias en la evolución del micetoma. Todos los animales desarrollaron un micetoma bien establecido para el día 45 que continuó creciendo hasta el día del sacrificio. De hecho, algunos animales murieron antes debido a la enorme extensión de la lesión. Se observó que los animales que fueron inmunizados con rSodA desarrollaron una lesión incluso algo mayor que los animales control que recibieron AIF (figura 7-24).

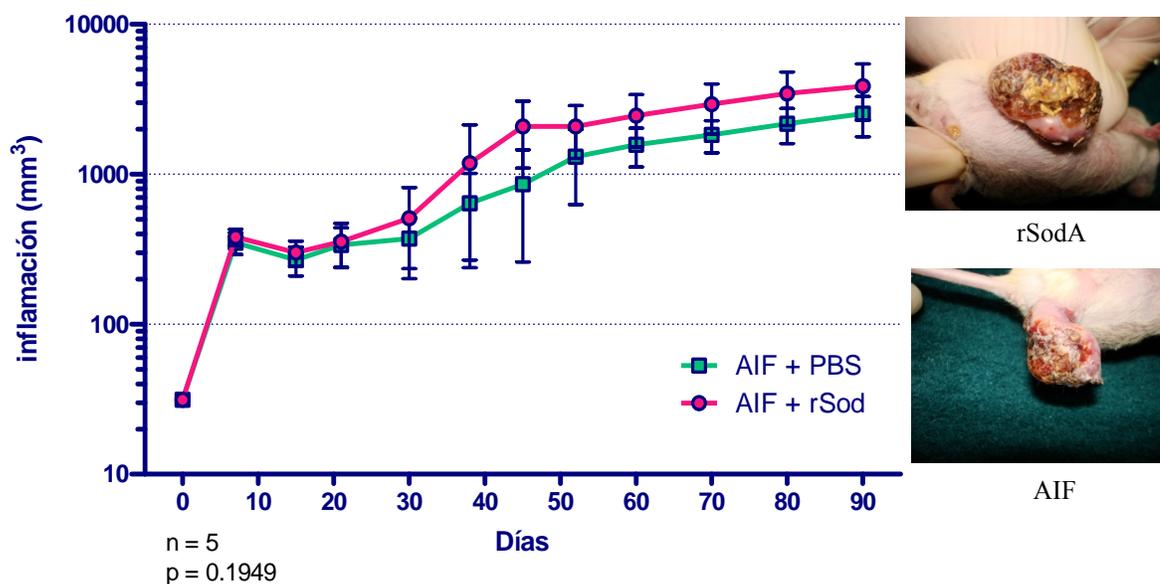


Figura 7-24. Desarrollo del actinomicetoma en ratones infectados al día 7 post-inmunización. Se graficaron los volúmenes de las lesiones plantares hasta el día 90 post-infección. A la derecha se muestran las lesiones promedio observadas al día 90 para los grupos correspondientes (prueba estadística: *t* de student).

Ratones infectados 15 días post-inmunización. Se encontraron diferencias significativas en el desarrollo del micetoma en los animales que fueron inmunizados una sola vez con AIF, BMC o rSodA y que fueron infectados 15 días después. Los animales del grupo control desarrollaron micetoma evidente desde el día 45 post-infección y algunos de estos animales murieron antes del día 90. Por el contrario, los animales que fueron inmunizados con BMC o con rSodA mostraron inflamación que permaneció latente desde el día 7 hasta el día 40 post-infección; sin embargo, en los días subsiguientes la inflamación disminuyó paulatinamente hasta prácticamente desaparecer para el día 90. No se observó desarrollo de micetoma en estos grupos de ratones, aunque algunos presentaron deformidades menores en la región plantar (figura 7-25).

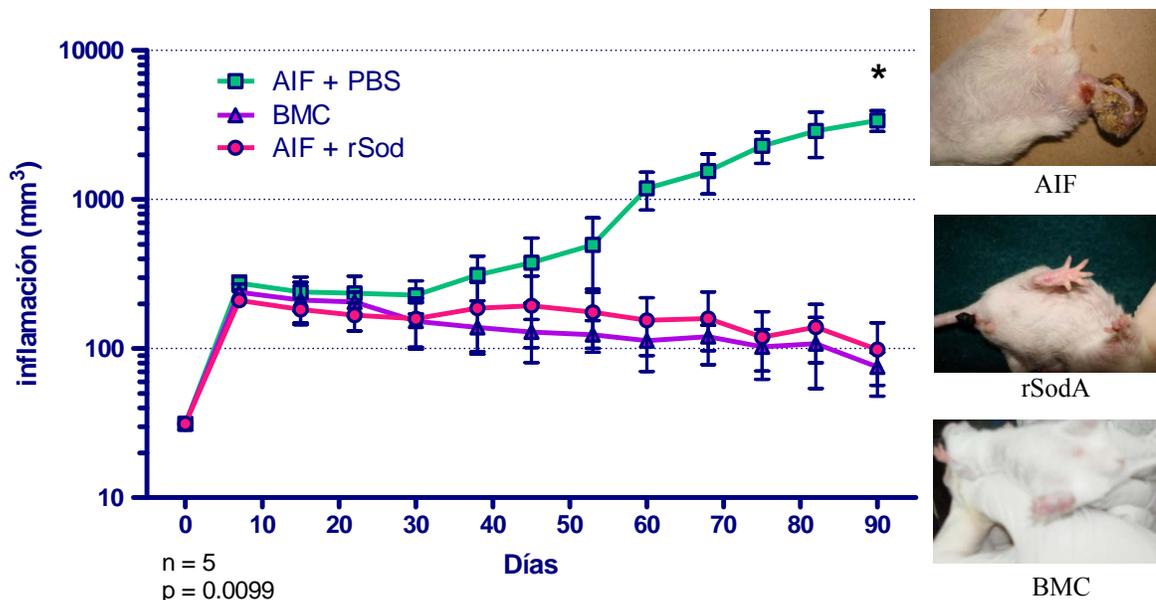


Figura 7-25. Desarrollo del actinomycetoma en ratones infectados al día 15 post-inmunización. Se graficaron los volúmenes de las lesiones plantares hasta el día 90 post-infección. A la derecha se muestran las lesiones promedio observadas al día 90 para los grupos correspondientes (prueba estadística: *t* de student).

Ratones infectados 21 días post-inmunización. Estos grupos de animales recibieron una re-inmunización 15 días después de la primera. Los ratones que recibieron AIF desarrollaron micetoma evidente para el día 45 post-infección y algunos de ellos murieron antes del día 90. Por el contrario, los animales que fueron inmunizados con BMC o con rSodA desarrollaron inflamación que persistió hasta el día 30, pero a partir de ahí, ésta fue disminuyendo lentamente hasta prácticamente desaparecer para el día 90, sin presentar datos de micetoma activo. Las diferencias entre los volúmenes de la lesiones fueron significativas con respecto al control (figura 7-26).

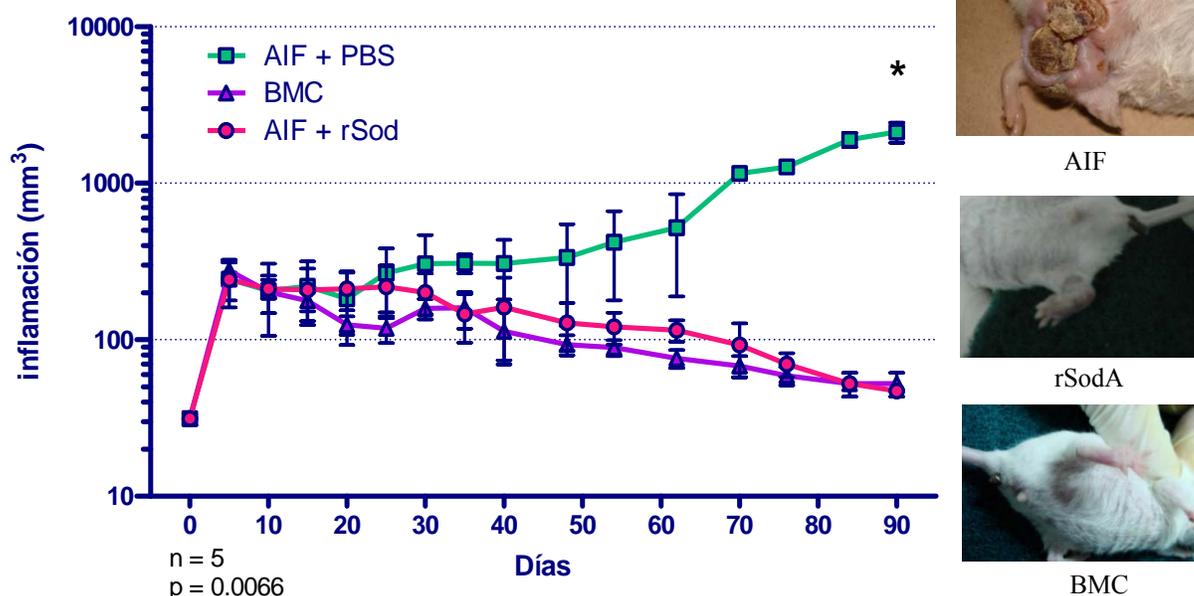


Figura 7-26. Desarrollo del actinomicetoma en ratones infectados al día 21 post-inmunización. Se graficaron los volúmenes de las lesiones plantares hasta el día 90 post-infección. A la derecha se muestran las lesiones promedio observadas al día 90 para los grupos correspondientes (prueba estadística: *t* de student).

Ratones infectados 30 días post-inmunización. Estos grupos de animales recibieron una re-inmunización 15 días después de la primera. Los ratones que recibieron AIF desarrollaron micetoma evidente para el día 50 post-infección y algunos de ellos murieron antes del día 90. Por el contrario, los animales que fueron inmunizados con BMC o con rSodA desarrollaron inflamación que persistió hasta el día 35, pero a partir de ahí, ésta fue disminuyendo lentamente hasta prácticamente desaparecer para el día 90, sin presentar datos de micetoma activo. Las diferencias entre los volúmenes de la lesiones fueron significativas con respecto al control (figura 7-27).

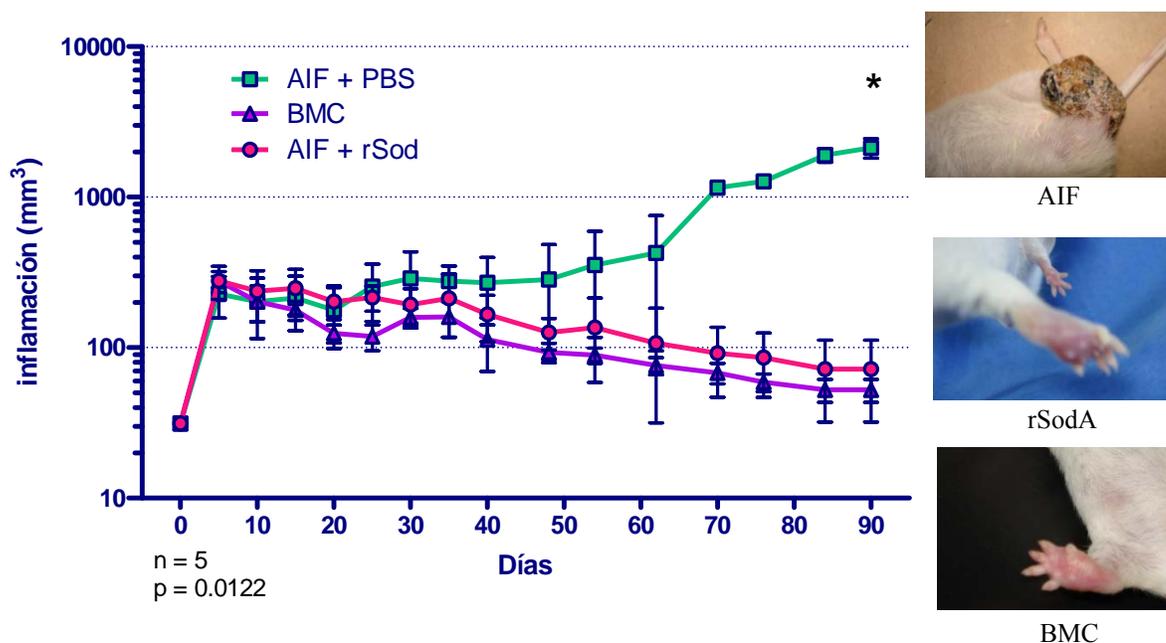


Figura 7-27. Desarrollo del actinomictoma en ratones infectados al día 30 post-inmunización. Se graficaron los volúmenes de las lesiones plantares hasta el día 90 post-infección. A la derecha se muestran las lesiones promedio observadas al día 90 para los grupos correspondientes (prueba estadística: *t* de student).

7.6.2 Titulación de anticuerpos anti-rSodA y anti-*N. brasiliensis*.

Los títulos de anticuerpos revelaron diferencias significativas entre todos los grupos de ratones infectados durante la evolución del micetoma. Al día 0 del experimento (pre-inmunización), los títulos de anticuerpos fueron similares en todos los grupos por lo que se utilizó como línea de corte. Se determinaron los títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM e IgG, así como los de anti-extracto crudo de *N. brasiliensis* (anti-Nbr) del tipo IgG. El comportamiento de

los títulos de anticuerpos en los diferentes grupos de ratones se comenta a continuación.

Ratones infectados al día 7 post-inmunización.

Anti-rSodA (IgM). No se encontraron diferencias significativas en el título de anticuerpos para el día 90 aunque se observó una diferencia menor en los títulos en el día 7 post-inmunización (figura 7-28).

Anti-rSodA (IgG). Ocurrió algo similar con los títulos de anticuerpos del tipo IgG, donde a pesar de encontrarse un poco más elevados en los ratones inmunizados con rSodA durante todas las mediciones, no se encontraron diferencias significativas (figura 7-29).

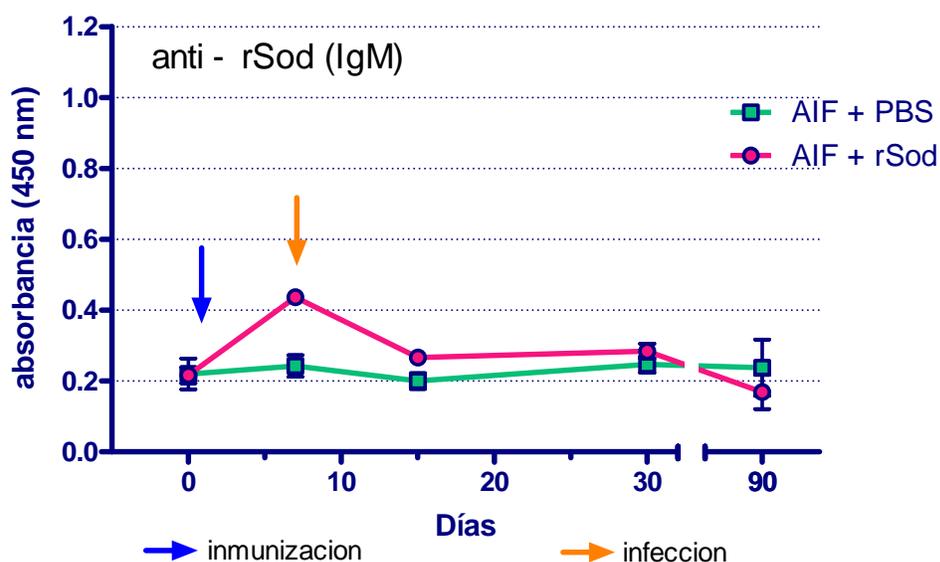


Figura 7-28. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 7 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*).

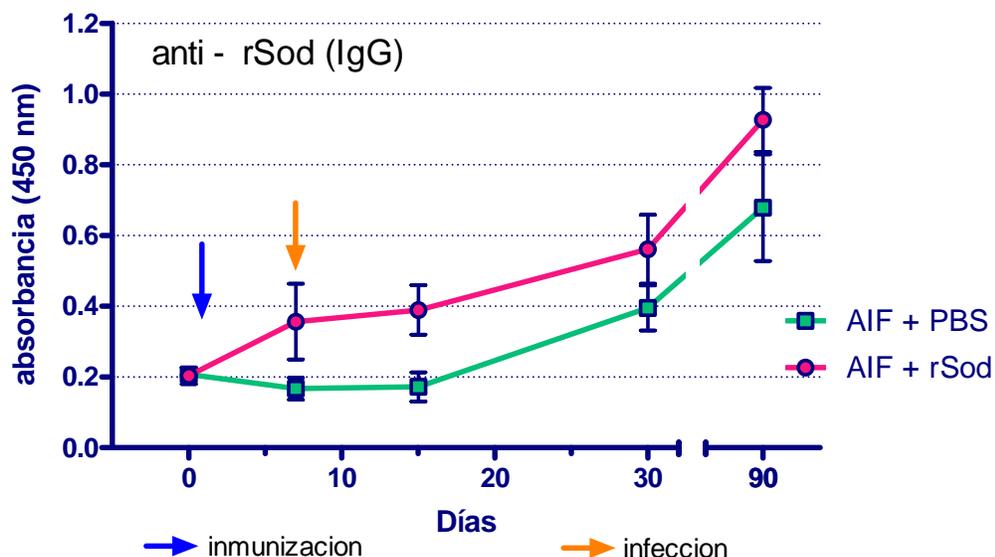


Figura 7-29. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los ratones infectados al día 7 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*).

Ratones infectados 15 días post-inmunización.

Anti-rSodA (IgM). Los títulos de anticuerpos tuvieron un comportamiento similar al de los grupos de ratones infectados al día 7. A pesar de no encontrarse diferencias significativas para el día 90, los títulos fueron más altos en el día 7 en los ratones inmunizados con rSodA o con BMC durante todas las mediciones (figura 7-30).

Anti-rSodA (IgG). Se observó un aumento significativo en los títulos de anticuerpos para el día 90 en los animales que fueron inmunizados con rSodA o con AIF pero no en aquellos que recibieron BMC. Además, los títulos de anticuerpos fueron siempre mayores en los animales inmunizados con rSodA que

en los otros dos grupos, importantemente durante el día de la infección (figura 7-31).

Anti-Nbr (IgG). Se encontró un aumento significativo en los títulos de anticuerpos para el día de la infección en los sueros de los ratones inmunizados con BMC pero no en los que recibieron AIF o rSodA. Sin embargo, para el día 90 los títulos fueron altos en los tres grupos de animales, pero más aún en los que recibieron solamente AIF (figura 7-32).

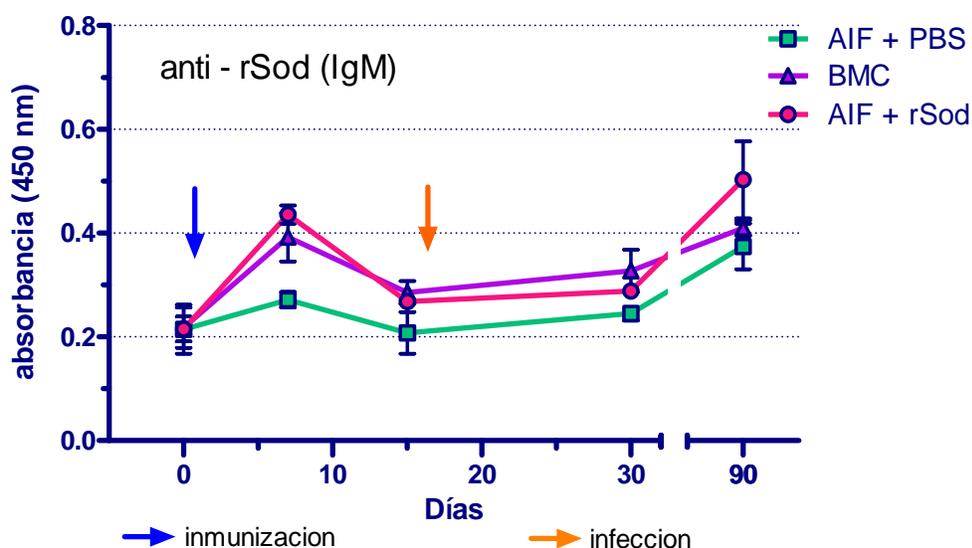


Figura 7-30. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 15 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*).

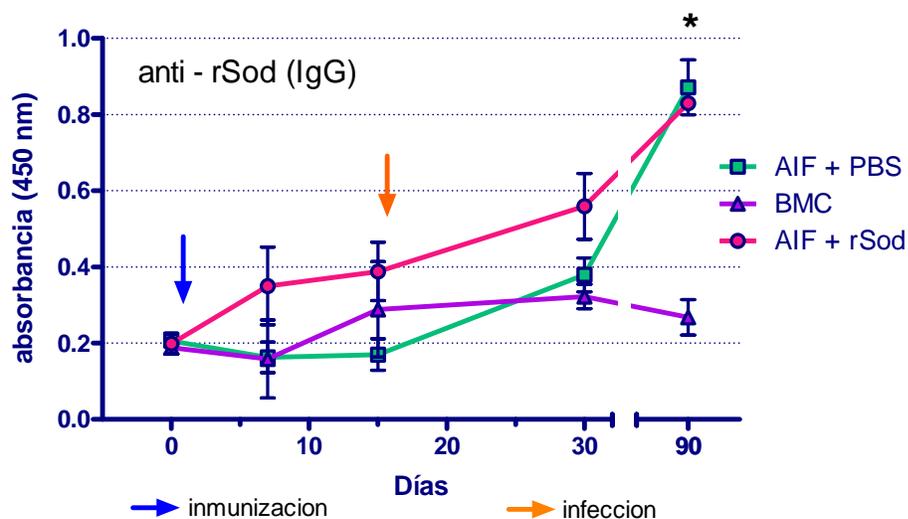


Figura 7-31. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los ratones infectados al día 15 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*) (*t* de student; $p \leq 0.05$).

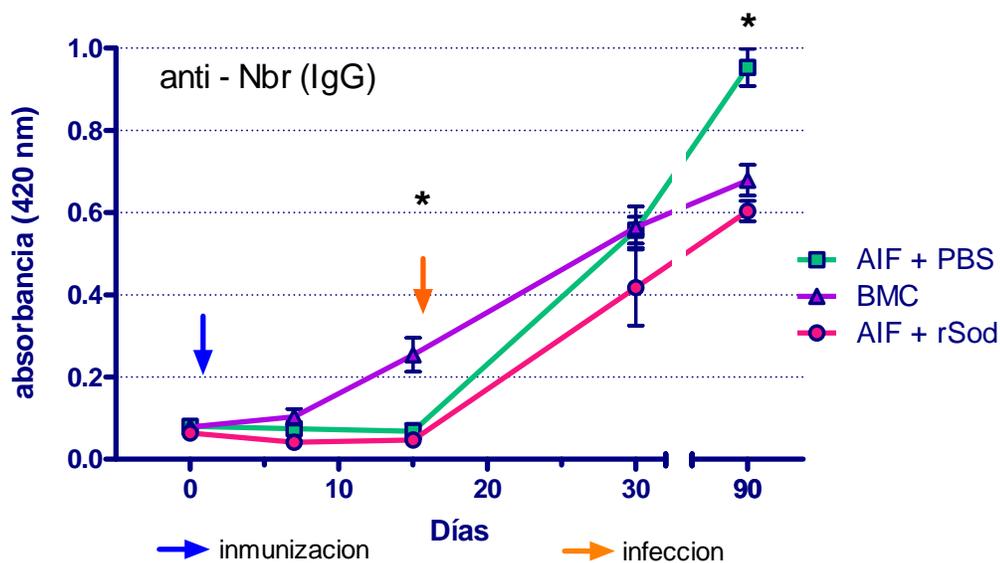


Figura 7-32. Títulos de anticuerpos anti-Nbr del tipo IgG de los ratones infectados al día 15 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*) (*t* de student; $p \leq 0.05$).

Ratones infectados 21 días post-inmunización.

Anti-rSodA (IgM). Los títulos de anticuerpos tuvieron un comportamiento similar al de los grupos de ratones infectados al día 7. A pesar de no encontrarse diferencias significativas en ninguna de las mediciones, los títulos fueron ligeramente más altos en los días 7 y 21 en los ratones inmunizados con rSodA (figura 7-33).

Anti-rSodA (IgG). Se encontró un aumento significativo en los títulos de anticuerpos en los animales que fueron inmunizados con rSodA desde el día 15 y que se mantuvo en todas las mediciones. Importantemente, los títulos fueron muy elevados al día de la infección, contrario a lo mostrado por los animales que recibieron AIF o BMC (figura 7-34).

Anti-Nbr (IgG). Para el día de la infección, se presentó un aumento significativo en los títulos de anticuerpos en los animales que fueron inmunizados con BMC pero no en aquellos que recibieron AIF o rSodA. No obstante, esta diferencia desapareció para el día 90, donde los títulos fueron altos en los tres grupos (figura 7-35).

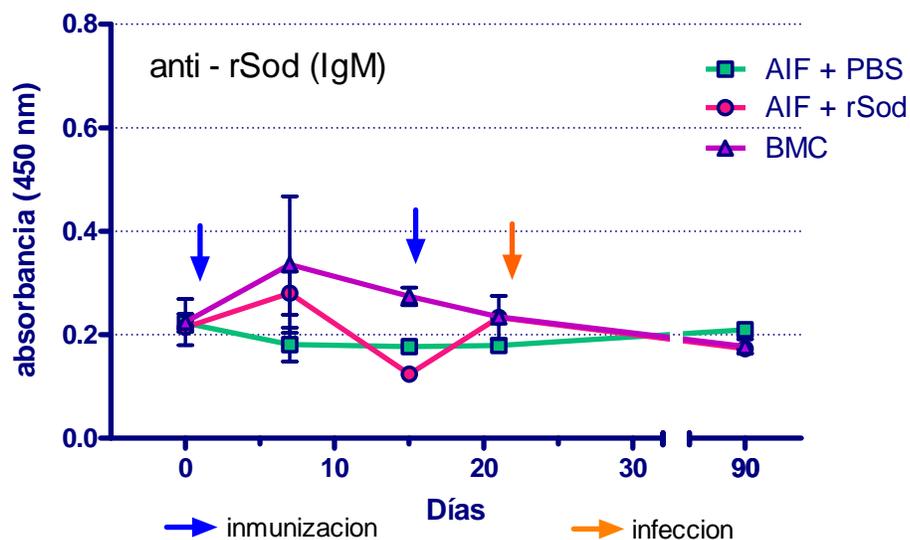


Figura 7-33. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 21 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*).

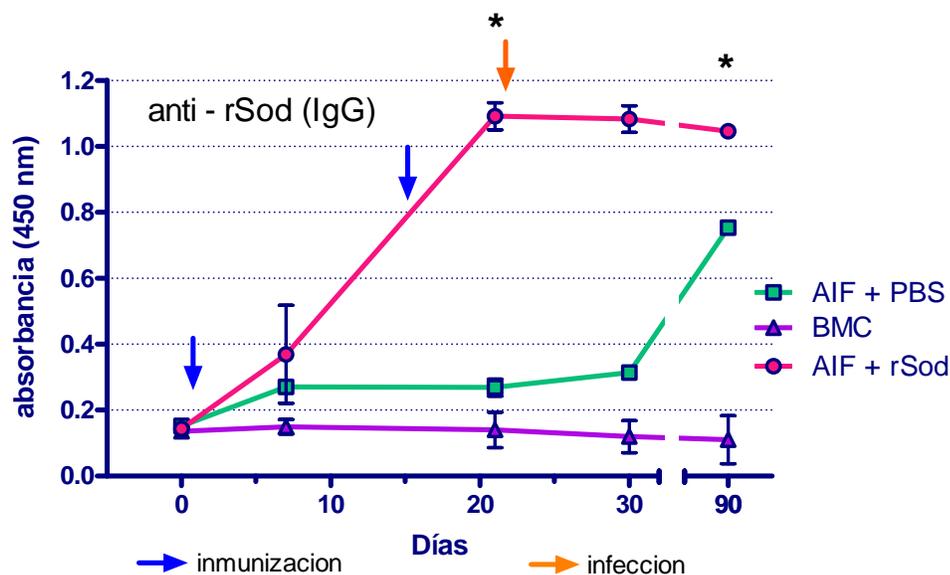


Figura 7-34. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los ratones infectados al día 21 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*) (*t* de student; $p \leq 0.05$).

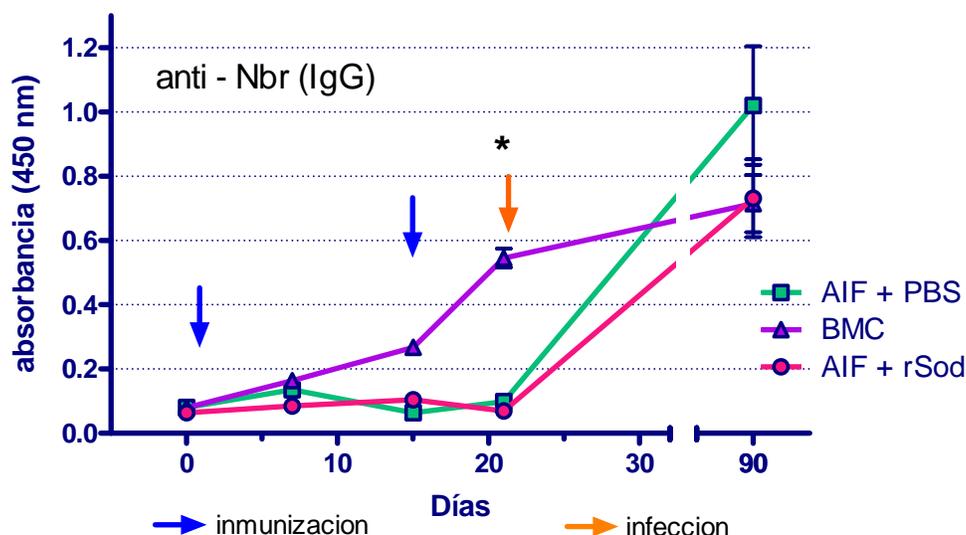


Figura 7-35. Títulos de anticuerpos anti-Nbr del tipo IgG de los ratones infectados al día 21 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*) (*t* de student; $p \leq 0.05$).

Ratones infectados 30 días post-inmunización.

Anti-rSodA (IgM). A pesar de no encontrarse diferencias significativas entre ninguno de los grupos, los títulos fueron más altos en el día 21 en los ratones inmunizados con rSodA (figura 7-36).

Anti-rSodA (IgG). Se encontró un aumento significativo en los títulos de anticuerpos en los animales que fueron inmunizados con rSodA desde el día 21 y que se mantuvo hasta la última determinación. Importantemente, los títulos fueron elevados al día de la infección, contrario a lo mostrado por los animales que recibieron AIF o BMC. Para el día 90, los títulos se elevaron también en los ratones inmunizados con AIF, pero no en los que recibieron BMC (figura 7-37).

Anti-Nbr (IgG). Se observó un aumento significativo en los títulos de anticuerpos en los animales que fueron inmunizados con BMC para el día de la infección pero no en aquellos que recibieron AIF o rSodA, que se mantuvieron bajos. Sin embargo, esta diferencia desapareció para el día 90, donde los títulos fueron altos en los tres grupos e incluso mayores en los animales que recibieron solamente AIF (figura 7-38).

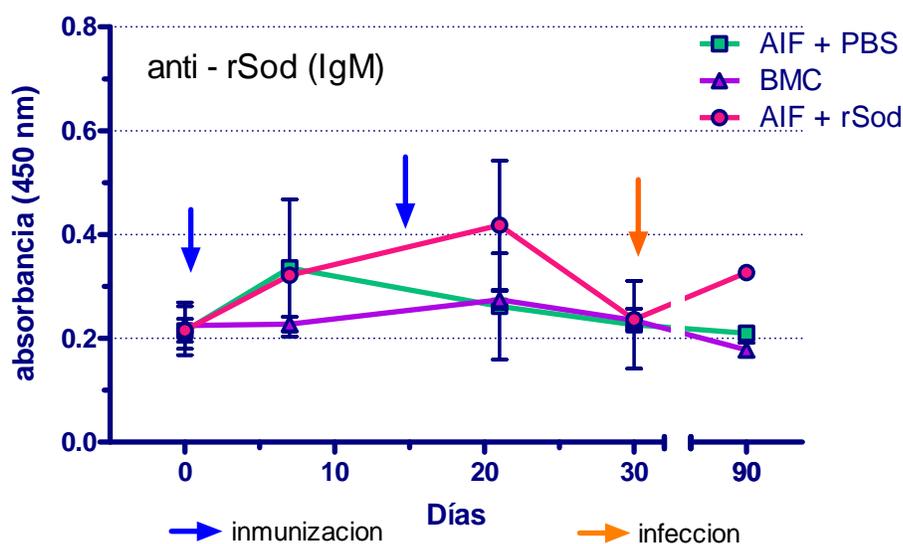


Figura 7-36. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgM de los ratones infectados al día 30 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*).

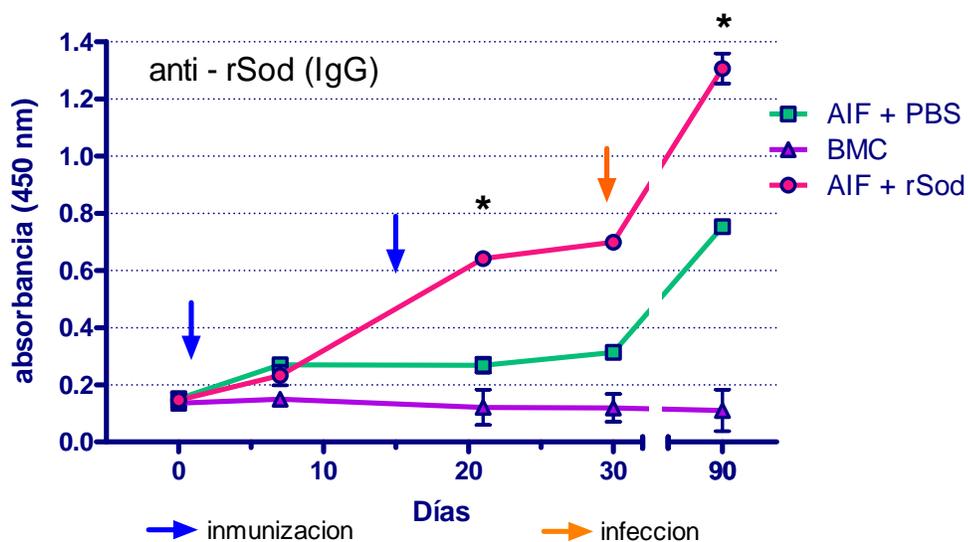


Figura 7-37. Títulos de anticuerpos anti-rSodA del tipo IgG de los ratones infectados al día 30 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*) (*t* de student; $p \leq 0.05$).

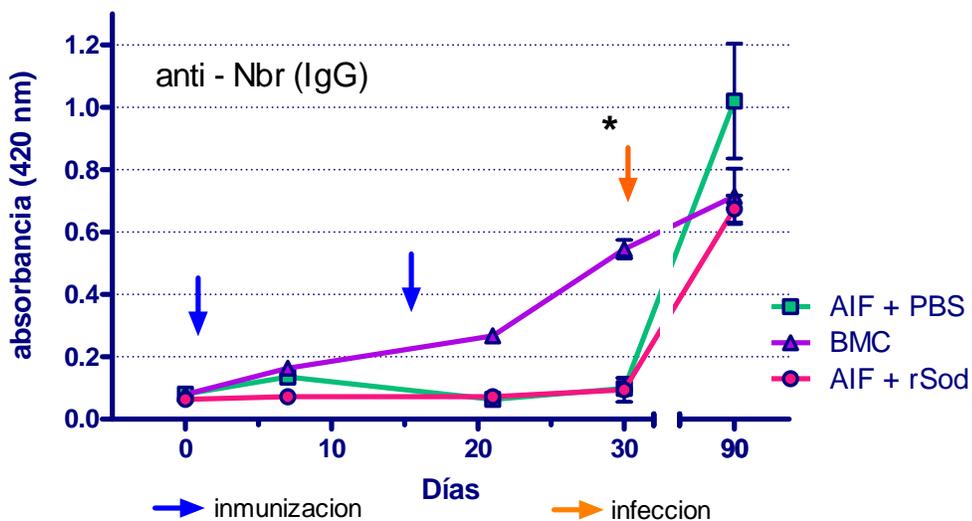


Figura 7-38. Títulos de anticuerpos anti-Nbr del tipo IgG de los ratones infectados al día 30 post-inmunización. El Ensayo fue realizado por triplicado por ELISA (AIF: adyuvante incompleto de Freund; BMC: *N. brasiliensis* muerta por calor; rSod: rSodA de *N. brasiliensis*) (*t* de student; $p \leq 0.05$).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

La superóxido dismutasa es una enzima que ha sido implicada en la virulencia de varios microorganismos intracelulares. Interesantemente, Beaman *et al.* (1985) la describieron como un mecanismo importante para la patogenicidad de *Nocardia asteroides* GUH2. La participación de esta enzima en la virulencia bacteriana estaría relacionada con su propiedad de neutralizar los ROS (con ayuda de la catalasa) durante el estallido respiratorio de los fagocitos. Este supuesto encontró apoyo en la observación de una asociación de la enzima con la pared celular de *N. asteroides* GUH2 (Beaman, 1983, 1985, 1990). Se ignora aún si algo similar pudiera estar sucediendo en el caso de *N. brasiliensis*, aunque en un estudio reciente, Revol *et al.* (2006) observaron que la expresión de SOD se encontraba disminuida durante la primera hora post-infección con *N. brasiliensis* en macrófagos peritoneales de ratón. A primera vista, este hecho sugiere que la enzima no estaría implicada en la virulencia de esta bacteria en esta fase de la infección (coincidente con los procesos de fagocitosis y del estallido respiratorio). Sin embargo, esta no es necesariamente una relación de causalidad, como se verá más adelante.

Un primer paso hacia la determinación del papel desempeñado por la SOD en la virulencia de *N. brasiliensis* fue precisamente el estudio de dicha actividad enzimática. Se encontró que independientemente de la fase de crecimiento, *N. brasiliensis* solo mostró un tipo de actividad SOD. Esta actividad se evidenció tanto en los extractos crudos celulares (ECC) como en el filtrado de medio de cultivo (FMC). Interesantemente, los ensayos demostraron que la actividad fue mayor en la fase estacionaria en ambas muestras que durante la fase exponencial. Aunque no se logró determinar si la SOD presente en el FMC era resultado de una secreción activa o de un fenómeno de lisis bacteriana, queda claro que la proteína debe poseer una gran resistencia a la degradación enzimática, ya que se ha reportado la secreción de algunas proteasas por *N. brasiliensis* (Zlotnik et al., 1984). Adicionalmente, la enzima es termoestable pues se demostró que retenía aún su actividad cuando fue incubada a 70°C por 30 min. Esta estabilidad enzimática ya había sido documentada para SOD de otras especies. De hecho, se ha descrito que la enzima retiene su actividad aun en presencia de agentes desnaturizantes como urea y SDS, y de concentraciones altas de sales (Forman y Fridovich, 1973; Ken et al., 2005). El ensayo de inducción con sales metálicas durante el cultivo de *N. brasiliensis* para evidenciar la posible existencia de actividades críticas de SOD evidenció no sólo que no se indujo ninguna actividad SOD suplementaria a la que se había observado, sino también que la presencia de ciertos metales (cobre o zinc) ejercía una regulación a la baja de la actividad SOD. Estos resultados fueron similares en ambas fases de crecimiento

bacteriano. El ensayo de inhibición realizado con H_2O_2 , KCN y NaN_3 para averiguar el tipo de cofactores metálicos a los cuales SOD de *N. brasiliensis* está asociada mostró que la actividad enzimática sólo era inhibida parcialmente (~40-50%), de una manera similar a lo descrito por Beaman *et al.* (1983) en *N. asteroides* GUH2. Este hecho apoya el supuesto de que la SOD de *N. brasiliensis* se encuentra asociada a los mismos metales que aquella bacteria (Fe, Mn, Zn). Como se hará notar más adelante, la secuencia del gen SOD de *N. brasiliensis* guarda alta homología con el de *N. asteroides* GUH2, lo cual apoya fuertemente esta hipótesis (Beaman *et al.*, 1983). Llamó la atención la ausencia de inhibición de la actividad SOD en las muestras incubadas con H_2O_2 y NaN_3 , ya que se esperaba que hubiese al menos una inhibición parcial como las mostradas en aquellas muestras incubadas con los reactivos por separado. Sin embargo, este hecho tiene que ver más con la inactivación de la NaN_3 , ya que las muestras utilizadas no fueron purificadas y estas contenían actividad catalasa, la cual se ha descrito causa la oxidación de NaN_3 en presencia de H_2O_2 (Ogino *et al.*, 2001).

La determinación de actividad SOD en la fase membranosa de los extractos de *N. brasiliensis*, no evidenció actividad SOD alguna. Esto sería indicativo de que la SOD en *N. brasiliensis* no se asocia a la pared celular de la bacteria, contrario a lo que ocurre en *N. asteroides* GUH2 (Beaman *et al.*, 1983). Sin embargo, la inclusión de extractos membranosos de *N. asteroides* en el ensayo, tampoco reveló la presencia de la actividad SOD esperada. Probablemente, el método de obtención de los extractos membranosos disocia o inhibe dicha actividad, y como

consecuencia, no es evidente en los ensayos. Debido a esto, no fue posible descartar una asociación de la SOD a la pared celular de *N. brasiliensis*. Otro hecho importante que llamó la atención fue la diferencia en el corrimiento entre las muestras de *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. La banda de actividad SOD para *N. brasiliensis* mostró un retraso mayor que la de *N. asteroides*, aun cuando fueron procesadas bajo las mismas condiciones. El motivo de esta discrepancia se ignora, pero es posible que se deba a alguna modificación post-traducciona, dada la alta homología e igual peso molecular teórico para ambas proteínas.

Se sabe que la actividad específica de SOD es muy elevada y al menos para *N. asteroides* GUH2, puede representar del 2-5% de las proteínas totales bacterianas (Beaman *et al.*, 1983). Esta observación sumada a las anotadas sobre la gran estabilidad de la enzima, puede explicar lo encontrado por Revol *et al.* (2006) con respecto a la caída de expresión de SOD durante la primera hora de infección comentada arriba. Si la cantidad y actividad SOD es suficiente en el momento dado de la infección, resultaría innecesario una expresión continuada de la misma, lo cual dejaría lugar a que se llevaran otros procesos celulares determinantes para la infección por *N. brasiliensis* en las fases más tempranas.

Aunque ya Revol *et al.* (2006) habían reportado la secuencia del gen SOD de *N. brasiliensis* ATCC 700358, ésta se encontraba incompleta ya que carecía del segmento final del gen. En este trabajo fue posible la obtención de toda la región codificante del gen, la cual se clonó y secuenció. La secuencia del gen reveló alta homología con los genes de SOD reportados para *N. asteroides* GUH2

y *N. farcinica* IFM 10152. Aun más, la traducción de la secuencia reveló la conservación de los residuos aminoacídicos responsables de la actividad específica: His28, His76, His164, Asp160 (Harth y Horwitz, 1999). La asociación de SOD de *N. brasiliensis* con manganeso y hierro que ya había sido sugerida por los ensayos de inhibición, fue respaldada por la presencia de los residuos Gln145 y Tyr36, respectivamente (Harth y Horwitz, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2003; Miller, 2004), tal como sucede con *N. asteroides* GUH2 (Alcendor *et al.*, 1995). Por tanto, se corroboró que efectivamente la SOD de *N. brasiliensis* se trataba de una SOD del tipo A, por lo menos a nivel de secuencia génica. Por otro lado, la baja homología mostrada con otras secuencias SOD dentro del orden *Actinomycetales*, sugiere que las SodA de *Nocardia* podrían tener propiedades únicas. Los análisis *in silico* de la proteína mostraron resultados un tanto contradictorios en el sentido de que un programa predijo que la localización de SodA es extracelular (> 99%), mientras que otro no pudo encontrar secuencias relacionadas a péptidos señal o a sitios de corte con peptidasas, los cuales marcarían la proteína para su exportación por vías clásicas. Estos resultados dejan de estar en desacuerdo cuando se tiene en cuenta que los programas comparan las secuencias con reportes ya conocidos para otras proteínas. En este caso, la secuencia se confrontó contra una reportada para *M. tuberculosis*, la cual ha sido reportada como extracelular (Harth y Horwitz, 1999). Si la predicción es válida, la secreción de SodA al medio estaría regulada tanto por la información intrínseca de la secuencia proteínica como por la maquinaria de exportación propia del

género *Nocardia*, tal como lo afirman Harth y Horwitz (1999) para el caso de *Mycobacterium*. Interesantemente, las predicciones en este sentido para las secuencias SodA de *N. asteroides* GUH2 y *N. farcinica* IFN 10152 son las mismas. Hasta la fecha, todavía se encuentra en debate la manera en que la proteína llega al medio extracelular. Unos sostienen la teoría de la exportación activa catalizada por la maquinaria SecA2 (Braunstein *et al.*, 2003), mientras que otros opinan que se debe a la lisis celular propia del cultivo (Tullius *et al.*, 2001). Como fuere, la presencia extracelular de SOD en estas bacterias es un hecho y al menos para el caso de *N. asteroides* GUH2, conlleva importantes implicaciones en la patogenicidad (Beaman *et al.*, 1985). Aunque el software también permitió hacer una reconstrucción teórica de la estructura tridimensional de SodA de *N. brasiliensis* (ver apéndice 2), ésta debe ser tomada con cautela por varias razones. Como se mencionó, las secuencias de SodA para *N. asteroides* GUH2 y *N. brasiliensis* tienen exactamente el mismo número de aminoácidos y las diferencias son mínimas. Es más, la estructura 3D predicha para ambas es casi idéntica. Sin embargo, la diferencia en el corrimiento de las bandas de actividad es evidente. Por otro lado, se sabe que las SOD se encuentran normalmente en formas poliméricas, de hecho, Beaman *et al.* (1983) describen la SOD de *N. asteroides* GUH2 como un tetrámero de ~100-kDa conformado por cuatro subunidades de ~25-kDa cada una, tal como lo demuestran en ensayos de western blot. Como se notará más adelante, esto difiere en lo observado en el ensayo de western blot realizado para SodA de *N. brasiliensis*, en el cual la banda muestra

un peso molecular de ~27-kDa. Se desconoce el significado que pudieran tener estas diferencias.

En este trabajo no se logró generar una cepa de *N. brasiliensis* carente de actividad SOD (*sodA*⁻). Las razones para este suceso aún no están definidas. Sin embargo, algunos resultados dejaron en claro ciertos puntos. Los vectores tanto de integración como antisentido resistentes a tetraciclina no pudieron ser introducidos a *N. brasiliensis*. Esto fue cierto aun cuando se ensayaron varias condiciones de transformación y el cultivo se hizo en anaerobiosis, teniendo en cuenta que el bloqueo de la actividad SOD inhabilitaría a la bacteria para crecer en condiciones con oxígeno. Este hecho sugiere que el gen de tetraciclina pudiera no ser funcional en *N. brasiliensis*. El hecho de que la proteína expresada por este gen ejerza su acción como bomba de flujo y por tanto sea transmembranal (Dosch *et al.*, 1984), pudiera explicar que, aunque en *E. coli* se estableciera en la membrana y fuera funcional, en *N. brasiliensis* tuviera algún problema de transporte o de integración en la membrana y no funcionara. Además, no fue posible descartar la participación del promotor como fuente del problema, ya que la fuerza y funcionalidad de los promotores génicos es muy variable entre los géneros de bacterias. Otras variables, como el origen de replicación, el número de copias del vector y las condiciones de transformación fueron descartadas por los resultados que se obtuvieron con el vector con resistencia a gentamicina, los cuales se comentan más abajo. Como fuere, los resultados dejaron en claro que el gen de tetraciclina del plásmido pBR322 no es un gen de selección viable para ser

utilizado en *N. brasiliensis*. Por el contrario, con el vector acarreador con resistencia a gentamicina se lograron obtener clonas transformadas de *N. brasiliensis*, aun cuando la eficiencia resultó ser baja. Este hecho es muy importante debido a que el vector podrá ser utilizado en futuras investigaciones teniendo la certeza de su completa compatibilidad con *N. brasiliensis*. Por ejemplo, ensayos preliminares utilizando este vector realizados por María del Refugio Rocha Pizaña (2008) en su tesis doctoral, han dado como resultado el mejoramiento de la eficiencia de transformación en *N. brasiliensis* y la creación de clonas transformadas que expresan una proteína verde fluorescente y que pueden ser empleadas para diversos estudios. A pesar de lo anterior, en este trabajo no pudieron generarse vectores con resistencia a gentamicina destinados a bloquear la actividad SodA. Aunque no se tiene claro todavía la razón para este hecho, lo más probable es que se debiera a fallas técnicas del proceso (condiciones o reactivos), si bien no es posible descartar algún tipo de incompatibilidad entre los genes de gn^R y *sodA* (p.ej. generación de productos tóxicos), lo cual no es un problema raro en este tipo de experimentos.

Los ensayos de expresión de SodA recombinante de *N. brasiliensis* mostraron que bajo las condiciones utilizadas, la proteína se agregó en cuerpos de inclusión. Si bien la formación de estos agregados facilita la purificación, también causa en muchos casos, la pérdida de función de la proteína que no siempre es recuperable mediante re-conformación (Singh y Panda, 2005). Los ensayos para determinar actividad en la proteína recombinante no mostraron presencia de señal

en ninguno de los casos. Aunque esta pérdida de actividad podría ser explicada por la formación de cuerpos de inclusión, es más probable que se debiera a un plegamiento anómalo de la proteína durante el inicio de la traducción debido a la marca de polihistidinas en su extremo N-terminal. A cambio, se obtuvo rSodA purificada de alta calidad y cantidad. Los ensayos de western blot anti-His revelaron que la rSodA tiene un peso molecular de ~ 31-kDa. La marca de polihistidinas explica ~4-kDa, mientras el resto (~27-kDa) corresponderían a la proteína en sí. Este tamaño fue corroborado posteriormente durante los ensayos de western blot anti-rSodA con el extracto crudo de *N. brasiliensis*. La rSodA de *N. brasiliensis* resultó ser inmunogénica en ratones, tal como lo demostraron los ensayos de western blot realizados con los sueros hiperinmunes de animales inmunizados con la proteína. Estos ensayos también revelaron el tamaño real (~27-kDa) de SodA de *N. brasiliensis* al observarse señal tanto en el ECC como en el FMC. Por otro lado, ensayos de western blot con sueros de ratones con micetoma, evidenciaron que SodA también es inmunogénica, aunque no se logró determinar si es inmunodominante o no.

Los ensayos de inmunización activa con rSodA de *N. brasiliensis* para inducir protección en ratones infectados con la bacteria mostraron que la rSodA protegió a los ratones contra el desarrollo del micetoma cuando éstos fueron infectados al día 15 post-inmunización o después. En los ratones que fueron infectados el día 7 post-inmunización no se observó protección y desarrollaron un micetoma igual o peor que los animales del grupo control. La protección se

encontró, hubiese o no, la administración de una re-inmunización 15 días después de la primera. La titulación de anticuerpos del tipo IgG anti-rSodA y anti-Nbr mostró una correlación positiva entre el nivel de anticuerpos **al día de la infección** y la inducción de protección antimicetoma en los grupos correspondientes. Sin embargo, esta correlación desapareció para el día del sacrificio, ya que los animales control mostraron niveles de anticuerpos altos (anti-rSodA y anti-Nbr) para esta fecha y no obstante, desarrollaron micetoma. Esto hace pensar que los niveles altos de estos anticuerpos para el día de la infección, estarían involucrados en la protección anti-micetoma. Sin embargo, esta hipótesis solo podrá ser comprobada mediante experimentos de inmunización pasiva con anticuerpos específicos contra estos antígenos. Por su parte, los niveles de anticuerpos del tipo IgM anti-rSodA no mostraron correlación alguna con la aparición del micetoma y de hecho, no hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto a los niveles **al día de la infección**, excepto en los ratones infectados al día 7, donde se encontraron niveles elevados en el grupo inmunizado con rSodA. Pero interesantemente, este fue el único grupo que no resultó protegido. Otro evento que llamó la atención fueron los niveles bajos o nulos de anticuerpos anti-rSodA, tanto antes como después de la infección con *N. brasiliensis*, en los animales que fueron inmunizados con BMC. Este resultado discrepa con la inmunogenicidad demostrada por SodA en los ensayos de western blot y en las determinaciones elevadas observadas en los ratones control. Esto lleva a pensar: i) que la proteína es destruida durante el proceso de obtención de

BMC y/o, ii) que durante la infección en este grupo de animales, la respuesta humoral es enfocada hacia determinantes de *N. brasiliensis* que no incluyen a la SodA.

Algunos resultados son concordantes con los obtenidos por Isabel Pérez Rivera (2005) en su tesis doctoral, donde obtuvo protección anti-micetoma en animales que recibieron inmunización activa con antígenos solubles (P24, P38) o particulados (BMC, bacterias deslipidizadas) únicamente cuando éstos fueron infectados al día 15 post-inmunización o después. Los animales infectados en días anteriores (días 3 ó 7) no quedaron protegidos. En cambio, los resultados que obtuvo con inmunización pasiva de sueros hiper-inmunes contra estos antígenos tuvieron un efecto protector parcial o nulo en el desarrollo del micetoma, excepto en los ensayos con los sueros del día 7 post-inmunización, donde todos los animales quedaron protegidos, ¿Cuál es el motivo de esta discrepancia? En ese estudio se sugiere que los anticuerpos del tipo IgM y no los IgG, estarían jugando el papel principal en la inducción de la protección anti-micetoma, pero si esto es válido, ¿Por qué los animales infectados al día 7 post-inmunización (momento en el cual los títulos de anticuerpos IgM fueron más elevados) no quedaron protegidos ni en este trabajo ni en aquel? De hecho, en algunos ensayos de inmunización pasiva realizados por Pérez Rivera (2005) con sueros de 45 días post-inmunización, se refiere una protección parcial **sin desarrollo de micetoma**, sino únicamente inflamación. Es más, la transferencia pasiva de suero negativo (proveniente de animales no inmunizados) también confirió esta protección

parcial anti-micetoma (Pérez-Rivera, 2005). En otro estudio (Salinas-Carmona y Pérez-Rivera, 2004) se observó una protección parcial anti-micetoma cuando los animales recibieron suero hiper-inmunes contra antígenos solubles (P24, P38 ó P61) del día 30 post-inmunización y una protección parcial cuando los animales recibieron inmunización activa con estos mismos antígenos y fueron infectados 45 días después. En un estudio más reciente (Salinas-Carmona *et al.*, 2006) se refiere que no fue posible obtener protección anti-micetoma cuando los animales recibieron inmunización pasiva con sueros hiper-inmunes anti-P24 o anti-BMC obtenidos los días 30 ó 60 post-inmunización, pero sí cuando los sueros fueron de los días 7 ó 15. Los estudios mencionados indican que los anticuerpos IgM son claves para conferir esta protección durante la inmunización pasiva. Sin embargo, todavía no queda completamente claro por qué existe una protección parcial cuando son transferidos sueros con niveles de IgM más bajos o incluso, sueros de animales sin inmunizar. Se ha reportado que los sueros protectores pierden parcialmente esta propiedad cuando son inactivados con calor; además, también se observó un efecto similar cuando se administró solamente precipitado de euglobulinas (Salinas-Carmona y Pérez-Rivera, 2004). Estos hallazgos involucran necesariamente la participación de otros factores séricos (p. ej. complemento) en la protección, aparte de los anticuerpos.

Por otro lado, los trabajos realizados hasta este momento solamente han involucrado el estudio de proteínas inmunodominantes de *N. brasiliensis*. Ya se ha descrito que el mismo inmunógeno es capaz de modular la respuesta inmune,

tal como se observó en este trabajo con los niveles nulos de anticuerpos anti-rSodA cuando se inmunizó con BMC pero que fueron altos en los animales control. “La inmunogenicidad no está relacionada necesariamente con la inmunidad protectora”, ha señalado Salinas-Carmona (2006). El estudio de factores de virulencia bacterianos (inmunogénicos o no) susceptibles de ser bloqueados, puede representar una buena estrategia para la creación de mecanismos protectores contra la enfermedad (fármacos, anticuerpos, vacunas) que a fin de cuentas, es lo más importante.

Aunque en este estudio se mencionó que la correlación de los niveles altos de anticuerpos IgG con la protección anti-micetoma fue significativa, lo cierto es que no es posible establecer una relación de causalidad entre ambos eventos, sobre todo si se tiene en cuenta la participación de la respuesta inmune celular en la protección, la cual no fue objeto de estudio en esta tesis. Lo que sí quedó claro en este trabajo fue que la habilidad de la rSodA para conferir protección anti-micetoma en los animales infectados con *N. brasiliensis*, sugiere **su participación como un factor de virulencia** en esta bacteria, lo cual contribuye a un mejor entendimiento acerca de los mecanismos de patogenicidad de *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

1. La cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358) posee solamente una actividad superóxido dismutasa correspondiente al tipo A.
2. La SodA recombinante de *N. brasiliensis* demostró ser inmunogénica en ratones BALB/c.
3. La SodA recombinante de *N. brasiliensis* fue capaz de inducir protección total (hasta los 90 días post-infección) contra el establecimiento del actinomicetoma en ratones BALB/c.
4. El papel de los anticuerpos IgG anti-rSodA en el momento de la infección parece ser clave para la protección anti-micetoma.
5. La inducción de protección anti-micetoma, sugiere la participación de la SOD en la patogenicidad de *N. brasiliensis* y su papel como un posible factor de virulencia.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

1. Idear nuevas estrategias de bloqueo de la actividad SOD de *N. brasiliensis* utilizando nuevos vectores (antisentido o de integración) o anticuerpos monoclonales anti-SodA
2. Ensayar la obtención rSodA a partir de otros vectores de expresión para posibilitar su aislamiento con una conformación activa.
3. Realizar experimentos de inmunización pasiva con anticuerpos anti-rSodA a fin de aclarar su participación en la protección anti-micetoma.

REFERENCIAS

- Alcendor DJ, Chapman GD, Beaman BL. (1995) Isolation, sequencing and expression of the superoxide dismutase-encoding gene (*sod*) of *Nocardia asteroides* strain GUH-2. *Gene* **164**: 143-147.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1999) Short Protocols in Molecular Biology. 4^a ed. Ed. WILEY; NY, USA.
- Baek KH, Kim HS, Oh, HM, Yoon BD, Kim J, Lee IS. (2004) Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J Environ Sc Health A39*: 2465-2472.
- Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochem* **43**: 8038-8047.
- Bartos M, Falkinham JO III, Pavlik I. (2004). Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in *Mycobacteria*. *Vet Med* **5**: 161-170.
- Battistoni A. (2003) Role of prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase in pathogenesis. *Biochem Soc Trans* **31**: 1326-1329.
- Beaman BL, Scates SM. (1981) Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infect Immun* **33**: 893-907.
- Beaman BL, Scates Sm, Moring SE, Deem R, Misra HP. (1983) Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. *J Biol Chem* **258**: 91-96.
- Beaman BL, Black CM, Doughty F, Beaman L. (1985) Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **47**: 135-141.

- Beaman L, Beaman B. (1990). Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect Immun* **58**: 3122-3128.
- Beaman BL, Beaman L. (1994) *Nocardia* species: Host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* **7**: 213-264.
- Beaman DL, Saubolle MA, Wallace RJ. (1995) *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia*, and other aerobic actinomycetes of medical importance. *En: Manual of Clinical Microbiology* 6^a ed. Ed. ASM Press; Washington DC. p. 329-399.
- Beauchamp C, Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287.
- Benavides-López J, Quintero G, Guevara-Vizcaíno AL, Jaimes-Cáceres DC, Gutiérrez-Riaño SM, Miranda-García J. (2006) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA* **4**: 82-90.
- Blanchard R (1896) Parasites végétaux à l'exclusion des bactéries. *En: Bouchard B. (Ed) Traite de Pathologie Generale*. G Massan, Paris, **2**: 811-932.
- Bordier C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* **256**: 1604-07.
- Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs R. (2003) SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **48**: 453-464.
- Carvalho-Queiroz C, Cook R, Wang CC, Correa-Oliveira R, Bailey NA, Egilmez NK, Mathiowitz E, LoVerde PT. (2004) Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni* cytosolic superoxide dismutase, a protective vaccine candidate, with host superoxide dismutase and identification of parasite-specific B epitopes. *Infect Immun* **72**: 2635-2647.
- Cascales-Angosto M. (2005) Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anal Real Acad Nac Farm* **71**: 365-386.
- Chung HJ Choi JH, Kim EJ, Cho YH, Roe JH. (1999). Negative Regulation of the gene for Fe-containing superoxide dismutase by a Ni-responsive factor in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **181**: 7381-7384.

- Conde C, Melendro EI, Fresán M, Ortiz-Ortiz L. (1982) *Nocardia brasiliensis*: mycetoma induction and growth cycle. *Infect Immun* **38**: 1291-1295.
- Deem RL, Doughty FA, Beaman BL. (1983) Immunologically specific direct T lymphocyte-mediated killing of *Nocardia asteroides*. *J Immunol* **130**: 2401-2406.
- Dosch DC, Salvacion FF, Epstein W. (1984) Tetracycline resistance element of pBR322 mediates potassium transport. *J Bacteriol* **160**: 1188-1190.
- Eppinger H. (1890) Über eine neue, pathogene *Cladothrix* und eine durch sie hervorgerufene pseudotuberculosis. *Wien Klin Wochenschr* **3**:321-323.
- Espinoza-Ruiz, Marisol. (2006) Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c. (Tesis doctoral).
- Filice FA. (1985) Inhibition of *Nocardia asteroides* by neutrophils. *J Infect Dis* **151**: 47-56.
- Flohe L, Otting F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* **105**: 93-104.
- Folb PI, Timme A, Horowitz A. (1977) *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect Immun* **18**: 459-466.
- Forman HJ, Fridovich I. (1973) On the stability of bovine superoxide dismutase. *J Biol Chem* **248**: 2645-2649.
- Fridovich I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**: 147-159.
- Fridovich I (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* **272**: 18515-18517.
- Ghosh S, Goswami S, Adhya S. (2003). Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *J Biochem* **369**: 447-452.
- Godfrey J. (1846) Disease of the foot not hitherto described. *Lancet* **1**: 593-594.

- Gonzalez-Ochoa A. (1969) Experimental production of mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in the mouse. *Gac Med Mex* **99**: 773-781.
- Gordon RE. (1981) A proposed new status for *Nocardia asteroides*. *Zentralbl Bakteriol Microbiol Hygiene Abt, 1 Suppl* **11**: 3-6.
- Guimares CC, Castro LG, Sotto MN. (2003) Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop* **87**: 377-384.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* **92**: 3007-3017.
- Harth G, Horwitz MA. (1999) Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. *J Biol Chem* **274**: 4281-4292.
- Hay RI, Mahgoub ES, Lean G. (1992) Mycetoma. *J Med Vet Mycol* **1**: 41-49.
- Henle ES, Linn S. (1997) Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxidase. *J Biol Chem* **272**: 19095-19098.
- Hwang CS, Rhie G, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO. (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* **148**: 3705-3713.
- Kang S, Jung Y, Kim C, Song C. (1998) Extracellular and cytosolic iron superoxide dismutase from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**: 784-789.
- Ken C, Lee C, Duan K, Lin C. (2005) Unusual stability of manganese superoxide dismutase from a new species, *Tatumella ptyseos* ct: its gene structure, expression, and enzyme properties. *Prot Express Purif* **40**: 42-50.
- Keyer K, Imlay JA. (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *PNAS-USA* **93**: 13635-13640.
- Licón-Trillo A, Castro-Corona MA, Salinas-Carmona MC. (2003) Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis*

protease involved in pathogenesis of mycetoma. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**: 37-44.

- Lynch M, Kuramitsu H. (2000) Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microb Infect* **2**: 1245-1255.
- Maghoub ES. (1978) Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, nu/nu strain with mycetoma agents. *Sabouraudia* **16**: 225-228.
- Merkamm M and Guyonvarch A. (2001) Cloning of the *sodA* gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability. *J Bacteriol* **183**: 1284-1295.
- Méndez-Tovar LJ, Mondragón-González R, Vega-López F, Dockrell HM, Hay R, López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Padilla-Desgarenes C, Bonifaz A. (2004) Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathologia* **158**: 407-414.
- Miles AA, Misra SS. (1938) The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hygiene* **38**: 732-749.
- Miller AF. (2004) Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 162-168.
- Muñoz-Montesino C, Andrews E, Rivers R, Gonzalez-Smith A, Moraga-Cid G, Folch H, Cespedes S, Oñate AA. (2004) Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of *Brucella abortus* induces SOD-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Infect Immun* **72**: 2081-2087.
- Nocard ME. (1888) Note sur la maladie des boeufs de la Guadeloupe connue sous le nom de farcin. *Ann Inst Pateur* **2**: 293.
- Nunoshiba T, Obata F, Boss AC, Oikawa S, Mori T, Kawanishi S, Yamamoto K. (1999). Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 34832-34837.
- Ogino K; Kodama N; Nakajima M; Yamada A; Nakamura H; Nagase H; Sadamitsu D; Maekawa T. (2001) Catalase catalyzes nitrotyrosine formation from sodium azide and hydrogen peroxide. *Free Radical Res* **35**: 735-747.

- Oñate AA, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, Muñoz C, Folch H, Andrews E. (2003) A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* **71**: 4857-4861.
- Ortiz-Ortiz L, Bojalil L, Contreras FM. (1972) Delayed hypersensitivity to polysaccharides from *Nocardia*. *J Immunol* **108**: 1409-1412.
- Pérez-Rivera, Luz Isabel. (2005) Comparación del efecto protector de la respuesta inmune humoral inducida por antígenos solubles y particulados de *Nocardia brasiliensis*. (Tesis doctoral).
- Piddington DL, Fang FC, Laessig T, Cooper AM, Orme IM, Buchmeier NA. (2001) Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infect Immun* **69**: 4980-4987.
- Revol A, Espinoza-Ruiz M, Medina-Villanueva I, Salinas-Carmona M. (2006) Expression of *Nocardia brasiliensis* superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. *Can J Microbiol* **52**: 1255-1260.
- Rico G, Ochoa R, González-Mendoza OA, Walker SM, Ortiz-Ortiz L. (1982) Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. *J Immunol* **129**: 1688-1693.
- Rocha-Pizaña, María del Refugio. (2008) Generación de *Nocardia brasiliensis* verde fluorescente para estudiar la relación macrófago-bacteria. (Tesis doctoral).
- Rodríguez-Nava V, Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P, Laurent F. (2004) *Nocardia mexicana* sp. nov. A new pathogen isolated from human mycetomas. *J Clin Microbiol* **42**: 4530-4535.
- Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. (2003) Phylogeny of genus *Nocardia* based on reassessed rRNA 16S gene sequences reveals underspeciation in and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J Clin Microbiol* **41**: 851-856.

- Ruimy R, Riegel P, Carlotti A, Boiron P, Bernardin G, Monteil H, Wallace RJ Jr, Christen R. (1996) *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. nov., a new species of *Nocardia* which groups bacterial strains previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. *Inter J System Bacteriol* **46**: 259-264.
- Salinas-Carmona MC. (1997) Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *Clin Diag Lab Immunol* **4**: 133-137.
- Salinas-Carmona MC, Vera L, Welsh O, Rodríguez M. (1992) Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zbl Bakt* **276**: 390-397.
- Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM. (1993). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J Clin Microbiol* **31**: 2901-2906.
- Salinas-Carmona MC, Torres-López E. (1996) Role of passive humoral immunity in experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Ann NY Acad Sci* **797**: 263-265.
- Salinas-Carmona MC, Castro-Corona MA, Sepúlveda-Saavedra J, Pérez-Rivera I. (1997) Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *Clin Diag Lab Immunol* **4**: 133-137.
- Salinas-Carmona MC. (2000) *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microb Infect* **2**: 1373-1381.
- Salinas-Carmona MC. (2001). Anticuerpos anti-*Nocardia brasiliensis* en pacientes con actinomicetoma y su utilidad clínica. *Gac Med Mex* **137**: 1-8.
- Salinas-Carmona MC, Pérez-Rivera I. (2004) Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun* **72**: 5597-5604.
- Salinas-Carmona MC, Ramos AI, Pérez-Rivera I. (2006) Immunogenicity is unrelated to protective immunity when induced by soluble and particulate antigens from *Nocardia brasiliensis* in BALB/c mice. *Microb Infect* **8**: 2531-2538.

- Sambrook J, Russell DW. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3^a ed. Ed. Cold Spring Harbor, NY; USA.
- Saubolle MA, Sussland D. (2003) Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol* **41**: 4497-4501.
- Schäfer G, Kardinahl S. (2003) Iron superoxide dismutases: structure and function of an archaic enzyme. *Biochem Soc Trans* **31**: 1330-1334
- Serrano JA, Sandoval HA, Beaman BL. (2007) *Actinomicetoma*. Plaza y Valdez Editores, México.
- Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. (2001) Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* **69**: 4034-4040.
- Singh SM, Panda AK. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioengin* **99**: 303-310.
- Smith I. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* **16**: 463–496.
- Strohmeier-Gort A, Imlay JA. (1998). Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defences. *J Bacteriol* **180**: 1402-1410.
- Tatum FM, Detilleux PG, Sacks JM, Halling SM. (1992). Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival *in vitro* in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. *Infect Immun* **60**: 2863-2869.
- Trevisan V. (1889) I generi e le specie delle batteri lancee Milano: Zanaboni e Gabazzi. *Int Bull Bacteriol. Nomenclat. Taxon* **2**: 13-14.
- Tullius MV, Harth G, Horwitz MA. (2001) High Extracellular levels of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism. *Infect Immun* **69**: 6348-6363.
- Vera-Cabrera L, Johnson WM, Welsh O, Resendiz-Uresti FL, Salinas-Carmona MC. (1999) Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene

fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona*, and *Rhodococcus*. *J Clin Microbiol* **37**: 1971-1976.

- Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC, Welsh O, Rodríguez MA. (1992) Isolation a purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J Clin Microbiol* **30**: 1183-1188.
- Wallace RJ Jr., Brown BA, Blacklock Z, Ulrico R, Ken J, Brown JM, McNeil MM, Onyi J, Steingrube VA, Gibson J. (1995) New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J Clin Microbiol* **33**: 1528-1533.
- Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona M. (2007) Mycetoma. *Clin Dermatol* **25**: 195-202.
- Yamaguchi S, Kumagai A, Funahashi Y, Jitsukawa K, and Masuda H. (2003). An accurately-constructed structural model for an active site of Fe-containing superoxide dismutases (Fe-SODs). *Inorg Chem* **42**: 7698-7700.
- Zamora A, Bojalil L, Bastarrachea F. (1963) Immunologically active polysaccharides from *N. asteroides* and *N. brasiliensis*. *J Bacteriol* **85**: 549-555.
- Zlotnik H, Buckler HR. (1980) Experimental production of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun* **29**: 1141-1145.
- Zlotnik H, Schramm VL, Buckley HR. (1984) Purification and partial characterization of a *Nocardia brasiliensis* extracellular protease. *J Bacteriol* **157**: 627-631.

APÉNDICES

APÉNDICE A

LISTADO DE INICIADORES PARA PCR

TABLA A1. Iniciadores utilizados en este trabajo.

INICIADOR	AMPLICÓN	SECUENCIA
SODAorf	<i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i>	5'-AGGAAGATGCATCGTGGCTGAG-3'
SODAFin	<i>sodA</i> de <i>N. brasiliensis</i>	5'-AAGCTTGATCAGCCGAAGAAGAGGCCCTTG-3'
TET1	<i>tet^R</i> de pBR322	5'-CAAGTATTCCGCGGTTTGAC-3'
TET2	<i>tet^R</i> de pBR322	5'-AGTTCTCCGCGGGAATTG-3'
PCR	<i>gn^R</i> de pRU1701	5'-GGATCGAATTCATTAGGTGGCGG-3'
PCF	<i>gn^R</i> de pRU1701	5'-GTGACGGTACCATACGCACACCG-3'

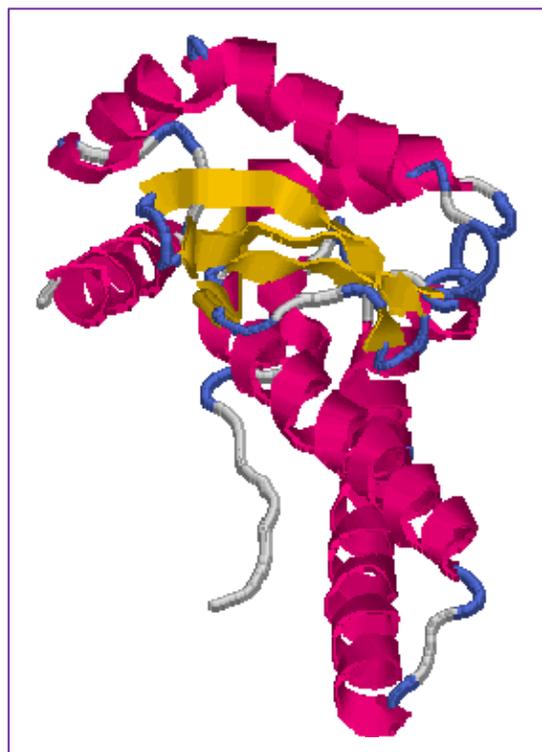
Nota: las bases subrayadas denotan sitios de restricción

APÉNDICE B

PREDICCIÓN TEÓRICA DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA SodA DE *N. brasiliensis*



Figura B1. Estructura 3D teórica de SodA en diseño de cintas (*ribbons*). Se aprecian las conformaciones de α -hélices (en rosa) y β -plegados (en amarillo).



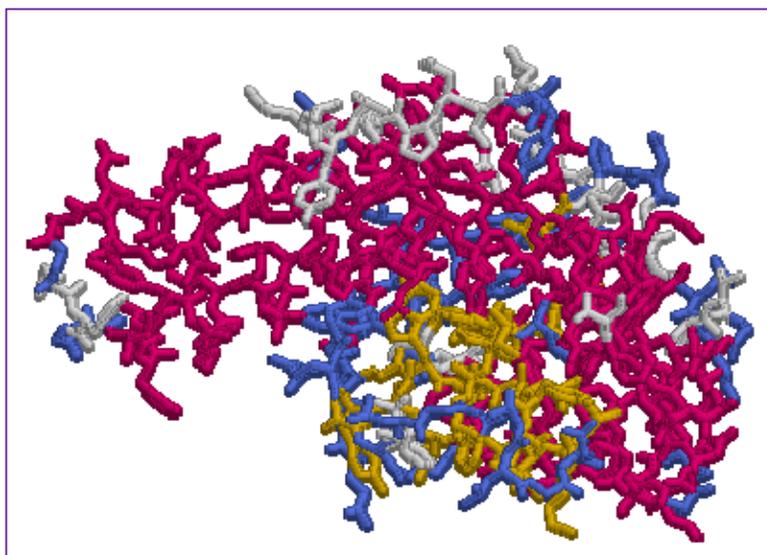
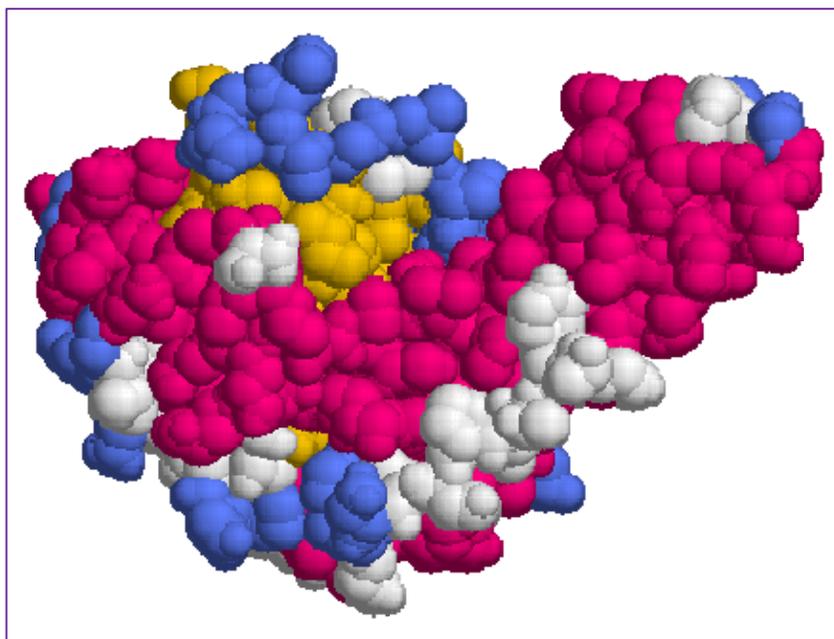


Figura B1. Estructura 3D teórica de SodA en diseño de globular (*spacefill*, arriba) y de bastones (*sticks*, abajo). El sitio teórico de acción de la enzima y de su asociación al cofactor metálico se señala en amarillo.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Igor Israel Medina Villanueva

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunología

Tesis: PAPEL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN LA VIRULENCIA DE
Nocardia brasiliensis

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Conkal, Yucatán, México el 9 de febrero de 1975, hijo de Elmer Medina Polanco y Vilma Villanueva Aguayo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Yucatán, grado obtenido Médico Cirujano en 2000. Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Maestro en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética en 2004.

Reconocimientos: Mejor Tesis de Maestría UANL 2004 en el área de Ciencias Naturales y Exactas. Alumno Distinguido de Posgrado 2007 área Doctorado en Inmunología.