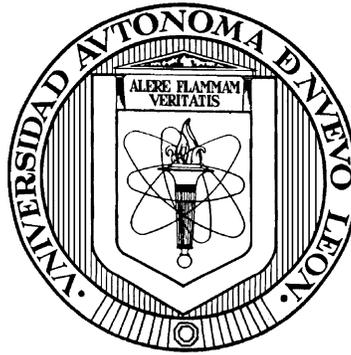


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *Nocardia brasiliensis*
DURANTE LA INFECCIÓN *in vitro* DE MACRÓFAGOS
PERITONEALES DE RATÓN DE LA CEPA BALB/c.**

Por

MARISOL ESPINOZA RUÍZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGÍA.**

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

I. INTRODUCCIÓN

1. Fagocitos mononucleares: Sistema antimicrobiano.

La activación del macrófago es esencial para aumentar la actividad microbicida en infecciones intracelulares (Devki, 2001). Estos fagocitos producen intermediarios reactivos de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno de crucial importancia para la resistencia del hospedero contra patógenos microbianos. Estas células también poseen mecanismos microbicidas independientes de oxígeno y nitrógeno, los cuales incluyen: a) Acidificación de la vacuola fagolisosomal, b) Acción de enzimas hidrolíticas c) Ausencia de nutrientes (incluyendo hierro), d) Proteínas antimicrobianas (Kaufmann, 1993).

Hace más de un siglo, Metchnikoff fue el primero en describir la fagocitosis y más de cuatro décadas después se descubrió que el estallido respiratorio estaba asociado con la muerte microbiana. Décadas de investigación han permitido conocer algunos mediadores moleculares, en el proceso de fagocitosis, sin embargo todavía se desconocen muchos procesos en la resistencia a la infección, por lo que todavía existe la pregunta ¿Cómo los fagocitos pueden resolver una infección y otra no ?.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Irónicamente los monocitos y macrófagos son también células blanco de diversos patógenos que requieren de un medio intracelular para replicarse. Esta es una curiosa paradoja a la cual no se encuentra todavía explicación. Hay evidencias de que existen alteraciones en la actividad de defensa de las células fagocíticas contra microorganismos intracelulares. En estas infecciones, los factores inmunológicos que juegan un papel importante en la defensa del hospedero inexplicablemente no colaboran con la resistencia a la infección (Salinas, 1992). Entre los microorganismos intracelulares que resisten a la infección y pueden afectar la función del macrófago se incluyen a *Leishmania*, *Yersinia*, *Mycobacterium* y virus como el VIH. Estos gérmenes afectan a nivel de la transcripción del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, o la fagocitosis y la de su actividad microbicida (Devki, 2000). Se ha establecido que *Nocardia* puede resistir los efectos microbicidas y multiplicarse intracelularmente.

1.2 Actinomicetos como agentes patógenos.

El género *Nocardia* pertenece al orden *Actinomycetales* y a la familia *Nocardiaceae*. Dentro de este género se han descrito 18 especies oficialmente aceptadas, de las que se reconocen 11 como patógenas humanas: *Nocardia asteroides sensu stricto* (tipo I y tipo VI), *N. farcinica*, *N. nova*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, complejo *N. transvalensis* (*N. asteroides* tipo IV, *sensu stricto*, nuevo taxon I y II), *N. pseudobrasiliensis*, *N. brevicatena*, *N. paucivorans*, *N.*

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

abscesus y *N veterana*; siendo las seis primeras especies las que causan infección en el hombre con mayor frecuencia. Este grupo de bacterias fue clasificado como hongo por la presencia de hifas, sin embargo la presencia de peptidoglicanos, pared celular lipídica y ausencia de quitina son características que ayudaron a definir su naturaleza bacteriana (Salinas 2000).

1.2.1 Descripción microbiológica

Las nocardias, en las muestras clínicas o en los cultivos primarios, se caracterizan por ser bacilos ramificados de 0,5 a 1 μm de diámetro, con subramificaciones en ángulo recto. Son irregularmente Gram positivas y parcialmente ácido-alcohol resistentes. En los subcultivos van perdiendo sus afinidades tintoriales y su morfología inicial, fragmentándose en formas cocobacilares. Poseen una pared celular de tipo IV con ácidos grasos de unos 50 átomos de carbono, ácido 2,6 meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa. Son inmóviles, no capsuladas, no esporuladas, resistentes a la lisozima y productoras de catalasa y superóxido dismutasa (Beaman,1994, 1995; Sandoval, 1993; Vera 1992).

El hábitat natural de las nocardias es el suelo, desarrollando un importante papel en los procesos de descomposición de la materia vegetal, no formando parte de la flora comensal humana ni animal. Son aerobias facultativas, toleran un pH entre 6,5 y 9, crecen a temperaturas entre 10 y 50° C; En medios sólidos

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

usuales crecen variablemente, entre 48 horas a 3-4 semanas. El aspecto de las colonias depende de la especie, el medio de cultivo y de la propia cepa, formando colonias que normalmente son blancas, secas y arraigadas al agar o, a veces, pastosas, picudas y pigmentadas de color marrón asalmonado, desprendiendo un olor característico a enmohecido o tierra mojada. (Beaman, 1995; Salinas, 2000).

1.2.2 *Nocardia brasiliensis*: agente causal de actinomicetoma en México

El micetoma es la manifestación clínica tardía (semanas, meses o años) de una infección resultado de la inoculación traumática en la piel y tejido subcutáneo de un actinomiceto o de un hongo. Esta enfermedad se localiza y se distribuye en regiones comprendidas entre el trópico de Cáncer y Capricornio. Los primeros casos se descubrieron en la provincia de Madura en la India, por lo que también se conoce con el nombre de “pie de Madura” (Ferre, 2001; Rippon, 1990). Se presenta en forma endémica en países no desarrollados como India, Tailandia, Somalia, Venezuela, Sudán, Senegal, Brasil, México etc. Los agentes causales varían con la región geográfica. En México, cerca del 86% de los casos de micetoma son producidos por bacterias entre las cuales *Nocardia brasiliensis* es la más común. A nivel mundial, México tiene el mayor número de casos de actinomicetomas por *N. brasiliensis* reportados después de Sudán (Salinas, 2000).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

El proceso infeccioso inicia cuando *N. brasiliensis* rompe las barreras del cuerpo y se encuentra con los fagocitos neutrófilos y macrófagos, estas células fagocíticas, no siempre destruyen las bacterias (Gordon, 1980; Kauffman, 1993) y permiten la multiplicación dentro del macrófago. A medida que este proceso evoluciona se establece una respuesta inflamatoria con infiltración de PMNs, macrófagos y linfocitos, si la respuesta no es suficiente como para resolver la infección, se desarrolla una infección progresiva circunscrita a una lesión localizada o se extiende a los tejidos adyacentes incluso músculo y hueso. (Beaman, 1993; McNeil, 1994).

1.2.2.1 Respuesta inmunológica contra *N. brasiliensis*.

En humanos y animales se han demostrado anticuerpos (Acs) anti-Nocardia y respuesta de hipersensibilidad tardía contra antígenos de la bacteria, pero su papel en la resistencia del hospedero todavía no es claro.

Respuesta inmune humoral. Son varios los grupos de investigación que han identificado clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) tanto en la infección experimental como en la infección progresiva en humanos. (Conde, 1983; Beaman, 1993; Torres, 1995; Salinas, 1992, 1993, 2000 y 2004). Por

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

inmunohistoquímica se han localizado Acs en gránulos y células plasmáticas de las lesiones de ratones infectados con *N. brasiliensis* a las dos semanas y en sueros a los 30-45 días post-infección (Conde,1983; Salinas,1992). A pesar de la presencia de Acs anti-Nocardia, la inmunización pasiva por inyección de sueros hiperinmunes a ratones no inmunizados, no ha conferido protección significativa contra células virulentas de *N. brasiliensis* (Rico, 1982 Torres, 1995). Ni tampoco ha mostrado en forma *in vitro*, actividades opsónicas o microbidas significativas en presencia o ausencia de PMNs, monocitos, macrófagos o complemento (no obstante la presencia de depósitos de C3 en el gránulo) (Ortiz,1979; Beaman,1994;McNeil, 1994;Torres, 1995). Recientemente se demostró que los Acs IgM juegan un papel protector en la infección causada por *N. brasiliensis*, en experimentos de inmunización activa y pasiva se comprobó que los anticuerpos IgM pero no los IgG eran capaces de conferir protección total (Salinas-Carmona y Pérez, 2004). Controversialmente diversos reportes indican que los Acs pueden incrementar la enfermedad infeccioso provocada por *N. brasiliensis*. Se ha demostrado que lesiones crónicas inducidas por Nocardia contienen grandes cantidades de complejos inmunes los cuales se piensa exacerba la severidad y cronicidad de las lesiones jugando un papel en el daño tisular característico (Rico, 1982; Conde, 1983; Beaman, 1993).

Respuesta inmune celular. Contrario a las evidencias y opiniones sobre la respuesta inmune humoral y susceptibilidad o resistencia al desarrollo de

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

nocardiosis y micetoma. Las evidencias y opiniones sobre la respuesta inmune mediada por células tienden a concordar en que la deficiencia en la inmunidad celular se acompaña de susceptibilidad mayor al desarrollo de nocardiosis y micetomas progresivos. Las evidencias en diversos modelos animales indican que, así como para las bacterias y protozoarios intracelulares más conocidos, la inmunidad mediada por células es el mecanismo que resiste la infección por *Nocardias* (Ortiz,1972; Beaman,1982,1993; Rico,1982; Deem, 1983;McNeil, 1994;Ehlers,1994).

Aunque no se conoce información tan específica para el caso del micetoma producido por *N. brasiliensis* en ratones y ratas deficientes en células T, se ha demostrado la importancia de esta población celular para proteger contra la infección aguda o crónica por *Nocardia* y microorganismos relacionados. Animales deficientes en células T infectados con *N. asteroides* desarrollan infección diseminada y persistente mientras que en los normales ocurre infección localizada de menor duración (Beaman,1993; McNeil, 1994; Rico, 1982; Deem, 1982). Se transfirieron células T de animales infectados con *N. asteroides* a animales deficientes en este tipo de células y se observó un aumento en la capacidad del hospedero para eliminar a la bacteria (Beaman, 1993).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

1.2.2.2 Descripción clínica del Actinomicetoma por *N. brasiliensis*

El diagnóstico de micetoma se hace en base al cuadro clínico, en el cual es considerada como una enfermedad local crónica y progresiva de la piel, tejidos subcutáneos y óseo, que se caracteriza por una tumefacción con fístulas que drenan un exudado serosanguinolento o purulento que contiene “gránulos” que corresponden a colonias del agente causal (Salinas Carmona, 1992). El diagnóstico se confirma con el cultivo microbiológico de la secreción pero esto tarda de 2 a 3 semanas por el crecimiento lento de los microorganismos.

1.2.2.3 Diagnóstico Inmunológico de *N. brasiliensis*.

Desde hace muchos años, varios autores intentaron desarrollar un diagnóstico inmunológico para la detección de *N. brasiliensis* sin buenos resultados, en parte porque las técnicas que utilizaron eran de baja sensibilidad y porque los antígenos que se emplearon eran extractos crudos no purificados y presentaron reacciones cruzadas con los sueros de personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* (Rippon,1990; Beaman,1992; Arenas,1993). En años más recientes, Salinas-Carmona y colaboradores identificaron varios antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis* mediante la técnica de eletrotransferencia (Western blot), identificándose tres proteínas denominándose P61, P26 y P24. Después, con el uso de técnicas simples, se logró el aislamiento y purificación de P61 y P24.(Salinas, 1998). Con estas proteínas Salinas-Welsh y Casillas

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

desarrollaron una técnica de ELISA que sirve para el diagnóstico serológico de *N. brasiliensis*.

1.2.3 Condiciones que favorecen la permanencia y multiplicación de *Nocardia* en macrófagos.

1.2.3.1 Factores de virulencia.

Una variedad de mecanismos contribuyen a la evasión de fagocitos mononucleares durante la infección intracelular.

Si bien todas las *Nocardias* son fagocitadas, su destino intracelular es incierto. Existen reportes en donde se señala que la presencia de alfa trehalosa 66 dimicolato en la pared celular de *N. asteroides* inhibe la fusión fago-lisosoma en el macrófago (Beaman, 1985).

Black y colaboradores reportaron que *N. asteroides* GUH-2 juega un papel importante en la inhibición de la acidificación fagosomal ya que bloquea o neutraliza la acidificación de los fagosomas en los macrófagos de ratones (Black, 1986).

La catalasa juega un papel importante en los mecanismos microbicidas en *N. asteroides* (Beaman 1995) sin embargo estudios hechos por Torres López y Salinas demostraron que la catalasa no participaba como factor de virulencia en *N. brasiliensis*. (Torres, 2004).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

La pared celular de los actinomicetos es considerada química y estructuralmente compleja ya que posee un alto contenido de lípidos, proteínas y polisacáridos; es rica en ácidos micólicos, los cuales se encuentran unidos covalentemente con glicolípidos. Esta barrera permeable protege al organismo del medio ambiente, contribuye a la persistencia de una infección y a la resistencia a muchos antibióticos a la vez que contribuye a la larga vida de la bacteria. Inicia las reacciones inflamatorias del hospedero y actúa en la patogénesis de la enfermedad. *Nocardia asteroides* es un actinomiceto que posee también un alto contenido de material lipídico, en algunos estudios se indica que hay modificaciones significativas en la composición de ácidos micólicos y ácidos grasos en diferentes etapas de crecimiento de la bacteria es decir se vuelven altamente poli-insaturados durante la fase logarítmica de crecimiento (considerada fase virulenta), lo que no pasa en la fase estacionaria (menos virulenta), estos resultados indican que es posible que exista una asociación de los componentes lipídicos de la bacteria con su patogenicidad (Biaggini,1996., Feistner,1987). Existen enzimas importantes en el metabolismo de los lípidos como son las tiolasas las cuales se encuentran en eucariotas y procariotas y participan en el metabolismo de ácidos grasos, cetonas y esteroides (Mckee 2003) . Castro obtuvo una proteína inmunodominante de *Nocardia asteroides* cuya secuencia aminoacídica es de una tiolasa. La función de esta enzima en presencia de la actividad microbicida de fagocitos se desconoce. (Castro, 2005).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

La regulación de la expresión de genes en respuesta a un medio ambiente nuevo es una respuesta adaptativa requerida para la replicación y sobrevivencia de algunos microorganismos, donde la expresión de algunas proteínas con actividad enzimática de bacterias contribuye también a su permanencia. Estos productos bacterianos son conocidos como factores de virulencia, son característicos de cada especie y favorecen la habilidad de colonizar y causar la enfermedad, a su vez facilitan la invasión y actúan como inductores de toxicidad. Específicamente son representados por bacterias que contienen: cápsula, pili, fimbrias, adhesinas, exotoxinas, endotoxinas y enzimas de las cuales las mas relevantes son hialurodinasas, fibrinolisinias, hemolisinas, coagulasas, catalasas, proteasas, RNAsas y DNAsas. (Pfeifer, 1999).

1.2.3.2. Superóxido dismutasa (SOD) como factor de virulencia

La SOD es considerada un factor de virulencia en muchos microorganismos ya que se considera una enzima clave en el sistema de defensa oxidativo catalizando la reacción de anión superóxido a peróxido de hidrógeno, protegiendo a las células contra el stress oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno que producen efectos citotóxicos alterando estructural y funcionalmente cualquier molécula biológica afectando lípidos, proteínas y ADN (Muriel, 2001). Las SODs son clasificadas en diferentes grupos

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

dependiendo del tipo de cofactores metálicos: la que contiene cobre y zinc (Cu-Zn SOD), la que contiene hierro (Fe-SOD), manganeso (Mn-SOD), y Níquel (Ni-SOD) (Fridovich, 1995). Se han encontrado MnSOD y FeSOD en el citoplasma mientras que Cu-ZnSODs en el periplasma o periferia de bacterias patógenas y endosimbióticas (Muriel, 2001). Así también se ha demostrado que SOD está relacionada con la resistencia de las bacterias (*Corynebacterium melassecola*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptomyces coelicolor*) en contra de la actividad microbicida de células fagocíticas del sistema inmunológico de murinos (Zhang, 1991; Heinzen, 1992; Muriel, 2001; Debra L, 2001).

Nocardia asteroides expresa FeMnZnSOD (Beaman, 1995), la cual tiene un papel importante en su resistencia a la muerte intracelular en neutrófilos murinos (Beaman, 1990).

Actualmente los eventos inmunológicos que se producen durante el proceso infeccioso por *N. brasiliensis* todavía no han sido bien esclarecidos. Sabemos que elementos diversos y específicos de la respuesta inmune son necesarios para controlar un cierto proceso infeccioso, dependiendo el éxito de las características microbianas y de la capacidad de respuesta del hospedero al patógeno.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

En general los factores que influyen en la progresión de la enfermedad por exposición a *Nocardia* son: Las características químicas y genéticas del microorganismo, así como su estado metabólico durante su permanencia en el hospedero y su vía de entrada, la susceptibilidad del hospedero en el momento de la exposición a la bacteria, durante la colonización y el desarrollo de la misma y la capacidad de respuesta inmune genéticamente determinada en el hospedero.

Poco conocemos sobre las características genéticas propias de cada microorganismo intracelular, esta información probablemente esta relacionada con los mecanismos que se producen para evadir el sistema inmunológico. Hay evidencias que indican que las bacterias patógenas intracelulares han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir adentro de las células del hospedero, utilizando su maquinaria genética para evadir, permanecer y multiplicarse dentro de él, por lo que se ha considerado que la adquisición de nuevo material genético ha sido una característica importante en la evolución de muchas bacterias patógenas (Gamieldin,2002). Por lo tanto debido a la información incompleta que nos arroja la determinación de los efectores del sistema inmunológico en la relación hospedero-patógeno es necesario estudiar la maquinaria transcripcional de microorganismos intracelulares. El conocimiento de las secuencias completas del genoma de importantes patógenos bacterianos y el desarrollo de técnicas de biología molecular han

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

permitido estudiar las interacciones entre los microorganismos y las células hospederas (Rindi L.1998), por lo tanto la aplicación de las técnicas de ingeniería genética al estudio de la patogenicidad bacteriana ha abierto un nuevo campo en el análisis de la virulencia a nivel molecular (Bassett, 1999; Brent, 1999).

La selección de la técnica apropiada para estudiar los cambios en la expresión de los genes bacterianos depende de la cantidad de genes que se quiere analizar y del conocimiento previo del genoma. El despliegue diferencial permite elucidar genes desconocidos en diferentes condiciones y aprovecha la presencia de poliadenilación en la región 3' de los ARNm. Estudios previos por diferentes investigadores indican la presencia de poliadenilación en algunas en el ARNm de bacterias. (Sarkar,1997; Fislage,1997 Ragno,1998; Rindi,1999; Adilakshmi,2000; Asnicar, 2001).

Tomando como base los antecedentes escritos anteriormente sobre SOD en relación a su capacidad virulenta en *N. asteroides* y tiolasa (antígeno inmunodominante en la infección con *N. brasiliensis*). Se decidió conocer los transcritos de estas proteínas para analizar cambios en su expresión cuando la bacteria estaba en medio de cultivo o infectando a macrófagos. Este estudio permitirá arrojar nuevos conocimientos sobre *N. brasiliensis* y su interacción con su célula blanco.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona le doy las gracias por todas las atenciones y por la confianza brindada.

Agradezco profundamente a la Dra. Agnes Revol Richard por todas sus enseñanzas, comprensión, paciencia y amistad. Gracias por confiar en mí y por permitirme trabajar a su lado.

A los profesores que formaron parte de la comisión de tesis: Dra Alma Y. Arce Mendoza, Dr. Juan Manuel Solís y Dr Oliverio Welsh, gracias por apoyarme, por su disposición y por sus recomendaciones durante la revisión del manuscrito.

A mis compañeros y amigos: Igor, Iram , Rafael, Hipólito, Olivia, Luis Miguel, Mirella, Marichuy, Erica, Karina, Mari, Juan Carlos Canale de la ULIEG, Isabel, Alejandra, Juan Manuel, Lupita, Marisela, Pilarcita y Adrián de Inmunología

GRACIAS porque de alguna u otra forma me brindaron su apoyo y su tiempo.

MUCHAS GRACIAS: A todo el personal de INMUNOLOGIA Y DE LA ULIEG, ya que también formaron parte del equipo de trabajo en el desarrollo de esta tesis.

Al M. en C. Guillermo García García, director de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNACH por el apoyo brindado.

A las familias regias:

A Sara Vázquez por ese apoyo incondicional que me has dado en todo momento, muchas gracias amiga, a Martha, María por esos momentos tan agradables que pasamos con los niños.

A la familia del Apostolado:

Becerril Lozano (Carlos y Luli), Martínez González(Chuy y Vicky), González de León (Manuel y Lina), Cepeda Cortéz(Juan Manuel y Sara) y a los Soto Morales(Julio y Paty).

A los Mendoza Revol (Agnes, Cloe, Cedric y Ludo), a los Díaz Pérez(Alberto,Isabel), a los Díaz Gallegos (Ale y Victor), a los Solis Meester, (Juan Manuel e Irene). A todos muchas gracias por permitir a mí y a mi familia entrar a sus hogares y hacer esta estancia en Monterrey super agradable. ¡¡Muchas gracias por su amistad!!

DEDICATORIA

A mis amores

**A mi esposo Sergio
Por todo el apoyo y cariño que me has brindado**

**A mis hijos Sergio y Mauricio con todo mi amor, porque son unas personitas
SUPER importantes en mi vida, gracias por existir. LOS AMO**

A mis padres

**Gloria Ruiz y Elfido Espinoza (aunque ya no estés aquí), por todo el amor,
alegría, fortaleza y espíritu de lucha que me han enseñado.**

A mis hermanos

**Lupita, Elsy, Yoyis y Elfido por todo el amor y el apoyo que siempre me han
brindado. LOS QUIERO MUCHISIMO.**

A mis bellos sobrinos.

**Abril, Gerardo, Andrés, Chuy, Julio, Pepe, Angélica, Maye, Marisol y Esteban
con todo mi amor y por toda la felicidad que me han dado al existir cada uno
de ustedes.**

A LAS FAMILIAS:

**Aguila Espinoza, Sotelo Espinoza, Felix Espinoza, Espinoza Albores y
Nucamendi Espinoza. GRACIAS POR SER PARTE DE MI.**

LUGAR DE TRABAJO

**Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de
Inmunología Molecular del Depto de Inmunología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo
León, bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona y
la Dra Agnes Revol Richard**

**Mi agradecimiento al CONACYT y a la Facultad de
Medicina de la UANL por todo el apoyo brindado.**

INDICE

Contenido

Página

Aprobación de la Tesis

Resumen

Indice de Figuras

Indice de Tablas

I INTRODUCCIÓN

Fagocitos mononucleares:

Sistema antimicrobiano

1.2 Actinomicetos como agentes patógenos.

1.2.1 Descripción microbiológica

1.2.2 *Nocardia brasiliensis*: agente causal de actinomicetoma en México

1.2.2.1 Respuesta inmunológica contra *N. brasiliensis*.

1.2.2.2 Descripción clínica del Actinomicetoma por *N. brasiliensis*

1.2.2.3 Diagnóstico Inmunológico de *N. brasiliensis*.

1.2.3 Condiciones que favorecen la permanencia y multiplicación de

1.2.3.1 Factores de virulencia.

1.2.3.2 Superóxido dismutasa (SOD) como factor de virulencia

II OBJETIVOS

Objetivos específicos

III MATERIAL Y METODOS

3. 1 Reactivos químicos

3. 2 Material Biológico

3.2.1 Cepas bacterianas.

3.2.2 Ratones.

3. 3 Equipo

3. 4 Métodos

3.4.1 Estrategia general

3.4.2 Preparación de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*

3.4.3 Infección de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c con *Nocardia brasiliensis*.

3.4.4 Extracción del ARN

3.4.5 Análisis cualitativo y cuantitativo del ARN.

3.4.5.1 Electroforesis y cuantificación

3.4.5.2 Ensayos de RT-PCR para la verificación de la integridad de los RNA

3.4.6 Análisis de los ARNs de *N.brasiliensis*

3.4.6.1 Síntesis del ADN complementario a partir de poli dT

3.4.6.2 Despliegue diferencial de los transcritos de *N. brasiliensis* .

3.4.7. Clonación de secuencias de genes de superóxido dismutasa y tiolasa de *Nocardia brasiliensis*.

3.4.7.1 Obtención de ADN genómico.

3.4.7.2 Análisis electroforético del ADN

3.4.7.3 Amplificación de los genes de SOD y tiolasa.

3.4.7.4 Clonación de los productos amplificados de SOD y tiolasa

3.4.7.4.1 Reacción de ligación de los productos de PCR con el vector Topo XL

3.4.7.4.2 Transformación en células Top 10 electrocompetentes

3.4.7.4.3 Extracción de ADN plasmídico

3.4.7.4.4 Caracterización de las clonas recombinantes obtenidas

3.4.8 RT-PCR competitiva para observar cambios en la expresión de los genes bacterianos de SOD y tiolasa durante la infección del macrófago

3.4.8.1 Obtención de los competidores

3.4.8.1.2 Fragmento competidor de SOD.

3.4.8.1.3 Fragmento competidor de tiolasa

3.4.8.2 Ensayos de RT-PCR competitiva

3.4.8.2.1 Estandarización de la PCR competitiva de SOD y tiolasa.

3.4.8.2.2 Nivelación de la concentración del ARN bacteriano en las preparaciones obtenidas de *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* infectando al macrófago.

3.4.8.2.3 Ensayos semicuantitativos de SOD y de tiolasa de *N. brasiliensis*

IV RESULTADOS

4.1 Extracción del ARN total

4.2 Corroboración de la calidad del ARN de macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*.

4.3 Análisis de transcritos poli A+ de *N. brasiliensis*

4.3.1 RT radioactiva

4.3.2 Despliegue diferencial

4.4 Amplificación de los genes de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*.

4.4.1 Clonación de los genes de estudio.

4.4.2 Secuenciación de las clonas recombinantes de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*

4.5 RT-PCR competitiva de los genes de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*

4.5.1. Generación de competidores.

4.5.2. Estandarización de la PCR competitiva.

4.5.3 Equiparación de la cantidad de ARN bacteriano en los ensayos de RT-PCR competitiva

4.5.4. Ensayos de la expresión de los transcritos de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis* por RT-PCR competitiva

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *Nocardia brasiliensis* DURANTE LA INFECCIÓN in vitro DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN DE LA CEPA BALB/c.

Aprobación de la Tesis:

Dr Mario César Salinas Carmona
Director de Tesis

Dra Agnes Revol
Co-Director de Tesis

Dra Ama Yolanda Arce Mendoza
Comisión de Tesis

Dr. Juan Manuel Solís Soto
Comisión de Tesis

Dr. Oliverio Welsh Lozano
Comisión de Tesis

Dr. Dionicio Angel Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Postgrado

NOMENCLATURA

l	Litros
ng	Nanogramo
μ M	Micromolar
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda

Gp-P	Glicoproteína PHormona del crecimiento humano
cm	Centímetro
mm	Milímetro
M	Molar
h	Hora
°C	Grados centígrados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
U	Unidades
mM	Milimolar
pg	Picogramo
BSA	Albúmina sérica bovina
min	Minuto
s	Segundo
g	Gramo
ml	Mililitro
pH	Potencial de Hidrógeno
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco's
kDa	Kilodaltons
kb	Kilobases
nM	Nanomoles
pb	Pares de bases
mg	Miligramo
dNTPs	Dinucleótidos trifosfatos

μl	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetro
Abs	Absorbancia
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
PBS	Amortiguador salina fosfatos
SBF	suero bovino fetal
CMN	Células mononucleares
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA _m	RNA mensajero
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
MDR	Resistencia a múltiples drogas
RT	Retrotranscripción
RR	Riesgo relativo
P	Probabilidad

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Estrategia General. Esquema del procedimiento general para hacer la RT-PCR competitiva.	
2. Extracción de ARN de <i>N. brasiliensis</i> y macrófagos.	
3. RTPCR para ARNr16S de Nocardia y GAPDH para macrófagos de ratón.	
4. RT radioactiva que indica presencia de poliadenilación en los ARNs de Nocardia.	
5. Análisis de los ARNs de poli A de <i>N. brasiliensis</i> por despliegue diferencial.	
6. Secuencia de ARNr 16 S de <i>N. brasiliensis</i> .	
7. Amplificación de SOD a partir de ADNg de <i>N. brasiliensis</i> .	
8. Amplificación de tiolasa a partir de ADNg de <i>N. brasiliensis</i> .	
9. Caracterización con <i>Eco</i> RI de las clonas recombinantes de SOD de <i>N. brasiliensis</i> .	
10. Caracterización con <i>Eco</i> RI de las clonas recombinantes de tiolasa de <i>N. brasiliensis</i> .	
11. Digestión del vector recombinante de SOD de <i>N. asteroides</i> con <i>Sac</i> II.	
12. Competidor de SOD de <i>N. brasiliensis</i> en gel de agarosa al 2%.	
13. Competidor de tiolasa de <i>N. brasiliensis</i> en gel de agarosa al 1%.	
14. Fase exponencial de la PCR competitiva de SOD y tiolasa.	
15. Validación de la cantidad de ARN bacteriano en los ensayos de RTPCR competitiva.	
16. RTPCR de ARNr de bacterias.	
17. Expresión diferencial de SOD de <i>N. brasiliensis</i>	
18. Expresión diferencial de tiolasa de <i>N. brasiliensis</i>	

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Secuencia de iniciadores diseñados.	
2. Condiciones de reactivos para la RT (síntesis de ADNc).	
3. Condiciones de temperatura para la RT.	
4. Condiciones de PCR para ARNr de bacterias y GAPDH.	
5. Condiciones de temperatura para PCR de ARNr y GAPDH	
6. Condiciones para la RT radioactiva para determinar presencia de poliA en <i>N. brasiliensis</i> .	
7. Condiciones de RT para despliegue diferencial	
8. Condiciones de PCR-DD de <i>N. brasiliensis</i>	
9. Condiciones de PCR para SOD y tiolasa de <i>N. brasiliensis</i>	
10. Condiciones de temperatura para SOD y tiolasa	
11. Condiciones de digestión de SOD con <i>Sac II</i>	
12. Condiciones de ligación del vector recombinante de SOD	
13. Condiciones de digestión del vector recombinante de tiolasa con <i>BstE II</i> .	
14. Condiciones de digestión del vector recombinante de tiolasa con <i>Acc I</i> .	
15. Condiciones de ligación del vector recombinante de tiolasa.	
16. Condiciones de RTPCR para ARNr de bacterias.	
17. Condiciones de PCR competitiva SOD y tiolasa.	
18. Resultado de la intensidad relativa de la expresión de SOD y tiolasa de <i>N. brasiliensis</i>	

RESUMEN

Marisol Espinoza Ruíz
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: Cambios en la Expresión Génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c.

Número de páginas:

Candidato al grado de Doctor en Ciencias
con Especialidad en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología

Propósito y método del estudio: Uno de los determinantes claves de la virulencia de los microorganismos intracelulares es su habilidad para establecerse y replicarse dentro de la célula hospedera, evadiendo así la respuesta inmune del hospedero. Las especies patógenas de *Nocardia* tienen la habilidad de sobrevivir dentro del macrófago, pero las dos especies que han sido principalmente estudiadas (*N. asteroides* y *N. brasiliensis*), lo han sido desde el punto inmunológico. Para estas especies, es escasa o nula la información sobre los genes y productos bacterianos que pudieran estar implicados en esta relación (macrófago-*Nocardia*). Por lo que se decidió analizar cambios en la expresión de genes de superóxidodismutasa (SOD) y tiolasa de *N. brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón. En nuestro estudio el análisis de los productos amplificados por despliegue diferencial indicó que las bandas de mayor intensidad correspondían a RNA ribosomales que se podían amplificar por la presencia de zonas internas ricas en adenina. La abundancia de estos ARNs y el tamaño corto de las colas de poli A reportado para los mensajeros bacterianos podrían explicar que se amplificaron principalmente fragmentos de los ARNr 23S. Por lo tanto, con estos resultados no se puede corroborar ni descartar la presencia de poliadenilación en los ARNs mensajeros de *Nocardia*. Para eliminar la interferencia de los ARNr ribosomales en los ensayos de despliegue diferencial, es indispensable eliminarlos mediante hibridación con sondas específicas que al introducir un paso adicional, complicaría el análisis comparativo de las poblaciones de mensajeros de las bacterias en cultivo versus las bacterias infectando los macrófagos. Por lo que se estandarizó una PCR competitiva para analizar los cambios de expresión de los transcritos de dos antígenos inmunodominantes en el género *Nocardia* (SOD y tiolasa). Para este propósito, se amplificaron y clonaron las secuencias de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*. Los competidores se derivaron de los plásmidos recombinantes previamente obtenidos, eliminando una secuencia interna pero preservando los sitios de alineamiento de los iniciadores. En las condiciones establecidas, la PCR competitiva permitió obtener una intensidad relativa de la banda correspondiente a los transcritos de SOD y de tiolasa proporcional a la cantidad inicial presente en el tubo, por lo cual la técnica quedó validada.

Contribuciones y Conclusiones: Se evidenciaron ARNs poliadenilados de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ATCC 700358. Se clonaron y secuenciaron parcialmente los genes de ARNr, SOD y tiolasa para *N. brasiliensis*, se estandarizó la RT-PCR competitiva para SOD y tiolasa. Una hora después de la infección del macrófago se observó una disminución relativa de los ARNm de SOD y tiolasa comparados con los ARNr. Se comprobó que existen cambios marcados de los niveles de transcritos bacterianos de SOD y tiolasa durante la infección del macrófago. Los resultados obtenidos en este estudio son los primeros en aportar conocimientos sobre la expresión de los transcritos de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*. Es importante recalcar que se requiere de más estudios para determinar si estas enzimas están relacionadas con la virulencia de la bacteria.

Dr. Mario C. Salinas Carmona
Director de Tesis

Dra Agnés Revol Richard
Co-director de Tesis

El agente etiológico del Actinomicetoma es *Nocardia brasiliensis*, bacteria intracelular facultativa que resiste los efectos microbicidas del macrófago y cuyo mecanismo de resistencia se desconoce. En el presente trabajo se analizaron cambios en la expresión de genes de *N. brasiliensis* en condiciones de cultivo e infectando al macrófago,

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Analizar los cambios en el patrón de expresión de genes de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Evidenciar la presencia de poliadenilación en los ARNm de *Nocardia brasiliensis*.
- 2) Clonar las secuencias génicas de superóxido dismutasa y tiolasa de *N. brasiliensis*.
- 3) Determinar cambios en la expresión de los genes de superóxido dismutasa y tiolasa de *N. brasiliensis* por RT-PCR competitiva.

III. MATERIAL Y METODOS

3. 1 Reactivos químicos

Las enzimas de restricción y la ADN ligasa de T₄ fueron adquiridas de Gibco-Bethesda Research Laboratories (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) y de New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, USA). La enzima *Taq* ADN polimerasa, los dNTPs y los reactivos necesarios para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) provinieron de Promega (Madison, WI, USA), New England e Invitrogen (Carlsbad, Cal, USA). Se utilizaron varios estuches comerciales: para la extracción de ARN (totally RNATM de Ambion (Austin Tx, USA)) para la retrotranscripción (SuperScrip^{tTM} First-Strand Síntesis System for RT-PCR Invitrogen (Carlsbad, Cal, USA)) y para el despliegue diferencial (HIEROGLYPH mARN Profile Kit (Genomyx Corporation, Foster City, CA)). Para la secuenciación se utilizaron terminadores (ddNTPs) marcados con un fluorocromo: IRDye-800 de LI-COR, NEN Life Science Products, Inc (Lincon, NE, USA) y la sequenasa de USB (Cleveland, OH,USA).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Los reactivos para elaborar las soluciones amortiguadoras, medios de cultivo, geles, etc., necesarios para realizar este trabajo se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical (St, Louis, Missouri, USA), Merck (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA), DIFCO Laboratories (Detroit, MI, USA), United Status Biochemical y Becton Dickinson and Company. (Sparks MD, USA).

Los iniciadores para PCR, fueron diseñados en el Departamento de Inmunología (Tabla 1) y sintetizados por Biomol (Monterrey, México). Los iniciadores universales M13 (forward y reverse) provinieron de la compañía Roche Diagnostics, (Indianapolis, USA).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 1.- Secuencia de los iniciadores diseñados

Iniciadores	Nombre	Secuencia
tiolasa	THIO 1	5' GAC CGC ACG CTC CCC (GC)AT 3'
tiolasa	THIO 2	5' TCG CCG CCA ACG CAC AT 3'
superóxido dismutasa	SOD 5'	5' AAC CGA TCG GGT GTA GGA AT 3'
superóxido dismutasa	SOD 3'	5' CCA GTT GAC GAC GTT CCA GA 3'
RNA ribosomal	NOC 3	5' ACG GGT GAG TAA CAC GTG 3'
RNA ribosomal	NOC 4	5' AGT CTG GGC CGT GTC TCA 3'

3. 2 Material Biológico.

3.2.1 Cepas bacterianas.

En este estudio se utilizó la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 obtenida de un paciente con micetoma dorsal del tronco que acudió al Hospital Dr. José Eleuterio González. Esta cepa está registrada en la ATCC como 700358.

El vector utilizado para la clonación (PCR Topo) y la cepa bacteriana TOP 10 de *Escherichia coli* empleada en los ensayos de transformación y propagación de los plásmidos recombinantes, provenían del kit PCR Topo Cloning de Invitrogen (Carlsbad, California, EUA).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

3.2.2 Ratones.

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, de un peso entre 30 a 40 gramos y de 12 a 16 semanas de edad (hembras y machos), los cuales fueron adquiridos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH, Bethesda MD). Las condiciones de bioterio fueron temperatura de 20-25 ° C, alimentación con croquetas (Purina, México, S.A de C.V) y agua destilada estéril *ad libitum*.

3.3 Equipo

Durante este trabajo se utilizaron: un horno de micondas LG modelo MS-701C, microcentrífuga Eppendorf modelo 5415, fuentes de poder EC600 (E-C, St. Petersburg, Florida), ISCO494 (ISCO, Nebraska USA) y BRL250 (Gibco-BRL), una centrífuga Beckman allegra™ 21R, modelo 367570, un agitador de tubos Barnsted Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, IOWA, USA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320, un secuenciador automático LI-COR (Michigan Technology University, USA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning PC320 (N.Y., USA), un termomixer 5436 (Eppendorf), una incubadora Shell Lab modelo 1525, campana de luz ultra violeta modelo p-036'02 (CBS Scientific Co).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

El material y los reactivos se almacenaron en un congelador a -20°C marca Tor-Rey (Mty, Mex), ultracongelador a -70°C marca So-Low Environmental Equipment (Cincinnati, Corporation (K.C., Missouri, USA). Incubadora con agitación (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific). Los termocicladores empleados fueron: Robocycler 96 versión 4.0 (Stratagene, la Joya Ca. USA), GeneAmp 9600 (Perking Elmer) y Peltier Thermal Cycler PTC-200 (M.J.Research). La balanza analítica fue de la marca Scientech modelo AP110S, y la balanza granataria digital de la marca Sartorius modelo 1206MP (Göttingen, Alemania).

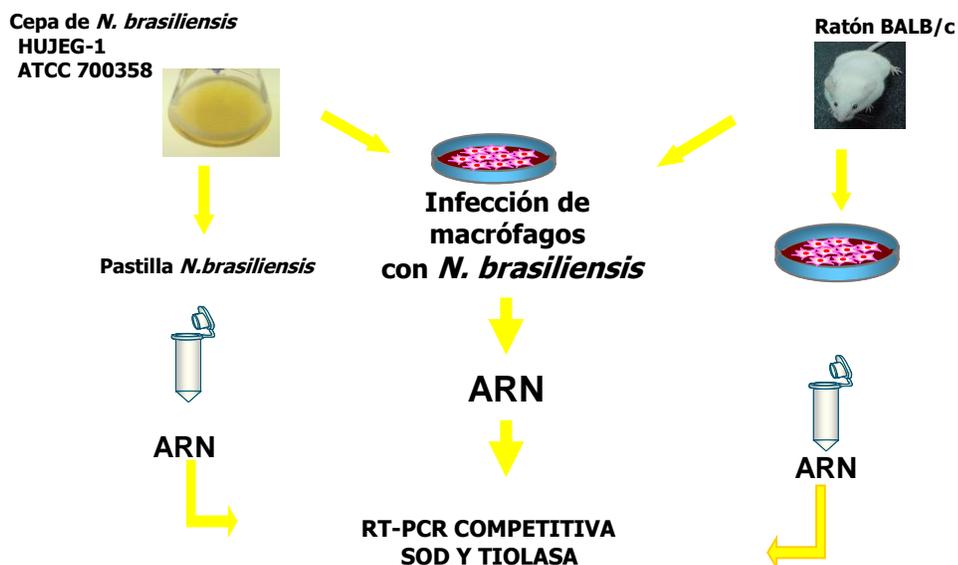
Los programas de análisis en Biología Molecular fueron: Amplify Versión 1.2 b (Bill Engels © 1992 University of Wisconsin Genetics M, Madison, WI, USA), DNA Strider TM OLIGO Version 4.0 (© 1992, Plymouth, Mn, USA). Para la cuantificación del ADN y la determinación de los pesos moleculares se utilizó un digitalizador de imágenes Molecular Analyst del Gel Doc 1000 de Bio-Rad (Hercules CA).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

3.4 Métodos

3.4.1 Estrategia general.

En la figura 1 se muestra en forma sintetizada el procedimiento experimental que se llevó a cabo para cumplir con los objetivos específicos propuestos. Se hizo una suspensión unicelular de *N. brasiliensis*, y se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c, los cuales fueron infectados con *N. brasiliensis*, a partir de estas muestras se extrajo el ARN total. Así también se clonaron secuencias de genes de superóxido dismutasa y tiolasa de *N. brasiliensis*. Posteriormente, se hizo RT-PCR competitiva para observar cambios en la expresión de los genes bacterianos de superóxido dismutasa y tiolasa durante la infección.



Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Figura 1.- Estrategia General. Se esquematiza los pasos que se siguieron durante el desarrollo de la RT-PCR COMPETITIVA para determinar los cambios en la expresión de *N. brasiliensis* cuando estaba en el interior de los macrófagos.

3.4.2 Preparación de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*.

Se tomó una asada de la cepa de *N. brasiliensis* ATCC 700358 cultivada en medio sólido de dextrosa-Sabouraud y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 30 mL de medio de cultivo infusión cerebro-corazón (BHI). Luego se incubó a 37°C con agitación durante 72 hrs. Después de este tiempo se transfirió el cultivo a tubos cónicos estériles de 50 mL y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min. Después de decantar el sobrenadante, las bacterias fueron lavadas 3 veces con solución salina fisiológica, posteriormente fueron disgregadas con ayuda de un homogeneizador y resuspendidas en solución salina. Se determinó su concentración en base a la curva estándar de calibración espectrofotométrica (325nm) para el crecimiento de la cepa HUJEG-1 de *N. brasiliensis* anteriormente establecida en el laboratorio. La dosis infectante fue de 1×10^8 UFC, la cual se preparó diluyendo la suspensión bacteriana concentrada.

3.4.3 Infección de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c con *Nocardia brasiliensis*.

Los ratones BALB/c fueron sacrificados por dislocación cervical. Se hizo una incisión longitudinal en la región ventral y se expuso la cavidad

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

peritoneal, en la cual con ayuda de una jeringa se introdujo medio RPMI-1640 estéril y se extrajeron las células peritoneales. La viabilidad y cuenta de las células se llevaron a cabo por la técnica de exclusión de azul tripano. Una concentración de 1×10^6 cel/mL de medio RPMI 1640 fue agregada a placas de 12 pozos en fondo plano, posteriormente incubada a 37 °C durante dos horas, en presencia de 90% de humedad y 5 % de bióxido de carbono. Se descartaron las células no adherentes con ayuda de lavados vigorosos, las células adheridas a la placa fueron identificadas como macrófagos y se usaron para los ensayos de infección utilizando una dosis infecciosa de 100 UFC/M ϕ . Las infecciones se llevaron a cabo durante una hora a 37° C. Transcurrido este tiempo, se hicieron nuevamente lavados vigorosos con medio de cultivo estéril para eliminar las bacterias no fagocitadas. Finalmente se realizó la extracción de ARN a partir de las placas, utilizando la técnica que se describe mas adelante.

3.4.4 Extracción del ARN

La extracción de ARN de macrófagos infectados, sin infectar y de las bacterias de *N. brasiliensis* se llevó a cabo con el estuche comercial TOTALLY RNA (Ambion). Directamente en la placa, se agregaron 500 μ L de solución de lisis a los macrófagos. Las células se despegaron mediante un scrapper y se transfirieron en tubos de plástico de 1mL. Si el cultivo era muy viscoso se le agregaba más solución de lisis. Los tubos se agitaron en el vortex por 30

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

segundos para asegurar la lisis celular. Posteriormente, se agregaron 500 μ L de fenol IAA (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico: 25:24:1; pH 4.6) a cada tubo y se agitaron nuevamente. Después de una incubación de 8 minutos en hielo, los tubos se centrifugaron 10 minutos a 14 000 rpm a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionó 1/10 volumen de acetato de sodio 3M pH 4.5 con agitación vigorosa. Se adicionó 1 volumen de fenol:cloroformo (fenol:cloroformo 5:1; pH 4.7) y se incubó 8 minutos en hielo. El tubo se centrifugó durante 15 minutos a 14 000 rpm a 4°C y al sobrenadante obtenido se le agregó 1mL de isopropanol dejando precipitar los ácidos nucleicos a -20° C durante 1 hora. Después de centrifugar en las condiciones anteriormente descritas, se removió el sobrenadante y el precipitado fue lavado con etanol al 70%. El tubo se centrifugó nuevamente y finalmente el ARN se resuspendió en 20uL de agua dietil pirocarbonato (DEPC).

3.4.5 Análisis cualitativo y cuantitativo del ARN. Verificación de la calidad del ARN.

3.4.5.1 Electroforesis y cuantificación

Para verificar la presencia y calidad del ARN extraído, se analizó una alícuota por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con isotiocianato de guanidina 1M y bromuro de etidio 2mg/mL (Sambrook y Russell, 2003). Finalmente las bandas de ARN se observaron mediante un fotodocumentador (GelDoc). El ADN, en caso de ser presente, se removió agregando a la muestra ADNasa I

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

(10 U por mL), incubándola a 37° C por 30 minutos e inactivando la enzima con la solución Stop del kit. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría, tomando 4 µL de la muestra más 996 µL de agua y la absorbancia se midió a 260 nm. El resultado obtenido se multiplicó por 10, lo cual dio el valor de la concentración de ARN en µg/µL.

3.4.5.2 Ensayos de RT-PCR para la verificación de la integridad de los RNAs.

Para verificar la integridad de los RNAs bacterianos y eucariotas. Se incubaron 3µL de ARN de *N. brasiliensis* (2 µg/µL) macrófagos infectados (3µg//µL) y macrófagos sin infectar (1 µg/µL) con 1 µL de iniciadores al azar (50ng/µL) durante 5 minutos a 94°C. Posteriormente, se agregó a los tubos la mezcla de cofactores y la enzima Mouse Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) para la retrotranscripción cuyas condiciones de reactivos y temperatura están en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Condiciones de retrotranscripción (síntesis del ADN_c)

Reactivos (RT)	Volumen (10uL)
Buffer RT 5X	4 µL
DTT (0.1M)	2 µL
dNTPs (10mM)	1 µL
RT-.MMLV (2 U/µL)	1 µL

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 3. Condiciones de temperatura para la síntesis del ADNc

10 minutos a 25° C
60 minutos a 42° C
15 minutos a 72° C

Para la confirmación de la integridad de los ARN de procariotes y eucariotes, se amplificaron los ADNc del RNA ribosomal 16S y de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), respectivamente. Las dos reacciones de PCR se hicieron con iniciadores específicos, ver tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de PCR para ARN ribosomal 16 S de bacterias y GAPDH.

Reactivos PCR	Volumen (25uL)	
	RNAr16S	GAPDH
Buffer 10X	2.5	2.5
MgCl ₂ (25mM)	2.	2
dNTPs (10mM)	0.5	0.5
Oligo 3' 5mM	1.5	2.5
Oligo 5' 5mM	1.5	2.5
Taq polimerasa (5U/uL)	0.2	0.2

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

ADNc	3	1.5
Agua	13.8	13.3

Tabla 5 Condiciones de temperatura para la PCR del ARNr 16S de bacterias y GAPDH

Temperatura (°C) GAPDH	Temperatura (°C) RNA rib18S	Tiempo GAPDH, RNA rib18S	Pasos
94	94	1min	1Desnat.inicial
92	92	40seg	2 Desnaturalización
58	56	40seg	3. Apareamiento
72	72	2min	4 Extensión
Iniciar a partir del paso 2, 29 ciclos			
72	72	5min	5. Extensión final

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las bandas se observaron en el Molecular Analyst del Gel Doc después de sumergir el gel en bromuro de etidio, durante 5 minutos.

3.4.6 Análisis de los ARNs de *N.brasiliensis*.

3.4.6.1 Síntesis del ADN complementario a partir de poli dT

A partir de 3 ug de ARN de *N. brasiliensis* de buena calidad, se sintetizaron los ADNc con un precursor radioactivo utilizando las condiciones descritas en la tabla 6, como iniciadores se emplearon oligo dT e iniciadores al azar, y como

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

control positivo se utilizó ARN de tejido placentario de gato (disponible en el laboratorio). Las condiciones de temperatura fueron las mismas que las descritas anteriormente (tabla 3).

Tabla 6. Retrotranscripción radioactiva para determinar la presencia de poli A.

Reactivos RT	1 rxn vol. (20uL)
Buffer RT (5X)	2
dNTPs 10 (mM)	1
DTT (100mM)	1
RNA _{sin} 20U/uL	0.5
oligo dT 2U/uL	0.5
(α ³² P)dATP10uCi/uL	0.5
Agua mQ	11.9

Después de la RT radioactiva se tomó una alícuota y los productos se resolvieron en un gel al 2% en agarosa. Al terminar la electroforesis se deshidrato el gel y se puso en contacto con una película (Biomax Kodak, Denmark), que luego fue revelada.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

3.4.6.2 Despliegue diferencial de los transcritos de *N. brasiliensis*.

El análisis de los ARN por despliegue diferencial (DD) se realizó con el estuche comercial HIEROGLYPH mARN Profile Kit, el cual incluye 12 iniciadores 3' oligo XY-(dT) y 20 iniciadores 5' arbitrarios acoplados en su extremo 5' con la secuencia del M13 reverso. Para la retrotranscripción se utilizaron 2 uL de ARN total (0.1ug/uL) y 2 uL de un iniciador oligo XY (dT) (2uM), se incubaron a 65° C por 5 minutos. Se agregaron a cada tubo, 16 uL de la mezcla de reacción indicada en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de RT para despliegue diferencial

Reactivos RT	1 rxn vol. (20uL)
Buffer RT (5X)	4
dNTPs 250 (mM)	1
DTT (100mM)	1
RNA _{sin} 20U/uL	0.5
Agua mQ	9.5

La reacción se llevó a cabo a 42° C durante 1 hora, Después se realizaron las reacciones de PCR-DD utilizando 2 uL de la reacción de RT, el iniciador 3' previamente utilizado y uno de los iniciadores 5' (ver la mezcla de reacción en la tabla 8).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 8. Condiciones de PCR-DD de *Nocardia brasiliensis*

Reactivos PCR	Volumen1X rxn (20uL)
Buffer 10X(15mM MgCl ₂)	2
dNTPs (1:1:1:1, 250uM)	1.6
Oligo 3' (2uM)	2
Oligo5' (2uM)	2
Agua milliQ	9.95
(α^{32} P) dATP10uCi/uL	0.25
Ampli Taq (5U/uL)	0.2

Las condiciones de temperatura para la PCR fueron:

95° C 2 minutos
4 ciclos
 92° C 15 segundos
 46° C 30 segundos
 72° C 2 minutos
25 ciclos
 92° C 15 segundos
 60° C 30 segundos
 72° C 2 minutos
1 ciclo
 72° C 7 minutos.

Posteriormente las muestras fueron mezcladas con 7uL de solución stop, desnaturalizadas por calor y depositadas en un gel de poliacrilamida al 6% en

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

condiciones desnaturalizantes (50% urea). La electroforesis se llevó a cabo en un Genomyx LR™ ADN sequencer. El gel una vez lavado y secado, se puso en contacto con una película (Biomax Kodak, Denmark) que luego fue revelada. Las bandas seleccionadas se cortaron y reamplificaron siguiendo el protocolo de la casa comercial. Estos productos de PCR fueron secuenciados con una variante del método enzimático de Sanger y cols (1977), siguiendo las especificaciones del estuche comercial LI-COR. Los productos de secuenciación generados se resolvieron en un gel de electroforesis de acrilamida al 3.7% - urea 50%. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.4.7. Clonación de secuencias de genes de superóxido dismutasa y tiolasa de *Nocardia brasiliensis*.

3.4.7.1 Obtención de ADN genómico.

Se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando una modificación de la técnica descrita por Sambrook y Russell, (2003). Se tomaron 30 ug del botón celular y se colocaron en un tubo de 1.5 mL, al cual se agregaron 200 uL de solución de lisis TSNT (2% de triton x-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8, 1mM de EDTA pH 8). A esta mezcla se le agregaron 200 uL de fenol saturado pH 8 y 200 uL de cloroformo. El tubo se agitó con vortex hasta su completa homogenización y se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se agregaron 200uL de TE 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8), el tubo se agitó en un vortex y se centrifugó a 8000 rpm durante 5

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 200uL de cloroformo. Se agitó en el vortex y se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo y se agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 2 volúmenes de etanol al 100% mezclando por inversión e incubando durante 1 hora a -70°C. Después de centrifugar por 20 min a 8,000 rpm, la pastilla obtenida se lavó con 1 volumen de etanol al 70% y el tubo se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se eliminó y en seguida se dejó secar la pastilla al vacío, ésta se resuspendió finalmente en 20 µl de H₂O milliQ y se conservó a -20°C.

3.4.7.2 Análisis electroforético del ADN.

Las muestras de ADN (ADN genómico, productos de PCR y plásmidos) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al porcentaje adecuado según el producto obtenido, utilizando como solución amortiguadora TBE (Tris-borato 0.89 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 20 mM). Posteriormente fueron observados mediante el Gel Doc.

3.4.7.3 Amplificación de los genes de SOD y tiolasa.

Se estandarizaron las condiciones óptimas de PCR para los genes de SOD (635pb) y de tiolasa (1200 pb). En la tabla 9 se muestran las condiciones de PCR y en la tabla 10 las condiciones de temperatura para ambos genes.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 9. Condiciones PCR SOD y tiolasa

REACTIVO PCR	VOLUMEN(25 uL)SOD y tiolasa
Buffer 10x	2.5
Amplificador 10X	2.5
dNTPs (10 uM)	0.5
Oligo3´(5uM)	2.5
Oligo5´(5uM)	2.5
MgCl ₂ (25uM)	1.5
Taq polimerasa 1U/μL	0.2
Agua	11.8
ADNg(100ng/25μL)	1

Tabla 10. Condiciones de temperatura de la PCR para SOD Y TIOLASA

SOD	TIOLASA
94° C 5 minutos	94° C 5 minutos
35 CICLOS	35 CICLOS
94° C 1 minuto	94oC 1 minuto
58° C 30 segundos	60° C 30 segundos
72° C 1 minuto	72° C 1 minuto
1 CICLO	1 CICLO
72° C 2 minutos	72° C 2 minutos

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

3.4.7.4 Clonación de los productos amplificados de SOD y tiolasa

Se utilizó el Topo[®] XL PCR Cloning Kit Versión I (Invitrogen Life Technologies).

El protocolo utilizado incluyó los pasos siguientes:

1. Ligación de los productos de PCR con el vector Topo XL.
2. Transformación de células Top 10 electrocompetentes.
3. Extracción de ADN plasmídico de las clonas seleccionadas.
4. Identificación y caracterización de las clonas.

3.4.7.4.1 Reacción de ligación de los productos de PCR con el vector Topo XL.

Para las reacciones de clonación se tomaron 4 uL de los productos de PCR en estudio y se agregó 1 uL de PCR-XL-Topo vector, se mezcló suavemente y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después se agregó 1 uL de 6X TOPO Cloning Stop Solution y se mezcló por algunos segundos a temperatura ambiente. Se mantuvo el tubo en hielo para la transformación.

3.4.7.4.2 Transformación en células Top 10 electrocompetentes

Se adicionaron 2 uL de la mezcla anterior (ADN-vector) a un vial de células electrocompetentes y se mezcló suavemente agitando con la puntilla manteniendo el tubo en hielo. En una celdilla para electroporar previamente fría se colocó cuidadosamente la mezcla y posteriormente se aplicó la descarga eléctrica (2.5 kvolts y 25 microfaradios). Inmediatamente las células se colocaron en un tubo de 1.5 mL que contenía 450 uL de medio SOC. Este se incubó a 37°C durante una hora con agitación, después se sembraron 50 uL de

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

las células en una placa que contenía medio LB (bactotripton 10 g/L, extracto de levaduras 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 6.5-7.0 con 50 µg/mL de kanamicina), se incubaron toda la noche a 37°C, las colonias se levantaron individualmente para inocular tubos conteniendo 6 mL de medio LB más kanamicina. Las células se incubaron bajo agitación vigorosa toda la noche a 37°C y se procedió a hacer la extracción de ADN plasmídico.

3.4.7.4.3 Extracción de ADN plasmídico

Las clonas recombinantes obtenidas fueron procesadas para la obtención del ADN plasmídico utilizando la técnica de lisis alcalina a partir del cultivo (Sambrook y Russell, 2003). A partir del medio del cultivo se obtuvieron las células centrifugando 1.5 mL de medio durante 2 min a 14,000 rpm; la pastilla se resuspendió en 100 µL de solución I (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8.0). Se agitó vigorosamente en el vortex hasta que la pastilla se disolviera completamente, y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de solución II (0.2 mL de NaOH 10 N, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8 mL de agua), se mezcló por inversión, se incubó 5 min en hielo, después se agregaron 150 µL de solución III (60 mL de acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de ácido acético concentrado, 28.5 mL de agua), se agitó en un vortex y se incubó 5 min en hielo. El tubo se centrifugó 5 min a 14,000 rpm, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, se le agregó un volumen de fenol saturado y uno de SEVAG, se mezcló al vortex 5 min y se centrifugó 15 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 2 volúmenes de

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

etanol al 100% y se dejó durante 1 hora a -70°C. Se repitió el paso de centrifugación y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol al 70% frío y después de centrifugar, se removió completamente el sobrenadante. Una vez seca la pastilla fue resuspendida en 50 uL de H₂O milliQ.

3.4.7.4.4 Caracterización de las clonas recombinantes obtenidas

El vector recombinante tiene dos sitios de corte *Eco RI*, que flanquean el inserto, por lo que las clonas fueron caracterizadas después de digerir el vector recombinante con esta enzima. Además se confirmó la identidad del producto clonado mediante secuenciación. Las clonas de interés fueron almacenadas a -70°C, con 30% de glicerol (Sambrook y Russell,2003).

3.4.8 RT- PCR competitiva para observar cambios en la expresión de los genes bacterianos de SOD y tiolasa durante la infección del macrófago.

3.4.8.1 Obtención de los competidores.

Para la PCR competitiva es necesario un producto (competidor) que se co-amplifique con la muestra problema. Para evitar diferencias de eficiencia en la amplificación entre el ADNc y el competidor, este último debe incluir los sitios de los iniciadores y producir un producto amplificado menor o mayor al original. La

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

diferencia de tamaño permite distinguir ambos productos amplificados en un gel de agarosa.

3.4.8.1.2 Fragmento competidor de SOD.

La digestión del vector recombinante (pTopo con el producto amplificado de SOD de *N. asteroides*) con *Sac* II se hizo en un volumen final de 15 μ L, siguiendo las condiciones descritas en la tabla 11.

Tabla.11 Condiciones de digestión con *Sac* II

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer IV 10 X (Invitrogen)	1.5
Agua	7.5
<i>Sac</i> II (2000U/mL)	1
Plasmido (1 μ g/ μ L)	5

Se incubó a 37° C durante 3 horas y la enzima se inactivó a 65° C durante 15 minutos. El vector digerido fue religado en un volumen final de 25 μ L, utilizando los siguientes reactivos bajo las condiciones de la tabla 12.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 12. Condiciones de ligación.

Reactivos	Volumen(25 μ L)
Buffer 5X	5
E. Ligasa T4(1U// μ L)	0.5
vector digerido con Sac II (0.3 μ g// μ L)	7
Agua	12.5

La reacción se dejó a 16° C durante toda la noche. El vector se precipitó con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol al 100%, durante 1 h a -70 C, siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente. La pastilla se resuspendió en 5 μ L de agua miliQ.

3. 4.8.1.3 Fragmento competidor de tiolasa.

Se utilizaron las enzimas *Bst*EII y *Ac*cl para digerir el plásmido que contiene al producto amplificado de tiolasa de *N. brasiliensis*. En un primer paso el vector se incubó 1 hora a 60°C con *Bst*EII (ver mezcla de reacción en la tabla 13).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 13. Condiciones de digestión con BstE II para tiolasa

REACTIVO	VOLUMEN (10uL)
Buffer III	1
Plásmido tiolasa (0.3ug/uL)	4
Agua	4.5
Enzima <i>BstE</i> II (1U/uL)	0.5

Como las enzimas *BstEII* y *AccI* trabajan en condiciones muy diferentes, el producto de la primera digestión fue precipitado con etanol al 100% para luego resuspenderlo en agua y digerirlo con *AccI*, según las condiciones de la tabla 14.

Tabla 14. Condiciones de digestión con *AccI* para tiolasa

REACTIVO	VOLUMEN (10uL)
Buffer IV	1
Plásmido tiolasa (0.2ug/uL)	6
Agua	2.5
Enzima <i>Acc</i> I (1U/uL)	0.5

Debido a que los extremos liberados con las enzimas no son compatibles, se utilizó la T4DNA polimerasa para tener extremos en romo y poder religar el plásmido (tabla 15).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 15 Ligación del competidor para tiolasa

REACTIVO	VOLUMEN (20uL)
T4 DNA polimerasa (1U/uL)	1
T4 DNA ligasa (3U/uL)	1
ATP(10mM)	1
Buffer IV	8
dNTPs(2mM)	1
Vector digerido(1ng/uL)	8

El producto ya religado fue transformado según las condiciones de transformación anteriormente descritas en el párrafo 3.4.7.4.2. Posteriormente, se hizo la extracción de ADN plasmídico de las clonas seleccionadas para comprobar mediante PCR su identidad y comprobar la diferencia de tamaño del competidor en comparación al original en una electroforesis en gel de agarosa.

3.4.8.2 Ensayos de RT-PCR competitiva

3. 4.8.2.1 Estandarización de la PCR competitiva de SOD y tiolasa.

Obtenidos los competidores, se inició la estandarización de la técnica, determinando la fase exponencial de la reacción de PCR y validando con mezclas del vector recombinante y del competidor la linealidad.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Se hicieron PCRs a diferentes ciclos con el objetivo de encontrar la máxima intensidad relativa de expresión de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*, para ello se utilizaron los ciclos 20, 25, 30 y 35, en las mismas condiciones de PCR anteriormente descritas (tabla 9). Las PCRs fueron resueltas en una electroforesis y los resultados se analizaron graficando la intensidad de las bandas determinada con el digitalizador de imágenes Molecular Analyst Gel Doc en función del número de ciclos.

Ya establecida la fase exponencial de las PCRs competitivas, se procedió a validar la técnica amplificando mezclas con diferentes concentraciones del vector recombinante y manteniendo constante la del competidor. Los resultados se obtuvieron graficando la intensidad relativa de la banda del plásmido versus la del competidor en función de la cantidad de plásmido.

3.4.8.2.2 Nivelación de la concentración del ARN bacteriano en las preparaciones obtenidas de *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* infectando al macrófago.

Con el objetivo de equiparar las concentraciones de ARN bacteriano en las dos condiciones de estudio, se analizaron mediante RT-PCR los ARNr 16S siguiendo las condiciones de reacción descritas en la tabla 16.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 16. Condiciones de RT-PCR para ARNr de bacterias.

Reactivos	Volumen (uL)
Buffer 10 X	2.5
MgCl ₂	2.0
dNTPs 10 mM	0.5
5" UNI 2	0.75
3" UNI 3	0.75
cDNA 50 ng/uL	3.0
Agua milliQ	11.0
Taqpolim 1 U/uL	0.5

3.4.8.2.3 Ensayos semicuantitativos de SOD y de tiolasa de *N. brasiliensis*

Establecidas las condiciones óptimas de la PCR competitiva de ambos genes se procedió a realizarla por triplicado con los ADNc derivados de *N. brasiliensis* en cultivo y de *N. brasiliensis* infectando macrófagos. (ver condiciones en tabla 17). Los productos de la RT-PCR fueron resueltos en geles de agarosa. Los resultados se basaron en comparar la intensidad relativa de las bandas amplificadas a partir de las diferentes preparaciones de ARN.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Tabla 17. Condiciones PCR competitiva SOD y tiolasa

Reactivos PCR	Volumen (25uL)	Volumen (25uL)
Buffer 10X	2.5	2.5
dNTPs (10mM)	0.5	0.5
Oligo 3´ 5mM	2.0 (sod)	2.5 (tiolasa)
Oligo 5´ 5mM	2.0 (sod)	2.5 (tiolasa)
Taqpolimerasa5U/uL	0.2	0.2
MgCl ₂ (25mM)	1.5	1.5
ADNc (100 ng/uL)	5	5
ADNcompetidor100 ng/uL)	0.2	0.2
Agua	11.1	11.1

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

IV. RESULTADOS

4.1 Extracción del ARN total

Se obtuvo ARN de buena calidad a partir de las tres preparaciones celulares (*N.brasiliensis*, 15 µg/mL, macrófagos 25µg/mL y macrófagos infectados con la bacteria, 22µg/mL), como se observa en la figura 2.

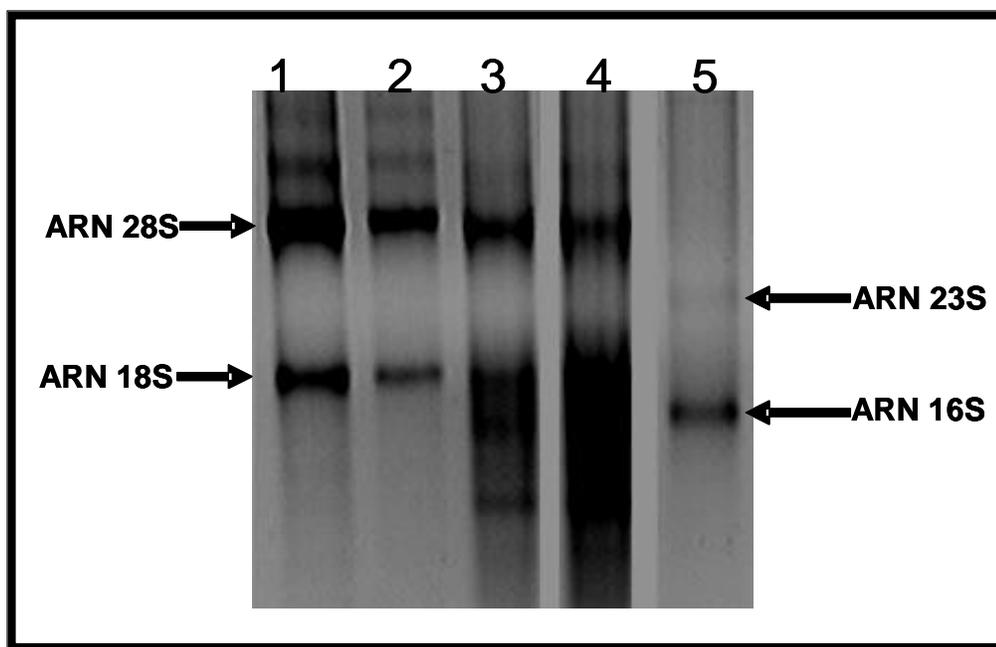


Fig. 2. Extracción de ARN de *N. brasiliensis* y macrófagos. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con isotiocianato de guanidina, en donde se observan en los carriles 1 y 2 ARN de macrófagos sin infectar; en los carriles 3 y 4, ARN de macrófagos infectados con *N. brasiliensis*, y en el carril 5 ARN de *N. brasiliensis*

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

4.2 Comprobación de la calidad del ARN de macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*.

Para determinar la calidad del ARN de las células de estudio se hicieron dos reacciones de RT-PCR, una para detectar el ARNr de bacterias y la otra para el transcrito de un gen eucariote (GAPDH). Como se observa en la figura 3 se amplificó la banda de 1020 pb derivada del ARNr a partir del ARN total extraído de *Nocardia* y de los macrófagos infectados, más no se observó en los macrófagos sin infectar. La banda de 500 pb derivada de GAPDH se observó únicamente en ambas preparaciones derivadas de los macrófagos. En los controles negativos (PCR sin RT y PCR -) no se observó banda alguna.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

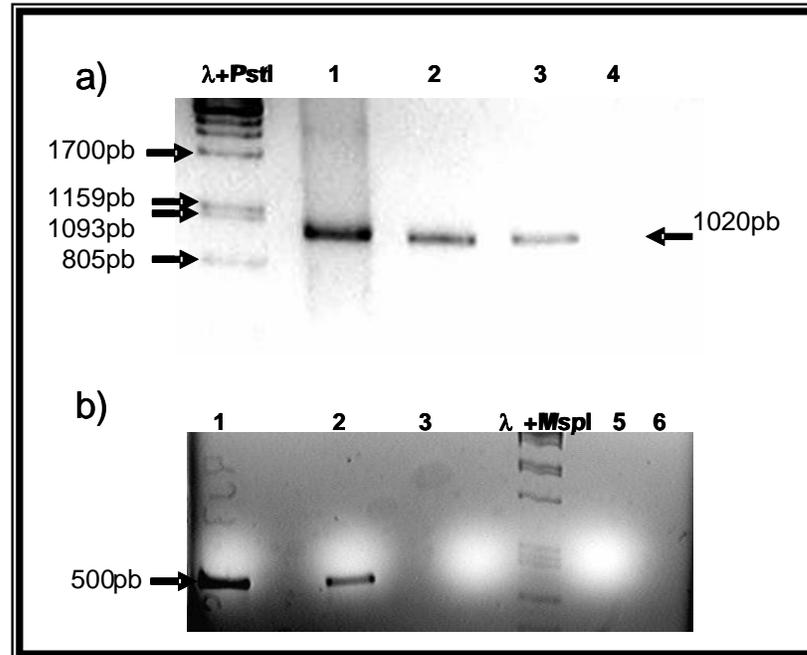


Fig. 3. RT-PCR PARA ARNr16S DE NOCARDIA Y GAPDH PARA MACROFAGOS DE RATÓN

a) RT-PCR del ARNr16S. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, en donde el marcador es $\lambda + PstI$. En el carril 1 se observa el control positivo: producto de PCR de 1020 pb derivado del ADNg de *N. brasiliensis*. Los productos derivados de las reacciones de RT-PCR se muestran en los siguientes carriles: cultivo de *N. brasiliensis* (carril 2), macrófagos infectados con *N. brasiliensis* (carril 3) y macrófagos sin infectar (carril 4). b) RT-PCR de GAPDH de ratón. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los productos de RT-PCR de 500 pb derivados de los transcritos de GAPDH se observa en el carril 1 (macrófagos sin infectar) y carril 2 (macrófagos infectados con *N. brasiliensis*) pero no se evidencian en el carril 3 (cultivo de *N. brasiliensis*), ni en los carriles 5 y 6 controles negativos (PCR sin RT previa y PCR negativa).

4.3 Análisis de transcritos poli A+ de *N. brasiliensis*.

4.3.1 RT RADIOACTIVA.

Para observar la presencia de poli A+ de *N. brasiliensis* se hizo una RT radioactiva en presencia de dATP marcado con (^{32}P). Se utilizaron iniciadores al azar y oligo dT para retrotranscribir el ARN de *N. brasiliensis* así como, el ARN de células de placenta de gato, como control positivo (ver Figura 4), además se incluyeron los controles negativos. La síntesis de ADNc se puede

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

evidenciar por un barrido tanto en las reacciones donde se utilizaron iniciadores al azar, como en las que se empleó oligo dT.

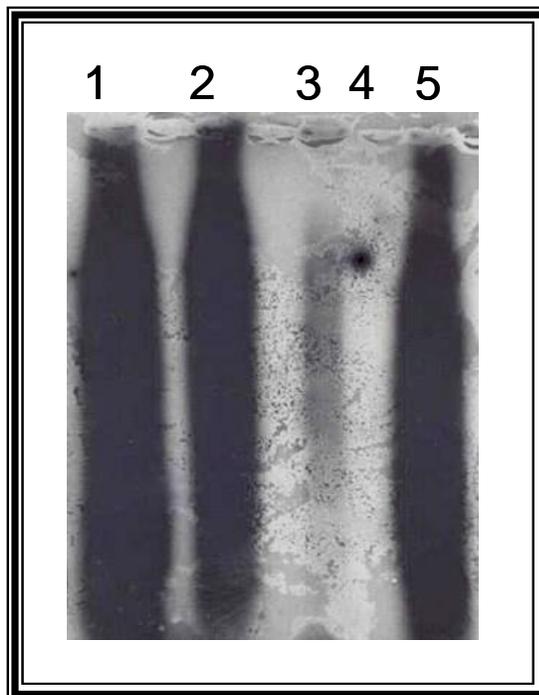


Fig. 4. RT RADIOACTIVA QUE INDICA PRESENCIA DE POLIADENILACIÓN EN LOS ARNs de NOCARDIA. Autorradiografía de la electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los ADNc obtenidos de las diferentes reacciones. Carril 1, RT a partir de ARN de células de placenta de gato con iniciadores al azar; carril 2, RT a partir de ARN de células de placenta de gato con oligo dT, carril 3, cADN de *N. brasiliensis* con oligo dT, carril 4 RT negativa y carril 5 cADN de *N. brasiliensis* con iniciadores al azar. Obsérvese en el carril 3 el barrido que indica presencia de poli A en el ARN total de *N. brasiliensis*

4.3.2 DESPLIEGUE DIFERENCIAL

Una vez comprobada la presencia de la poliadenilación en el ARN total de *N. brasiliensis*, se llevó a cabo un despliegue diferencial (PCR-DD). Como se puede observar en la Figura 5, se amplificaron algunas bandas a partir del ARN de *Nocardia*, aunque en menor cantidad que las amplificadas a partir del ARN de gato utilizado como control positivo.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c



Fig. 5. Análisis de los ARNs de poli A de *N. brasiliensis* por despliegue diferencial. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes. Carril 1 PCR-DD a partir de ARN de *N. brasiliensis*; carril 2 PCR-DD a partir de ARN de células de placenta de gato como control positivo, obsérvese la diferencia en intensidad de las bandas entre ambos carriles; las bandas señaladas fueron purificadas, amplificadas y posteriormente secuenciadas.

Se escogieron algunas de las bandas más intensas obtenidas a partir del ARN bacteriano, éstas se purificaron, amplificaron y secuenciaron. Un ejemplo de las secuencias obtenidas se describe en la figura siguiente (Fig. 6). Al comparar las secuencias obtenidas con las reportadas en el GenBank, se evidenció que todas correspondían a segmentos de ARN ribosomal.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

*ACGACTCACTATAGGGC**TTTTTTTTTTGGT*aCaCgGGGCCCGtAcCCCAAACCGAcAcAG
GTGGgTCAGGTAGAGAATACTAAGGgGATCGAGAGAAaCTGTGGGTAGGGGTGAAA
gGgcAATcAAAACtCGtGATAgCTGGTTCTCCCCGAAATGcATTTAGGTGCAGgGTCAC
GTGTTTCACGCCGGAGGTAGAGCTACTGGATGGtCTAGGGGGGcTACAAGCTTACCA
AAAAAAAAAAGCCCTATAGtGAGgTCGTAAGGGGGAATTCCAGCACACTGGCGTG
CCGTTACTAGtGGaTcCGAGCTCGGtACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTcTAAC
GcGTCACCTAAATAGcTTGGGGTAATcATGGGCATAGCTGTTTCTGTGtGAAATTGTT
ATCCGCTCACAATTCCACACAAGATACGAGcCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGG
GGTGCCTAATGAGTGATGCTAAcTCaCATTAAATTGcGtTGCGCTCACT

Fig. 6. Secuencia de ARN 16S de *N. brasiliensis*. Se observa la presencia de poli T en la secuencia. Las letras en *itálicas* representan los iniciadores.

4.4 Amplificación de los genes de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*.

Ambos genes se obtuvieron a partir de ADNg mediante PCR utilizando iniciadores consenso. Una vez estandarizada la PCR, se amplificaron productos de 635pb para SOD (Fig. 7) y de 1200 pb para tiolasa (Fig. 8).

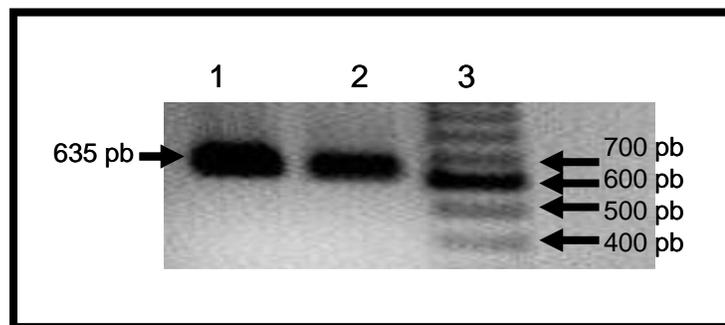


Fig.7 Amplificación de SOD a partir de ADNg de *N. brasiliensis*. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %
Carril 1 y 2 Amplificación de un fragmento de SOD de 635 pb; carril 3 marcador de peso molecular en escalera de 100pb.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

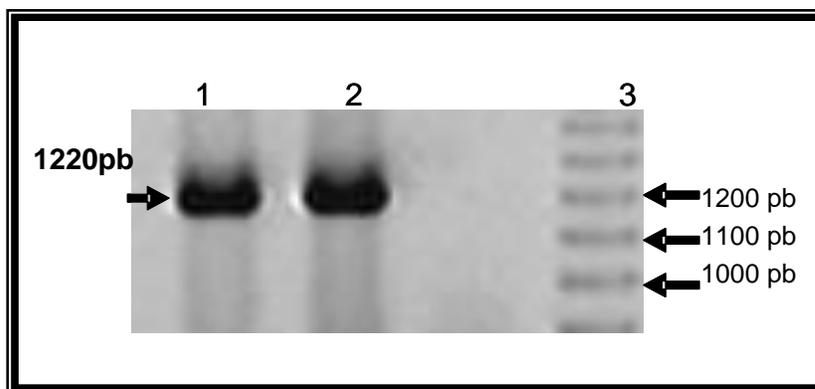


Fig.8. Amplificación de tiolasa a partir de ADN de *N. brasiliensis*: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1 y 2 producto amplificado de tiolasa de 1200 pb; carril 3 marcador de peso molecular en escalera de 100 pb.

4.4.1 Clonación de los genes de estudio.

Los productos amplificados de ambos genes se clonaron con el Kit comercial PCR Topo-XL cloning (ver metodología párrafo 3.4.7.4). Las clonas recombinantes obtenidas se analizaron mediante PCR y digestión enzimática. En las siguientes figuras se observan la caracterización con *EcoRI* de los dos tipos de clonas liberando un fragmento de 635 pb (Fig.9) en el caso de SOD y de 1220 pb en el caso de tiolasa (Fig. 10).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

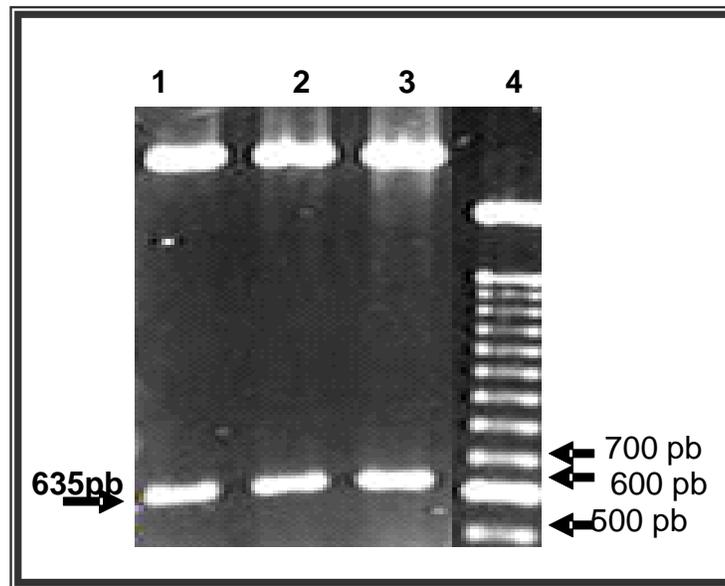


Fig.9. Caracterización mediante digestión con *Eco*RI de las clonas recombinantes de SOD de *N. brasiliensis*: Electroforesis en gel de agarosa al 2 % que muestra en los carriles 1,2 y 3 el fragmento de 635 pb liberado con *Eco* RI a partir de algunas clonas recombinantes , en el carril 4 se observa el marcador en escalera de 100pb.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

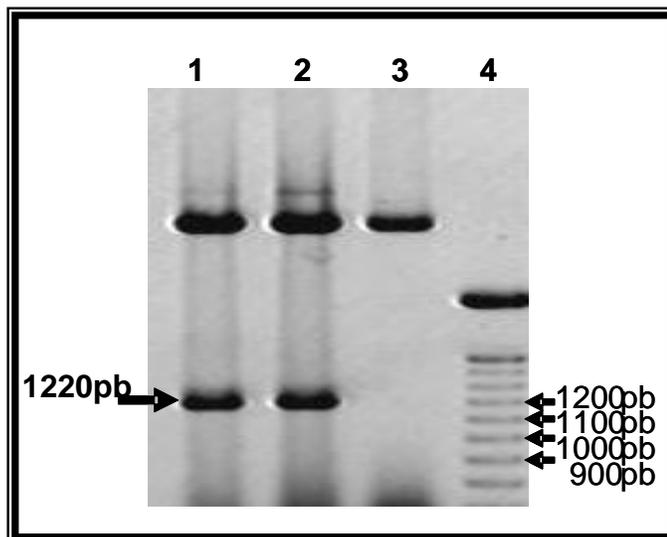


Fig. 10. Caracterización mediante digestión enzimática de las clonas recombinantes de tiolasa de *N. brasiliensis*. Gel de agarosa al 1%. En los carriles 1 y 2 se observa el fragmento de 1200 pb liberado después de digerir dos clonas candidatas con *EcoRI*. En el carril 3 se observa la digestión del plásmido inicial (sin inserto) y en el carril 4 el marcador en escalera de 100 pb

4.4.2 Secuenciación de las clonas recombinantes de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*.

La secuencia de ambos genes se determinó a partir de 2 o 3 clonas recombinantes (ver anexo). Al comparar las secuencias obtenidas con las reportadas en el GenBank, se confirmó que correspondían a los genes de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

4.5 RT-PCR competitiva de los genes de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*

4.5.1. Generación de competidores.

En base a las secuencias obtenidas para los genes de SOD y tiolasa, se escogieron enzimas que corten el inserto en su parte central, liberando así un fragmento. Esta estrategia permitió generar una nueva clona con un inserto de tamaño distinto al original.

En el caso de SOD, la secuencia de *N. brasiliensis* posee un sitio único *Sac II*, mientras que la de *N. asteroides* presenta dos sitios para esta enzima. Por esta razón, se eligió trabajar con la clona de SOD derivada de *N. asteroides* para generar el competidor. El vector recombinante con SOD se digirió con la enzima *Sac II*, la cual liberó un fragmento de 57 pb del inserto y no cortó en el vector (Fig. 11). Después de la ligación se obtuvo un nuevo vector que se propagó en *E. coli*.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

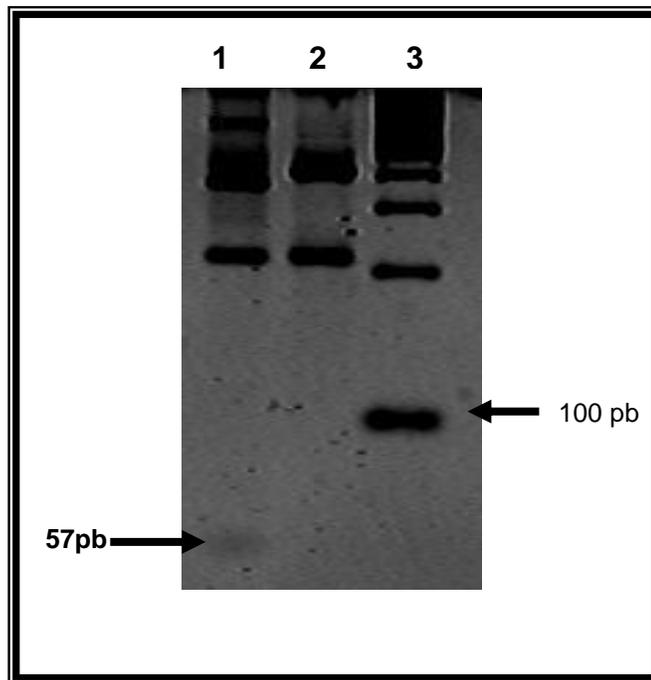


Fig. 11. Digestión del vector recombinante de SOD de *N. asteroides* con *Sac II*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1. Digestión de *N. asteroides* con *Sac II*, carril 2, digestión de *N. brasiliensis* con *Sac II*. carril 3. marcador de peso molecular en escalera de 100pb. Obsérvese la liberación del fragmento de 57 pb en el carril 1 producto de la digestión.

La misma estrategia se siguió para generar el competidor de tiolasa, pero utilizando las enzimas *Accl* y *BstEII*, que liberaron un fragmento de 725 pb. Después de hacer los extremos compatibles, el vector se religó y se propagó mediante transformación de *E. coli*.

La amplificación de estos nuevos vectores con los iniciadores específicos de los genes SOD y tiolasa generó productos de PCR de un tamaño diferente al original. Estos competidores se pueden separar de los productos amplificados a partir de los genes mediante electroforesis en gel de agarosa, como se puede apreciar en las figuras 12 y 13.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

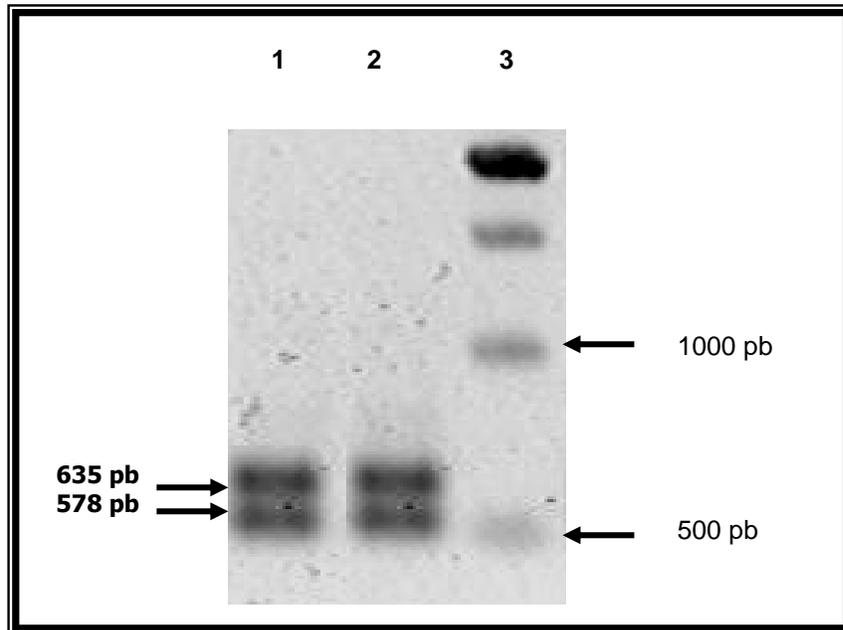


Fig. 12. Competidor de SOD de *Nocardia* en gel de agarosa al 2%. Carriles 1 y 2 producto de PCR de 578 pb que indica el competidor de SOD, producto de PCR de 635 pb derivado de SOD, carril 3, marcador de peso molecular en escalera de 500 pb.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

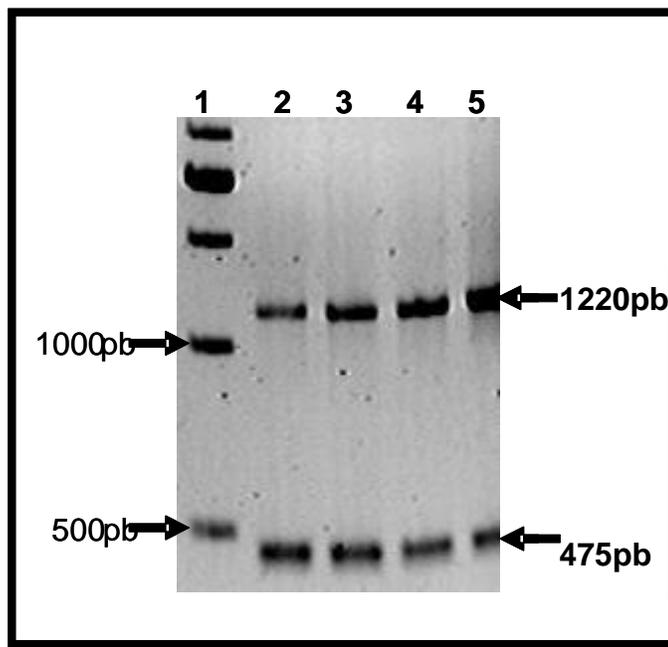


Fig. 13. Competidor de tiolasa de *N. brasiliensis* en gel de agarosa al 1%. Carril 1 marcador de peso molecular en escalera de 500 pb, en los carriles 2,3,4 y 5 se observan el producto de PCR de tiolasa de 1220 pb y su respectivo competidor de 475 pb

4.5.2. Estandarización de la PCR competitiva.

Durante la estandarización de la PCR, se estableció como primer paso el número de ciclos durante los cuales la reacción se mantenía en condición exponencial. Para eso se determinó por densitometría la intensidad de las bandas amplificadas después de diferentes ciclos de PCR (Tabla 18). Al graficar estos valores se puede observar claramente en la figura 14, que la fase

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

estacionaria se estableció para ambos genes después de los 30 ciclos, por lo cual se decidió trabajar con 25 ciclos para quedar en la fase exponencial.

Tabla 18. Intensidad de las bandas de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis* en función del número de ciclos de PCR

No. de ciclos de la PCR	Intensidad del producto amplificado de SOD (U. arbitrarias)	Intensidad del producto amplificado de tiolasa (U. arbitrarias)
20	14	14
25	24	25
30	40	39
35	41	40

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

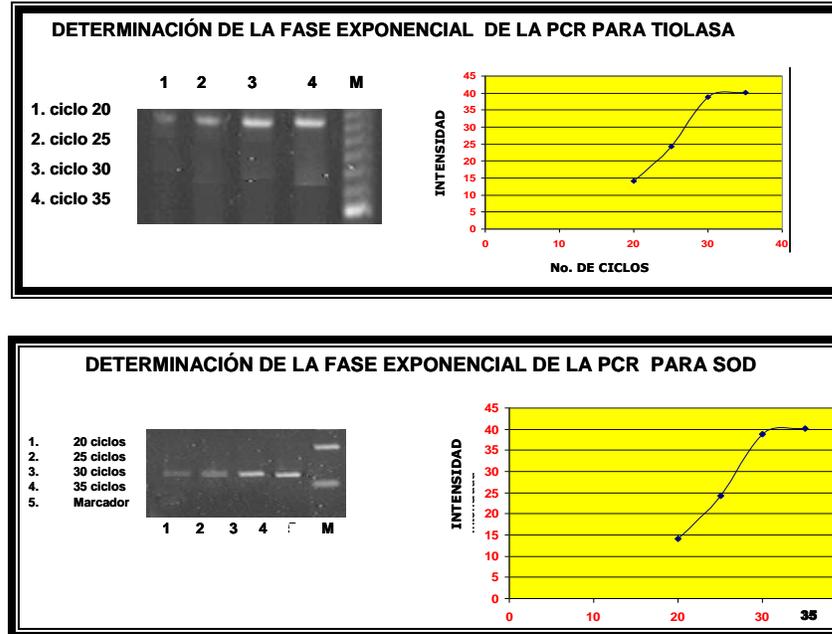


Fig.14. Fase exponencial de la PCR competitiva de SOD y tiolasa. Se observa que no hay cambios en la intensidad de los productos de PCR del competidor entre el carril 3 y 4 para ambos genes, por lo tanto la máxima intensidad se observó a los 25 ciclos. La concentración óptima de ADNc fue de 150 ng/ μ l en ambos casos.

Para validar las PCR competitivas, se realizaron ensayos co-amplificando una cantidad dada de competidor (100ng/ μ l) y cantidad creciente de ADNc. Por densitometría, se determinaron las intensidades de los productos de PCR y se graficó la intensidad relativa (la del producto derivado del ADNc versus la del competidor) en función de la cantidad de ADNc introducida en la reacción de PCR. En ambos casos, se obtuvo una relación lineal (figura 15) y se validaron los ensayos.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

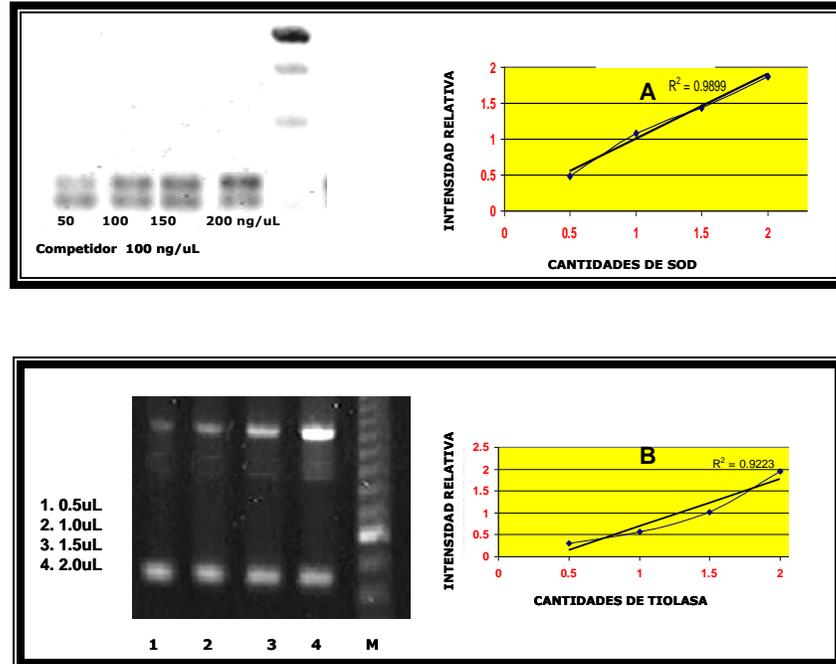


Fig.15. Validación de la PCR competitiva de SOD y tiolasa. En la gráfica A (SOD) y la gráfica B (tiolasa) se observa que la máxima intensidad del producto amplificado se dio a partir de los 25 ciclos, y la concentración óptima del competidor fue a los 100 ng/μl, tomando en cuenta el valor de R.

4.5.3 Equiparación de la cantidad de ARN bacteriano en los ensayos de RT-PCR competitiva.

Para poder equilibrar la cantidad de ARN bacteriano extraído de los cultivos de *Nocardia* y de los macrófagos infectados, se realizó una RT-PCR del ARNr de bacterias. De esta manera, se pudo determinar la cantidad de ADNc necesaria para generar la misma señal de amplificación (Fig. 16).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

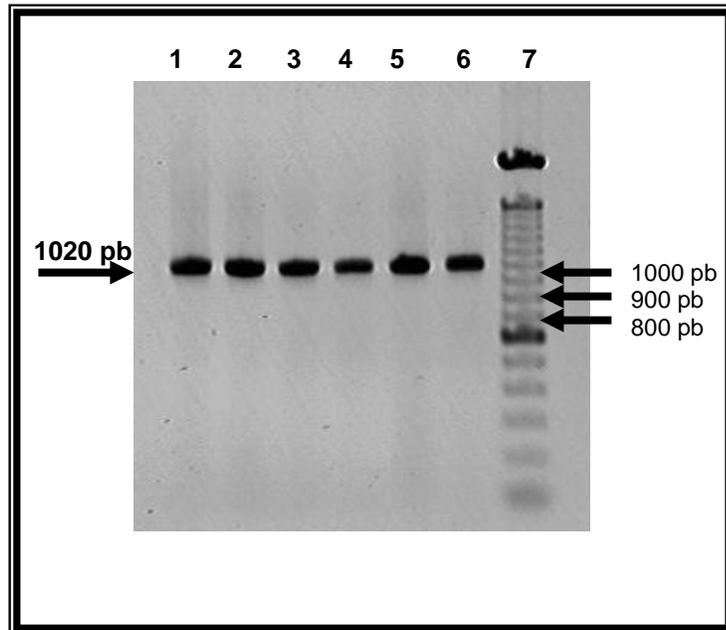


Fig. 16 RT-PCR de ARNr de bacterias. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1,2 y 3 RT-PCR de *N. brasiliensis* a partir de un cultivo, carriles 4, 5 y 6 RT-PCR de ARNr de *N. brasiliensis*, infectando macrófagos. Obsérvese que la intensidad de las bandas es muy similar en ambas condiciones. Carril 7. Marcador de peso molecular en escalera de 100 pb

4.5.4. Ensayos de la expresión de los transcritos de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis* por RT-PCR competitiva.

Una vez determinadas las condiciones de la RT-PCR competitiva y la cantidad de ADNc, se comparó la cantidad de transcritos de SOD y de tiolasa, en las bacterias en cultivo y después de 1 h de infectar los macrófagos. Se pudo observar una disminución relativa de la intensidad de expresión del transcrito de SOD cuando *N. brasiliensis* infectaba al macrófago. Así también se pudo observar la ausencia de la banda de 1220 pb de tiolasa bajo estas mismas

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

condiciones (Ver Figs. 17 y 18 respectivamente). En ambos casos, se observa la amplificación de la banda del competidor con una buena intensidad, así como la del ADNc del cultivo bacteriano.

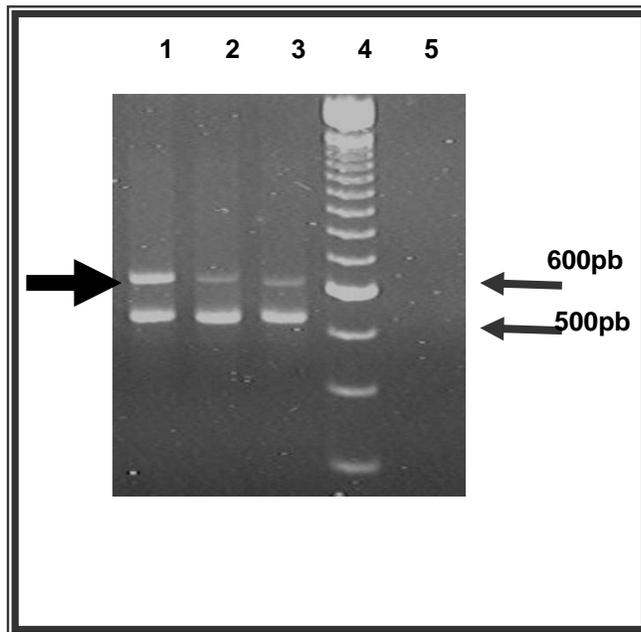


Fig. 17 Expresión diferencial de SOD. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 Expresión de SOD de *N. brasiliensis* sin infectar, carril 2 y 3 expresión de SOD de *N. brasiliensis* cuando infecta al macrófago por 60 minutos, carril 4 marcador de peso molecular de 100 pb en escalera y carril 5 RT negativa. La flecha gruesa señala la banda derivada del transcrito de SOD, mientras que la banda inferior corresponde al competidor. Obsérvese el cambio en la intensidad entre las bandas de los transcritos de SOD entre los carriles 1 (cuando *N. brasiliensis* no está infectando) y 2 o 3 (cuando está infectando al macrófago).

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

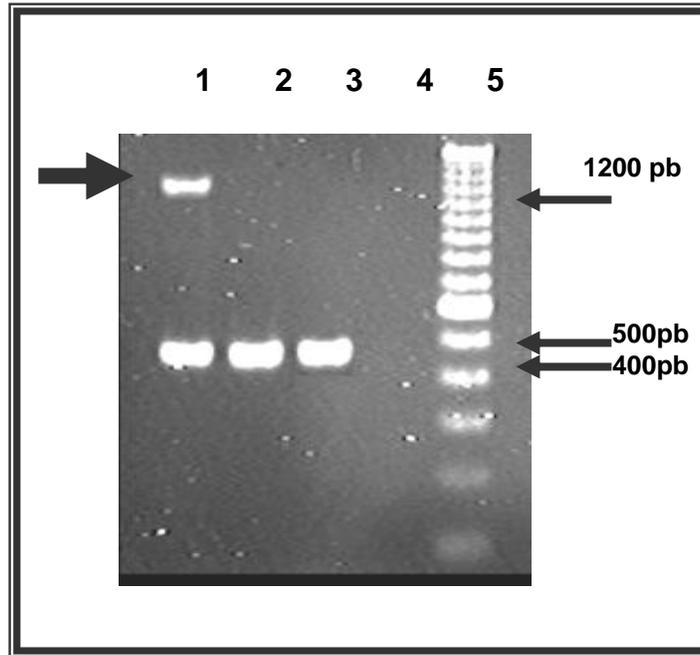


Fig. 18. Expresión diferencial de tiolasa. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 %. Carril 1 Expresión de tiolasa de *N. brasiliensis* sin infectar, carril 2 y 3 expresión del gen cuando *N. brasiliensis* infecta al macrófago por 60 minutos, carril 4 marcador de peso molecular de 100 pb en escalera y carril 5 RT negativa. La flecha gruesa señala la banda derivada del transcrito de tiolasa, mientras que la banda inferior corresponde al competidor, Obsérvese la ausencia de las bandas de tiolasa en los carriles 2 y 3 (cuando *N. brasiliensis* está infectando al macrófago).

IV. CONCLUSIONES

- **La utilización del despliegue diferencial para el estudio de los cambios de expresión de los genes de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 / ATCC 700358 durante la infección del macrófago, no es el método adecuado debido a la presencia de regiones ricas en adeninas de los ARN ribosomales.**
- **Se clonaron y secuenciaron parcialmente los genes de RNA ribosomal de 16 y 23 S, superóxido dismutasa (SOD), y tiolasa de la cepa patógena de *N. brasiliensis* HUJEG-1.**
- **Una hora después de la infección del macrófago, se observó una disminución relativa de los ARNm de SOD y tiolasa comparados con los ARN ribosomales.**
- **Se comprobó que existen cambios marcados de los niveles de transcritos bacterianos de SOD y tiolasa durante la infección del macrófago.**

V. DISCUSIÓN

Uno de los determinantes claves de la virulencia de los microorganismos intracelulares facultativos es su habilidad para establecerse y replicarse dentro de la célula hospedera, evadiendo así la respuesta inmune.

En la respuesta contra bacterias intracelulares participan tanto la respuesta inmune celular como la humoral, aunque existen todavía discrepancias sobre la importancia relativa de ambas (Reiner, 1994, Salinas 2000). Sin embargo, las dos dependen de la presencia de los fagocitos mononucleares, elementos centrales en la respuesta inmune innata y adquirida. Irónicamente los monocitos y macrófagos son células blanco de una gran cantidad de patógenos que requieren de un ambiente intracelular en donde replicarse (Reiner, 1994; Devki, 2001)

Microorganismos intracelulares como *Leishmania*, (Reiner, 1994) *Yersinia*, (Bliska, 1993), *Mycobacteria* (Sibley, 1987; Kaye, 1986), *Brucella* (Corbel, 1997) y otros más, permanecen dentro del macrófago mediante diferentes estrategias que les permiten evadir los procesos de destrucción. Se han demostrado y analizado los cambios de expresión génica que ocurren durante el proceso de infección de la célula por algunos microorganismos, principalmente desde del punto de vista del macrófago pero también del agente infeccioso (Rindi, 1999; Asnicar, 2001). Las especies patógenas de *Nocardia* tienen también la habilidad de sobrevivir dentro del macrófago, pero las dos especies que han sido principalmente estudiadas, lo

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

fueron desde el punto inmunológico (Beaman 1994 y Salinas 2000). Para estas especies, es escasa o nula la información sobre los genes y productos bacterianos que pudieran estar implicados en esta relación (macrófago – *Nocardia*).

El despliegue diferencial es una técnica que permite elucidar genes desconocidos en diferentes condiciones y aprovecha la presencia de poliadenilación en la región 3' de los RNAm. Estudios previos por diferentes investigadores indican la presencia de poliadenilación en algunas bacterias. (Fislage,1997; Sarkar,1997; Ragno,1998; River,1998; Rindi,1999 Adilakshmi,2000; Asnicar,2001). En el caso de *Nocardia*, la evidencia de síntesis de ADNc a partir de un iniciador poli dT, fue alentadora para escoger el despliegue diferencial. Sin embargo, el análisis de los productos amplificados indicó que las bandas de mayor intensidad correspondían a RNA ribosomales que se podían amplificar por la presencia de zonas internas ricas en adenina. La abundancia de estos ARNs y el tamaño corto de las colas de poliA reportado para los mensajeros bacterianos podrían explicar que se amplificaron principalmente fragmentos de los ARNr 23S. Por lo tanto, con estos resultados no se puede corroborar ni descartar la presencia de poliadenilación en los ARNs mensajeros de *Nocardia*. Para eliminar la interferencia de los ARN ribosomales en los ensayos de despliegue diferencial, es indispensable eliminarlos mediante hibridación con sondas específicas (Fislage,1997) que al introducir un paso adicional, complicaría el análisis comparativo de las poblaciones de mensajeros de las bacterias en cultivo *versus* las bacterias infectando los

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

macrófagos. Por estos resultados preliminares del despliegue diferencial, se decidió estudiar los cambios de expresión de algunos genes específicos de *Nocardia* mediante RT-PCR competitiva.

A la fecha, no se han identificado factores de virulencia en *N. brasiliensis*. Algunas proteínas, principalmente enzimas (catalasa y proteasa) han sido asociadas a la virulencia de *Nocardia brasiliensis* (Torres,2001), sin embargo, su papel no ha sido claramente demostrado. Se ha reportado que la superóxido dismutasa juega un papel clave en la virulencia de varios microorganismos intracelulares como *Nocardia asteroides* (Beaman,1995), *Brucella* (Corbel,1997), *Mycobacterium* (Ragno,1998), entre otros. Ambas enzimas (catalasa y superóxido dismutasa) neutralizan los derivados activos del oxígeno, y podrían favorecer así la sobre vivencia de la bacteria a pesar del estallido respiratorio del macrófago; sin embargo, el papel de la catalasa no esta tan claramente demostrado. *M. leprae*, por ejemplo no tiene actividad de catalasa (Wheeler,1980), y mutantes de *M. tuberculosis* mantienen su virulencia aun sin poseer la catalasa funcional (Deretic,1995). Basándose en los trabajos de *N. asteroides*, en este trabajo se analizaron los cambios de expresión de dos genes de antígenos inmunodominantes: superóxido dismutasa y tiolasa (Beaman,1995 y Castro,2005). El desarrollo de la RT-PCR competitiva implicó la generación de competidores y su estandarización. Para este propósito, se amplificaron y clonaron las secuencias de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis*. Los competidores se derivaron de los plasmidos recombinantes previamente obtenidos, eliminando una secuencia interna pero preservando los sitios de alineamiento de los iniciadores. La co-

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

amplificación de los competidores y de los plásmidos iniciales, generaron productos de tamaño inferior a los originales que se pudieron separar mediante electroforesis. En las condiciones establecidas, la PCR competitiva permitió obtener una intensidad relativa de la banda correspondiente a los transcritos de SOD y de tiolasa proporcional a la cantidad inicial presente en el tubo, por lo cual la técnica quedó validada.

Otro de los problemas al cual nos enfrentamos para poder comparar la expresión de los genes en estudio, era la presencia de los ARNs eucariotes en una sola de las condiciones: células infectadas por *Nocardia*, que no permitía equiparar las preparaciones de ARN en función de su concentración total. Se decidió utilizar el ARNr 16S, como reflejo de la cantidad de ARN bacteriano en las dos preparaciones. Los ARNs han sido frecuentemente utilizados como control interno, aunque no se consideran exactamente como genes constitutivos, son unos de los que predominan en la célula y sus variaciones son menores que las de otros. Al obtener intensidad similar de la banda de los ARNr 16S a partir de las preparaciones de ARN, se infirió que la cantidad de ARN bacteriano dentro del macrófago era equiparable con la del ARN del cultivo.

La RT-PCR indicó que para ambos genes analizados, hubo una importante disminución de la cantidad de sus transcritos a la hora de infección del macrófago por la bacteria. Esta disminución era más notable en el caso de la tiolasa, ya que no se evidenció banda amplificada alguna mientras que los transcritos de SOD se disminuyeron. Este resultado podría ser la consecuencia de diferentes mecanismos:

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

1- Incremento drástico de la cantidad de los ARNr que al constituir el control interno, hace aparentar que las otras poblaciones de transcritos están en cantidades menores. La transcripción de los ARN ribosomales se aumenta en algunas situaciones como cuando la célula este en crecimiento activo. Se escogió comparar las bacterias intracelulares contra las de cultivo en fase exponencial; que estan en multiplicación activa. Además, en un experimento adicional se demostró que los transcritos de la proteína de choque térmico no disminuyeron entre las dos situaciones: *Nocardia* en cultivo e intra-macrófago, por lo cual se puede descartar esta hipótesis.

2- Disminución de la cantidad de los transcritos de SOD y tiolasa en *Nocardia* durante la fase temprana de la infección del macrófago que se podría deber a una disminución de su transcripción y/o en la inestabilidad de su ARN mensajero. Esta hipótesis parece la más plausible, ya que al infectar al macrófago, la bacteria esta sometida a un medio completamente diferente al del medio del cultivo. Las condiciones de estrés modifican el patrón de transcripción de la bacteria, involucrando factores sigma específicos, diferentes con el fin de favorecer la adaptación de la bacteria. En este caso, estos dos genes no pertenecen al grupo de los genes “indispensables”, como los de choque térmico, cuya transcripción se mantiene.

En el caso de tiolasa, es muy poca la información que se tiene sobre su papel en el proceso infeccioso de *Nocardia*. Esta enzima que participa en la degradación de los ácidos grasos, ha sido involucrada en la síntesis y remodelación de la pared

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

bacteriana (Castro, 2005), y por consecuencia podría participar en los cambios de morfología (formas L) que se han descrito tanto en *N. asteroides* como *otitidis caviarum* (Sudou, 2001). Cabe señalar que estas formas L se han descrito después de un largo periodo de infección y no a la hora. De acuerdo a los resultados encontrados, no se aumentan los niveles de transcritos de tiolasa de *N. brasiliensis* durante la infección temprana del macrófago.

La participación de la SOD como factor de virulencia ha sido ampliamente descrita en el caso de otras bacterias (Ninivieri,2004). Estudios hechos por Beaman indican que *Nocardia asteroides* expresa una enzima tetramérica muy peculiar que se une al hierro, manganeso y zinc (Sod A) y que esta proteína posee un efecto protector contra la fagocitosis de PMN.

En este trabajo, obtuvimos una secuencia de SOD de *N. brasiliensis* que al compararla con las reportadas en el GenBank indicó que correspondía también al grupo de las SodA. La secuencia aminoacídica de la Sod A de *N. brasiliensis* comparte 98% de similitud con las de *N. asteroides* (P53651, AAA91964.1) y *N. abcessus* (AAS48627.1); y 97% con la de *N. farcinica*. El grupo de las Sod A utilizan tanto el Mn como el Fe como cofactores, sin embargo se necesitarían estudios complementarios para averiguar si la enzima de *N. brasiliensis* presenta también la particularidad de asociarse con Zn.

Son pocos los reportes sobre los transcritos de SOD en condiciones de infección y existe todavía discrepancia sobre la regulación transcripcional de este gen. Para varias especies, trabajos apuntan a que la transcripción de SOD depende de las condiciones redox del medio (Laundenbach,1989; Kim, 1999), sin embargo otros

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

trabajos presentan resultados opuestos (Scott 1995; Thomas, 1999). La presencia o escasez del cofactor constituye también un señal regulatoria de la transcripción (Scott, 1995). De hecho, aunque se han reportado que los niveles de SOD varían con la fase de crecimiento de la bacteria, se desconocen los mecanismos moleculares involucrados.

El papel de la SOD en el proceso infeccioso ha sido ampliamente descrito. Beaman reporta un aumento de SOD en el sobrenadante de cultivo de *N. asteroides* cuando es fagocitada por neutrófilos. Sin embargo, algunos autores difieren sobre el origen y función de esta actividad presente en el medio de cultivo de microorganismos cercanos, ya que estudios recientes indican que la proteína no está secretada sino que su presencia es consecuencia de una lisis bacteriana (Kowald, 2005).

Varios reportes demuestran la importancia de la actividad de SOD durante el proceso infeccioso, ya que al bloquear la actividad mediante anticuerpos evita la infección, tanto en el caso de *Brucella* como de *N. asteroides* y se ha propuesto utilizar vacunas que incluyen a esta proteína. Estos resultados parecen contradictorios con la disminución del transcrito de SOD cuando *N. brasiliensis* es fagocitada por el macrófago, que observamos en este trabajo. Pero las condiciones de los experimentos (*in vivo*/*in vitro*) y los tiempos de incubación (varios días/ 1h) no son comparables. La expresión de la SOD podría ser un elemento clave en el desarrollo de la infección en el organismo, sin embargo podría no ser un gen clave en la infección del macrófago por la bacteria. Se ha

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

reportado que mutantes de SOD, podían infectar e incluso multiplicarse en los macrófagos *in vitro* aunque hayan perdido su virulencia (Thomas,1999).

A la hora de infección del macrófago, hay un cambio importante en los transcritos de la bacteria que incluye una inhibición o disminución temporal de la expresión de genes de tiolasa y de SOD, esta etapa podría constituir **“la fase de adaptación”** de la bacteria a su nuevo entorno. Para poder determinar si se trata de una regulación temporal de los transcritos es necesario hacer una cinética de expresión a diferentes tiempos, de esta manera podríamos observar si en realidad esta disminución o inhibición de los transcritos se mantiene o se revierte. Es necesario tomar en cuenta que existe la posibilidad de que existan otros genes involucrados en la virulencia de la bacteria en este momento de la infección, y que probablemente SOD juegue un papel importante en etapas tardías de la infección como lo establece Beaman en sus estudios. Los resultados obtenidos en este estudio son los primeros en aportar conocimientos sobre la expresión de los transcritos de SOD y tiolasa de *N. brasiliensis* en cultivo, así como en su célula blanco.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Adilakshmi T, Peter D, (2000). Polyadenilation in mycobacteria:evidence for oligo(dT)-primed cDNA synthesis. *Microbiology*. 146: 633-638.
- ◆ Arenas, R. (1993). Micetoma: Micología Médica ilustrada, McGraw-Hill Interamericana S.A . México, D.F
- ◆ Asnicar A. Mark, Henegariu O, Shaw M, et al (2001). Alteration in expression of the rat mitochondrial ATPase 6 gene during *Pneumocystis carinii* infection. *BMC Microbiology* 1:8
- ◆ Bartos, M, Falkinham, JO, Pavlik I. (2004). Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria review. *Vet. Med. – Czech*, 49(5): 161–170.
- ◆ La Base Molecular de la vida. (2003). James R. Mckee, 3ª,ed, McGraw Hill. Madrid,España.
- ◆ Bassett DE, Eisen MB (1999) Gene expresión informatics-it's all in your mine. *Nat Genet*. 21:151-155.
- ◆ Beaman B,L, Beaman L (1994) Nocardia species: host-parasite relationships *Clin Microbiol Rev*. Apr; 2:213-64.
- ◆ Beaman BL, Beaman LV Black C M, (1985). Role of superoxide dismutase and catalase as determinant of pathogenicity of *N.asteroides* : Importance in Resistence to Microbial activities of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infection and Immunity*. 47(1):135-141.
- ◆ Beaman BL, Boiron P, Beaman L, Brownell GH, Schaal K, Gombert ME, (1992). Nocardia and nocardiosis. *J Med Vet Mycol*; 30 Suppl 1:317-31.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

- ◆ Beaman L. and Beaman B.L. (1990). Monoclonal Antibodies Demonstrate that Superoxide Dismutase Contributes to Protection of *Nocardia asteroides* within the Intact Host. *Infection and Immunity*, 58(9): 3122-3128
- ◆ Biaggini RE, Sarmiento VH, Querio RS. (1996) Mycetomas: problemas de salud pública en el noreste argentino. *Arch Arg Dermatol*; 46(2): 67-72.
- ◆ Black C, Palieschecsckey M, Beaman L (1986). Acidification of phagosomes in murine macrophages: Blockages by *Nocardia asteroides*. *L Infect Dis* 154:952-958.
- ◆ Bliska Jb, Galan JE, Falkow S. (1993) Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell*. Jun 4;73(5):903-20
- ◆ Brent R (1999). Functional Genomics: learning to think about gene expression data. *Curr Biol*. 9:338-341
- ◆ Castro C. Angeles. 2005. Identificación de un antígeno inmunodominante de *Nocardia asteroides* con potencial diagnóstico. Tesis Doctoral. Fac. de Medicina UANL, Monterrey, México
- ◆ Chávez M, Romero O, Galarza C. Clinical and microbiological aspects of micetoma. En: 58 th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology. San Francisco, 2000. p. 10-5.
- ◆ Conde C, Mancilla R, Fresán M, Ortiz Ortiz L.(1983). Immunoglobulin and complement in Tissue of Mice Infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infection and immunity* 40 (3):1218-1222.
- ◆ Corbel, M.J.(1997). Brucellosis: an overview. *Emerg infect.Dis.* 3:213-221
- ◆ Debra L, Piddington F, Ferric C ,et al. (2001). Cu, Zn Superoxide Dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst. *Infection and immunity*. 69(8):4980-4987.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

- ◆ Deem R.L, Beaman B.L, Gershwin M. E. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in Nude Mice. *Infection and immunity* **38**:914-920.
- ◆ Deretic V. Philipp W. (1995). *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with and inactivated oxidative stress regulatory gene: implication for sensitivity to isoniazid. *Mol .Microbiol.* **17**: 889-900.
- ◆ Devki Nandan, Keith L (2000) Exploitation of host cell signaling machinery:activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis. *J. leukocyt biology*, **67**:464-470
- ◆ Donna M .(2001). Differential expression of sigE by *Mycobacterium tuberculosis* during intracellular growth. *Microbial Patogenesis*.January **30**:271-78.
- ◆ Dubrau E, Chan J, Raynaud C, Vellore P, Lanéelle M, Daffé M. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbio* . **36**(3):630-7.
- ◆ Ehlers S, Mielke m, Hahn H (1994). Progress in TB Research: Robert Koch's, Dilemma Revisited. *Immunol Today* **15**(1):1-4.
- ◆ Feistner G J, Beaman BL(1987).Characterization of 2,3-dihydroxybenzoic acid from *Nocardia asteroides* GUH-2. *J Bacteriol.* **169**(9):3982-7.
- ◆ Ferre RN, Yera J, Rondón O(2001). Micetoma. Presentación de un caso. *Rev Cubana Ortop Traumatol*; **15**(1): 74-8.
- ◆ Fislage R, Berceanu M. (1997). Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, **25** (9):1830-1835
- ◆ Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem*, **64**:97-112
- ◆ Gamielidien J, (2002). EuKaryotic genes in *Mycobacterium tuberculosis* could have a role in pathogenesis and immunomodulation. *Trends Genet*.Jan. **18**: 5-8.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

- ◆ Heinzen RA, Frazier M E(1992). *Coxiella burnetii* superoxide dismutase gene: cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **60**:3814-3823.
- ◆ Kaufmann S.(1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev immunol.* **11**:129-63.
- ◆ Kim YC, Miller CD (1999) Transcriptional regulation by iron of genes encoding iron- and manganese-superoxide dismutases from *Pseudomonas putida*. *Gene*. **239**(1):129-35
- ◆ Kowald A., Hans L.(2005). Alternative pathways for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase. *Journal theoretical biology* .**6**:34.
- ◆ Laundenbach D., Trick C. (1989) Cloning and characterization of an *Anacystis nidulans* R2 superoxide dismutase gene. *Mol Gen Genet.* **6**(3):455-61.
- ◆ McDonough K.A, Kress (1993). Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect immunity* **61**:2763:2773
- ◆ McNeil M M, Brown J.M (1994). The medical important aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Rev.* **3**:357-417
- ◆ Miller H. Barbara (1999). Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in Resistance to killing by human macrophages. *Infection and immunity*, **68** (1):387-90.
- ◆ Sambrook y Russell (2003) Molecular Cloning. Laboratory Manual. 3a. Edit. CSHL press. U.S.A.
- ◆ Muriel Merkamm, Armel G (2001). Cloning of de Sod A gene from *Corinebacterium melassecola* and Role of Superoxide Dismutase in Cellular Viability. *Journal of Bacteriology*; **4**: 1284-1295.
- ◆ Niviere V, Fontecave M (2004) Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. Review .*J Biol Inorg Chem.* 2004, **9**(2):119-23..

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

- ◆ Ortiz-Ortíz L, Contreras M.F, Bojalil M.F(1972).Cytoplasmic Antigens from *Nocardia* Eliciting a Specific Delayed Hipersensitivity. *Infect Immunity* 5(6):879-882.
- ◆ P. Boiron. et al.(1998). *Nocardia*, Nocardiosis and mycetoma. *Medical Mycology*.36 (1):26-37.
- ◆ Pfeifer C G, Marcus S L (1999). *Salmonella typhimurium* Virulence Genes Are induced upon Bacterial Invasion into Pathogenic and Nonpathogenic Cell: *Infect immunity* 67(11):5960-5968.
- ◆ Ragno Silve, Iris Estrada García, Robert Butler and Joseph Colston. Regulation of macrophage Gene Expression by *Mycobacterium tuberculosis*: Down-Regulation of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase. (1998). *Infection and Immunity*. 66(8): 3952-3958.
- ◆ Reiner NE, Nandan D. (2000). Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis Review. *J Leukocyt Biol*. 67(4):464-70.
- ◆ Reiner NE. (1994). Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today*. 15(8):374- 81. Review
- ◆ Rico G, Ochoa R, Oliva A, González M, Walker S, Ortiz Ortíz L (1982). Host-parasite relationship in infections due to *Nocardia brasiliensis*. Enhanced resistente to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. *J immunol* 129:1688-1693.
- ◆ Rindi L,Lari Nicoletta (1998) Oligo(dT)-primed síntesis of cADN by Reverse transcriptasa in *Mycobacteria*. *Biochemical and biophysical research communications* 248:216-218.
- ◆ Rippon JW. (1990) *Micología Médica.*: Ed. Interamericana, México,D.F

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

- ◆ Salinas C M, Pérez Rivera I (2004) Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infection and Immunity*. 72:5597-5604.
- ◆ Salinas C, M.C, Pérez R. L.I, Welsh O, Rodriguez M, Rinaldi M.G.(1992).Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J.Mycol.Med* 2:1-5.
- ◆ Salinas C, M.C.(2000).*Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes and infection*. 2:1373-1381.
- ◆ Salinas C, M, Martínez Dávila I, Welsh O. (1998). La inmunogenicidad de antígenos de *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c.Ciencia UANL.Enero-Marzo 1:30-3
- ◆ Sandoval Trujillo H. (1993). Actinomicetos. Microorganismos de la luz. UAM, Xochimilco, México.
- ◆ Sarkar N. (1997) Polyadenilation of mRNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem*. 66:173-97.
- ◆ Sibley, L.D, Krahenbuhl, J.L.1987. *Mycobacterium leprae* burdened macrophages are refractory to activation by γ interferon. *Infection and immunity*. 55:446-450
- ◆ Sudou A, Hashimoto T, Nakamura H, Yagyuu H, Sarashina G, Hatao E, Tuchida F, Adachi H, Kishi K, Matuoka T.Sudou A, Hashimoto T, (2001) Pulmonary Nocardia otitidis-caviarum infection in a patient with Cushing's disease, *Journal of Bacteriology*, 39(3):210-4.
- ◆ Thomas A. Geissmann, Michael Teuber, and Leo Meile. (1999) Transcriptional Analysis of the Rubrerythrin and Superoxide Dismutase Genes of *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology*, 181(22): 7136–7139.
- ◆ Torres López, E. (2001). La actividad de catalasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en el micetoma experimental. Tesis doctoral. Fac. De Medicina UANL., Monterrey, México.

Cambios en la expresión génica de *Nocardia brasiliensis* durante la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón de la cepa BALB/c

- ◆ Utz P, Horprich PD .(1982). Micetoma. Tratado de enfermedades infecciosas.: Ed. Científico - Técnica;. La Habana, Cuba
- ◆ Vera C L, Salinas C M, Welsh O, Rodríguez MA (1992) Isolation and purification of Two immunodominant Antigens fom *N. brasiliensis*. *J. Clin Microbiol* 30(5):1183-1188.
- ◆ Vera C. L Jonson WM, Welsh O.(1999). Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalasa gen fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona* and *Rhodococcus*. *J.Clin. Microbiol.*Jun 37(6):1971-6.
- ◆ Vila D, Refugio M, Roberto A. (1995) Micetoma diseminado por *N. brasiliensis* con afección ósea y pulmonar. *Dermato Rev Mex*; 39(5): 287-9.
- ◆ Scott Campbell and David E. Laudenbach(1995) Characterization of Four Superoxide Dismutase Genes from a Filamentous Cyanobacterium *Journal of Bacteriology*, 177(4):964-972.
- ◆ Wheeler, P.R, Gregory D. (1980). Superoxide dismutase peroxidatic activity catalase in *M. leprae* purified from armadillo liver. *J. Gen. Microbiol*, 121: 457-464.
- ◆ Zhang Y, Lathriga, R. (1991). Genetic Analysis of superoxide dismutase the 23 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol microbial*, 5:381-391