



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA PROGESTERONA Y DE LA DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA
EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Nocardia brasiliensis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CLAUDIA CRISTINA PAREDES AMAYA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: M EN C. MARIA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA PROGESTERONA Y DE LA DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA
EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Nocardia brasiliensis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CLAUDIA CRISTINA PAREDES AMAYA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: M EN C. MARIA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de abril de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PAREDES AMAYA CLAUDIA CRISTINA** con número de cuenta **513451733**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA PROGESTERONA Y DE LA DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Nocardia brasiliensis*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**:

Presidente: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Vocal: DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES
Secretario: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Suplente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ
Suplente: M. EN C. MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de junio de 2014



M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por permitirme realizar mis estudios de Maestría.

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca (280481) recibida durante el desarrollo de mis estudios de Maestría.

A PAPIIT, por el financiamiento parcial del proyecto (PAPIIT IN217113)

Al PAEP, por el apoyo económico otorgado para la asistencia al simposio internacional en biología de *Nocardiae* y micetoma.

A la Facultad de Medicina de la UNAM por el apoyo parcial a través del presupuesto 2012 y 2013, asignado a Dra. Francisca Hernández Hernández, del departamento de Microbiología y Parasitología.

Por último, agradezco a los miembros del comité tutorial por su inmenso apoyo y colaboración durante el desarrollo del proyecto: muchas gracias a la Dra. Francisca Hernández Hernández, al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y a la M en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los miembros de la unidad de Micología Médica, del departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina UNAM. En especial le doy las gracias a mi asesora, la Dra. Francisca Hernández Hernández, por haberme acogido durante estos dos años, tan amable y calurosamente en su laboratorio, por todo el apoyo brindado y por compartir sus conocimientos conmigo.

A los miembros de mi comité tutorial, la M en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso y el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, por sus sugerencias para el desarrollo del proyecto de investigación, las cuales fueron importantes para mi crecimiento profesional.

A los miembros del jurado de examen de grado: Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal, Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, Dr. Javier Rolando Ambrosio, por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis.

Asimismo, agradezco a la QFB. Erika Córdova, quien además de brindarme apoyo en la parte técnica del proyecto, me ha brindado una amistad sincera y que llevaré en mi corazón por siempre.

Gracias al candidato a doctor y amigo Saúl Cruz, por todas sus observaciones y aportaciones para el proyecto.

Gracias a los demás miembros del laboratorio de Micología, al Dr. Rubén López Martínez, la Bióloga Elva Bazán, Dra. Roció Castañón, quienes me acogieron y me dieron su amistad en todo este tiempo compartido.

Gracias a todas las personas que estuvieron acompañándome en este camino y que mediante sus consejos y su amistad hicieron de mi estancia en México una experiencia inolvidable.

Gracias a mi familia, en especial a mi mamá, por su inmensa e incondicional ayuda durante este tiempo. Sin ti, este sueño no se habría hecho realidad.

*Para ti mami,
a quien le dedico todo mi triunfo!*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1 El género <i>Nocardia</i>	19
1.2 <i>Nocardia brasiliensis</i>	20
1.3 Características morfológicas.....	20
1.4 Características generales del genoma de <i>N. brasiliensis</i>	21
1.5 Funciones de los factores de virulencia	22
1.6 Espectro Clínico: Actinomicetoma.....	24
2 GENERALIDADES HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES	28
2.1 Síntesis de las hormonas esteroides sexuales	28
2.1.1 Testosterona (T).....	29
2.1.2 Estrógenos (E ₂).....	30
2.1.3 Progesterona (P ₄)	30
2.2 Mecanismo de acción de las hormonas esteroides sexuales	31
2.2.1 Mecanismos genómicos.....	31
2.2.2 Receptores	31
2.2.3 Mecanismos de acción no genómicos	33
3 ANTECEDENTES	34
3.1 Hormonas sexuales esteroides y la regulación de la respuesta inmune	34
3.2 Efecto de las hormonas esteroides sexuales sobre algunas infecciones micóticas y sus agentes causales.....	36
3.3 Efecto de las hormonas esteroides sexuales sobre algunas infecciones bacterianas y sus agentes causales.....	37
3.4 Efecto de las hormonas esteroides sexuales el crecimiento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Nocardia brasiliensis</i>	39
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
5 HIPÓTESIS	42
6 OBJETIVOS.....	43
6.1 Objetivo general.....	43

6.2	Objetivos específicos	43
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
7.1	Cepa bacteriana.....	44
7.2	Descripción general de la metodología.....	44
7.3	Concentración de hormonas esteroideas.....	45
7.4	Condiciones de cultivo.....	46
7.5	Extracción de RNA total con Trizol® (Invitrogen).....	47
7.6	Cuantificación del RNA.....	48
7.7	Tratamiento con DNAsa I (Invitrogen).....	48
7.8	RAP-PCR.....	49
7.9	Selección de genes expresados diferencialmente	50
7.10	Purificación de genes expresados diferencialmente.....	51
7.11	Cuantificación del DNA purificado	51
7.12	Clonación de los genes expresados diferencialmente	52
7.13	Secuenciación y análisis de secuencias.....	56
7.14	Análisis del cambio de expresión de genes específicos inducidos por P4 y DHT.....	57
8	RESULTADOS	61
8.1	Cultivo, extracción y cuantificación de RNA	61
8.2	Tratamiento con DNAsa I.....	62
8.3	RAP-PCR.....	63
8.4	Selección y purificación de genes de <i>N. brasiliensis</i> expresados diferencialmente.....	66
8.5	Clonación de los genes expresados diferencialmente.....	66
8.6	Análisis de las secuencias de los fragmentos expresados diferencialmente	68
8.7	Análisis del cambio de expresión de genes específicos, inducido por P4 y DHT.....	71
8.8	Estandarización de las condiciones de amplificación.....	71
8.8.1	Gen de la superóxido dismutasa	72
8.8.2	Gen de la tiorredoxina reductasa	73
8.8.3	Gen de la ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α	74
8.8.4	Gen de la ciclopropano ácido graso sintasa.....	74

8.9	RT-PCR	75
9	DISCUSIÓN.....	87
10	CONCLUSIONES.....	97
11	PERSPECTIVAS	98
12	BIBLIOGRAFÍA	99
13	ANEXOS	109
	Anexo 1. Cuantificación de RNA total de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con P ₄ y DHT.....	109
	Anexo 2. Cuantificación de DNA purificado-P ₄	110
	Anexo 3. Cuantificación DNA purificado-DHT	110
	Anexo 4. Tamaño esperado de la banda después de la clonación	111

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas para identificación de <i>N. brasiliensis</i>	26
Tabla 2. Mezcla de reacción para el tratamiento del RNA con DNAsa I.....	48
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos	49
Tabla 4. Combinaciones de oligonucleótidos usados para el RAP-PCR	49
Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para comprobar la presencia	54
Tabla 6. Oligonucleótidos para el estudio de genes específicos.....	58
Tabla 7. Oligonucleótidos para amplificar un fragmento del rRNA 16S	60
Tabla 8. Análisis de secuencias de genes con cambio de expresión después del tratamiento con P ₄	69
Tabla 9. Análisis de secuencias de genes con cambio de expresión después del tratamiento con DHT	70
Tabla 10. Secuencia de oligonucleótidos específicos para el gen de la enzima rRNA adenina (N6) metiltransferasa.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general del receptor nuclear de hormonas esteroides sexuales.....	32
Figura 2. Diagrama general de la metodología.....	45
Figura 3. Condiciones de cultivo para la extracción de RNA y el estudio de expresión diferencial de genes.	47
Figura 4. Mapa del vector TOPO TA 2.1	53
Figura 5. Mapa del vector pGEM-T Easy	53
Figura 6. Tinción de Gram.	61
Figura 7. RNA total de <i>N. brasiliensis</i>	62
Figura 8. Tratamiento con DNAsa.	63
Figura 9. Genes expresados diferencialmente después de adición de P ₄ al cultivo de <i>N.</i> <i>brasiliensis</i>	64
Figura 10. Genes expresados diferencialmente después de adición de DHT al cultivo de <i>N.</i> <i>brasiliensis</i>	65
Figura 11. Transformación.	66
Figura 12. Comprobación de la clonación por PCR.....	67
Figura 13. DNA purificado de <i>N. brasiliensis</i>	71
Figura 14. Amplificación del gen de superóxido dismutasa con 2.0 y 2.5 U de Taq.....	72
Figura 15. Curva de temperaturas de alineamiento y concentración de MgCl ₂ para la amplificación del gen de la superóxido dismutasa.....	73
Figura 16. Curva de temperaturas para el gen de tiorredoxina reductasa.....	73
Figura 17. Curva de temperatura para el gen de ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α	74
Figura 18. Curva de temperatura para el gen de la enzima ciclopropano ácido graso sintasa..	74
Figura 19. Amplificación de un segmento de 603 pb del rRNA 16S de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con P ₄	75
Figura 20. Amplificación de un segmento de 603 pb del rRNA 16S de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con DHT.....	76

Figura 21. Amplificación de un segmento de 630pb del gen de la enzima superóxido dismutasa de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con P ₄ .	77
Figura 22. Amplificación de un segmento de 630pb del gen de la enzima superóxido dismutasa de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con DHT.	78
Figura 23. Amplificación de un segmento de 301pb del gen de la enzima tiorredoxina reductasa de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con P ₄ .	79
Figura 24. Amplificación de un segmento de 301pb del gen de la enzima tiorredoxina reductasa de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con DHT.	80
Figura 25. Amplificación de un segmento de 281pb del gen de la enzima ciclopropano ácido graso sintasa de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con P ₄ .	81
Figura 26. Amplificación de un segmento de 281pb del gen de la enzima ciclopropano ácido graso sintasa de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con DHT.	82
Figura 27. Amplificación de un segmento de 528pb del gen de la enzima ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con P ₄ .	83
Figura 28. Amplificación de un segmento de 528pb del gen de la enzima ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α de <i>N. brasiliensis</i> cultivada con DHT.	84
Figura 29. Amplificación del gen de la enzima rRNA adenina (N6) metiltransferasa y del gen control (rRNA 16S).	85

LISTA DE ABREVIATURAS

P₄: progesterona

DHT: dihidrotestosterona

SOD: superóxido dismutasa

TrxB: tiorredoxina reductasa

Cyp: ciclopropano ácido graso sintasa

nrdA: ribonucleósido difosfato reductasa

TDM: trehalosa dimicolato

LH: hormona luteinizante

FSH: hormona folículo estimulante

HREs: elementos de respuesta a hormona

PR: receptor de progesterona

AR: receptor de andrógenos

ER: receptor de estrógenos

RESUMEN

Nocardia brasiliensis es una bacteria filamentososa Gram positiva, ampliamente distribuida en la naturaleza, que constituye el principal agente causal del actinomicetoma en México. El actinomicetoma es una enfermedad inflamatoria crónica, que afecta principalmente a hombres, en una proporción de 3:1. Anteriormente se creía que el predominio en hombres se debía principalmente a factores ocupacionales; sin embargo, algunos estudios han revelado que en ambientes donde no hay diferencia en la exposición al agente etiológico entre mujeres y hombres, los hombres siguen desarrollando la enfermedad en mayor proporción que las mujeres, lo que sugiere una resistencia natural de ellas a la enfermedad o mayor susceptibilidad de los hombres a desarrollarla.

Diversos estudios han reportado que algunas enfermedades infecciosas son más frecuentes en hombres que en mujeres. Esta susceptibilidad podría atribuirse a los esteroides sexuales, que desempeñan un papel diferencial en la modulación de la respuesta inmune entre hombres y mujeres, y que tienen un efecto sobre el crecimiento y la expresión genética de ciertos microorganismos. En el caso de *N. brasiliensis* un estudio previo demostró que el estradiol, la progesterona y la testosterona tienen efecto sobre el crecimiento de la bacteria *in vitro* o sobre el desarrollo del actinomicetoma experimental. Sin embargo, se desconoce el efecto que estas hormonas podrían tener sobre la expresión genética de esta bacteria. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar si la expresión genética de *Nocardia brasiliensis* es modificada ante la presencia de progesterona o dihidrotestosterona.

Por medio de RAP-PCR se estudió la expresión diferencial de genes de *N. brasiliensis* cuando fue cultivada en presencia de progesterona o dihidrotestosterona; se encontró que la expresión de 25 fragmentos se modificó en presencia de alguna de las dos hormonas. Veinte de estos fragmentos fueron exitosamente clonados y secuenciados. La mayor parte de las secuencias correspondieron a proteínas hipotéticas (13/20); mientras que siete secuencias mostraron homología con proteínas cuya función es conocida: un gen que codifica para la rRNA adenina-N6 metiltransferasa y un gen para la acil-CoA deshidrogenasa mostraron un aumento en la expresión al cultivar la bacteria en presencia de progesterona. Por otra parte, dos genes que codifican para la subunidad E1 de la piruvato

deshidrogenasa también mostraron un aumento en la expresión génica al cultivar la bacteria en presencia de dihidrotestosterona. Asimismo, tres genes cuyas secuencias presentaron 99% de identidad con el gen del rRNA 16S mostraron cambio en la expresión frente a la progesterona y dihidrotestosterona.

Adicionalmente se exploró el cambio en la expresión de algunos genes relacionados con virulencia, como los genes que codifican para las enzimas superóxido dismutasa, tiorredoxina reductasa, ciclopropano ácido graso sintasa y la subunidad α de la ribonucleósido difosfato reductasa, inducido por hormonas. Se observaron cambios en el gen de la superóxido dismutasa que mostró una disminución de su expresión a las 2 horas de incubación con progesterona; la subunidad α de la ribonucleósido difosfato reductasa también mostró cambios de expresión con ambas hormonas en todos los tiempos de incubación.

En conclusión, se observaron cambios en la expresión genética después de cultivar *N. brasiliensis* con progesterona y dihidrotestosterona. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar que dicho cambio en la expresión se deben específicamente al estímulo hormonal, y para conocer el papel que pudieran tener las proteínas codificadas en la fisiopatogenia del actinomicetoma.

ABSTRACT

Nocardia brasiliensis is an aerobic, grampositive, nonmotile, filamentous species of actinomycetes, widely distributed in nature. It is the main etiologic agent of actinomycetoma in México. The actinomycetoma is a chronic inflammatory disease and males are more likely affected than females with a ratio ranging approximately 3:1. Previously the predominance in men was thought mainly due to occupational factors; however, some studies have shown that in areas where there is no difference of exposure to organism between males and females, men develop the disease more often than women. This suggests that women have a natural resistance or males are more susceptible to the disease.

Several studies have shown that men are more susceptible to some infectious diseases than women. This susceptibility could be due to the role of sex steroids on immune response and/or to their effect on growth and gene expression of certain microorganisms. In the case of *N. brasiliensis*, one study showed that estradiol, progesterone and testosterone had effects on *in vitro* growth of bacterium or on the development of experimental actinomycetoma. Nevertheless, the effect of these hormones on gene expression of *N. brasiliensis* is unknown. The aim of this study was to determine if the gene expression of *N. brasiliensis* is modified in the presence of progesterone or dihydrotestosterone.

By RAP-PCR, the gene expression of *N. brasiliensis* was studied when this bacteria was grown in presence of progesterone and dihydrotestosterone. We found that 25 fragments changed their expression in presence of these hormones. Twenty of these fragments were successfully cloned and sequenced. Most of these sequences corresponded to hypothetical proteins (13/20); however seven sequences were homologous to proteins whose function is known: one gene coding for rRNA adenine-N6 methyltransferase and one gene coding for acyl-CoA dehydrogenase showed an augment in their expression after growing the bacterium in presence of progesterone. Two genes coding for pyruvate dehydrogenase subunit E1 showed an augment in their expression in presence of dihydrotestosterone. Also, three genes whose sequence has 99% of identity with the rRNA's 16S gene, showed a change in their expression with progesterone and dihydrotestosterone.

In addition, we explored the change in the expression induced by hormones of some genes related with virulence, like genes coding for superoxide dismutase, thioredoxin reductase, cyclopropane fatty acid synthase and ribonucleotide diphosphate reductase subunit alpha. We observed changes in the expression of superoxide dismutase gene, which was down-regulated at 2 hours of incubation with progesterone; the ribonucleotide diphosphate reductase subunit alpha changed its expression with both hormones in all times of incubation.

In conclusion, we observed changes in gene expression of *N. brasiliensis* growing in presence of progesterone and dyhydrotestosterone. However, more studies are required to confirm that the changes observed were due to hormonal stimulus, and to know the role that the corresponding proteins play in the physiopathogeny of the actinomycetoma.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Nocardia*

El género *Nocardia* fue descrito por primera vez en 1888 por Edmond Nocard, quien aisló un microorganismo filamentosos a partir de lesiones en ganado con farcinosis o muermo bovino. Posteriormente en 1889, Trevisan le dió el nombre de *Nocardia* a ese microorganismo en honor a Nocard y lo llamó *N. farcinica*. (1). Sin embargo, la clasificación taxonómica de este género ha resultado confusa debido a la heterogeneidad de sus especies y aun se encuentra en continuo cambio y evolución. De acuerdo con el manual de Bergey de bacteriología determinativa, el criterio quimiotaxonómico para clasificar una bacteria como perteneciente al género *Nocardia* incluye: 1) presencia de ácidos micólicos de 46 a 60 átomos de carbono, 2) ácido diaminopimélico, arabinosa y galactosa, 3) ácido tuberculoesterárico y ácidos grasos insaturados, 4) y presencia de menaquinona (2).

Las bacterias del género *Nocardia* son Gram positivas, aerobias, filamentosas de lento crecimiento y saprobias del suelo. Se clasifican dentro del orden Actinomycetales, suborden *Corynebacterineae* y están relacionadas con otros géneros de importancia médica como *Mycobacterium* y *Corynebacterium*.

Las especies del género *Nocardia* son consideradas patógenas oportunistas, algunas son importantes clínicamente ya que son causantes de nocardiosis y actinomicetoma.

El actinomicetoma es una patología que afecta la piel, el tejido subcutáneo y en ocasiones el hueso. En México, como en otros países endémicos, afecta particularmente a hombres (en una proporción de 3 hombres por 1 mujer), que se dedican a la agricultura. Por motivos socioeconómicos y culturales, la enfermedad progresa hacia la cronicidad causando gran discapacidad en el paciente. En México se han registrado alrededor de tres mil casos, y la mayoría de ellos son causados por *N. brasiliensis* (3). Hasta hace algunos años se conocía poco sobre la fisiopatogenia de esta enfermedad, pero el interés por comprender diversos aspectos relacionados tanto del hospedero como de los agentes infecciosos, ha crecido en los últimos años.

La nocardiosis afecta principalmente a personas con alguna condición inmunosupresora como linfoma, SIDA, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o trasplantados. El órgano mayormente comprometido es el pulmón, sin embargo las formas extrapulmonares de la enfermedad son relativamente frecuentes y el sistema nervioso central es la localización más comúnmente afectada (>44%) (4).

1.2 Nocardia brasiliensis

Nocardia brasiliensis es considerado el principal agente etiológico del actinomicetoma en México y en otros países tropicales y subtropicales como Venezuela, Argentina y Colombia. (5). En México constituye el agente causal de alrededor del 66% de los casos reportados (3).

1.3 Características morfológicas

Macroscópicamente, las colonias de *N. brasiliensis* presentan tonalidades amarillentas, amarillo-anaranjadas o marrones; se caracterizan por tener pocos filamentos aéreos y un aspecto rugoso, coráceo o aterciopelado. Algunas cepas pueden producir pigmentos solubles similares a melanina que difunden al medio y varían de color ámbar a marrón (1). *N. brasiliensis* crece bien en medios convencionales como agar BHI (Brain-Heart Infusion), agar dextrosa sabouraud, agar sangre y agar tripticasa. En medio sólido las colonias crecen sobre la superficie y penetran el agar.

Microscópicamente, se caracteriza por ser un bacilo que forma desde filamentos sencillos hasta muy ramificados con diámetros de 0.5-1.2 μm ; es Gram positivo y en tinciones de Ziehl-Neelsen muestra ser una bacteria parcialmente ácido alcohol resistente. Esta propiedad la confiere la pared celular, la cual comparte algunas características con bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*: el peptidoglicano está unido a la arabinosa del polímero de arabinogalactano por un enlace fosfodiéster y algunos residuos de arabinosa están esterificados a un ácido micólico formando el complejo peptidoglicano-arabinogalactano-

micolato. A diferencia de otras bacterias Gram positivas, su pared carece de ácidos teicoicos. (1). La presencia de ácidos micólicos en la pared, le confiere la propiedad de ser resistente a la decoloración con alcohol ácido. El procedimiento clásico de tinción (Ziehl-Neelsen) incluye un paso de calentamiento que permite que el colorante atraviese la pared celular rica en lípidos. Al suspender el calentamiento los lípidos se solidifican e impiden la salida del colorante, haciéndolas resistentes a la decoloración (6).

1.4 Características generales del genoma de *N. brasiliensis*

N. brasiliensis tiene un genoma de 9.436.348 pb con un contenido de G+C de 68%. Se han predicho 8414 secuencias que codifican para proteínas, dentro de las cuales predominan las proteínas hipotéticas (5745/8414). (7).

Su genoma es de mayor tamaño que el de otros microorganismos patógenos como *M. tuberculosis* H37RV que tiene un genoma de 3.7 Mb y *M. leprae* TN cuyo genoma es de 3.27 Mb. Se ha observado que en la naturaleza los microorganismos patógenos que están más adaptados a los humanos poseen genomas más pequeños, ya que han eliminado los genes que no son utilizados en su estilo de vida parasítico. En contraste, los microorganismos ubicuos del ambiente tienen genomas más grandes que los patógenos, ya que deben adaptarse a las condiciones ambientales en las que están. Por esta razón algunos autores han sugerido que *N. brasiliensis* no es un patógeno humano especializado; por el contrario, es una bacteria que vive en el suelo y que ocasionalmente afecta humanos. (7).

Dentro de su genoma, *N. brasiliensis* contiene diversos genes que codifican para factores de virulencia, que favorecen su supervivencia dentro del hospedero, entre los que se encuentran: 5 genes para catalasa, 2 para superóxido dismutasa, 5 para fosfolipasa C, 4 para hemolisinas, 1 gen para invasina, 33 genes organizados en 6 operones que codifican para proteínas de entrada a células de mamífero (mce) y 58 que codifican para citocromo P450. Además, tiene otros genes que codifican para proteasas, quitinasas y otras proteínas que permiten el procesamiento de algunos materiales del ambiente (7).

1.5 Funciones de los factores de virulencia

1. Catalasa: cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno generado por los fagocitos en oxígeno y agua. Ayuda a la bacteria a protegerse de la respuesta oxidativa generada por el hospedero.
2. Superóxido dismutasa (SOD): cataliza la conversión del superóxido generado durante el estrés oxidativo por los fagocitos, en oxígeno y peróxido de hidrógeno.

Tanto la catalasa como la superóxido dismutasa, fueron reconocidas tempranamente como factores de virulencia en el género *Nocardia*. Un estudio realizado en 1985 demostró la importancia de estas enzimas en la resistencia de *N. asteroides* frente a las acciones microbicidas de los PMN humanos. Se encontró que los aislados menos virulentos no secretan SOD al medio de cultivo, y que los niveles de ambas enzimas dependen de la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria. (8)

3. Tiorredoxina reductasa: es un sistema antioxidante importante frente a la defensa del estrés oxidativo. Provee los electrones necesarios a partir de tioles para remover especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno con una alta tasa de reacción. Se ha descrito en algunas bacterias patógenas como *Helicobacter pylori*, *M. tuberculosis* y *Staphylococcus aureus*. (9). *N. brasiliensis* también tiene genes que codifican para esta enzima, sugiriendo su papel en la defensa contra el estrés oxidativo.
4. Hemolisinas: En 1986 se demostró por primera vez la presencia de hemolisinas en bacterias ácido alcohol resistentes como *N. asteroides*. (10). Son proteínas tóxicas que producen la lisis de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, consideradas importantes en procesos de diseminación.
5. Trehalosa dimicolato (TDM): también conocido como “factor cuerda”, es un glucolípido de pared encontrado en géneros como *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*, el cual consiste en una trehalosa esterificada con dos residuos de ácidos micólicos. Es tóxico para la mitocondria, inhibe la fusión del fagosoma con el lisosoma (11), altera la migración leucocitaria, induce la formación de granulomas e inhibe la fusión de membranas dependiente de calcio.

(1), reduce la efectividad de los antibióticos e inhibe la estimulación de la respuesta inmune protectora del hospedero (12). Constituye el 90 a 95% de los lípidos extraídos de *M. tuberculosis* y es también uno de los componentes más abundantes de la pared de *N. brasiliensis*. En varios estudios se ha demostrado que la TDM es capaz de inhibir algunos mecanismos microbicidas empleados por los macrófagos, disminuye la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y de algunas moléculas coestimuladoras de linfocitos T como CD40, CD80 y CD86 (13, 14). En el caso de la infección causada por *N. brasiliensis*, se ha reportado que los lípidos asociados a la pared de la misma, incluyendo TDM, están implicados en el desarrollo del actinomicetoma primario por inducir una fuerte respuesta inflamatoria e inhibir algunos efectos microbicidas de los macrófagos y de las células dendríticas (14).

6. “Mammalian cell entry protein (mce)”: son un grupo de proteínas que están estrechamente relacionadas con la invasión y prolongada supervivencia del microorganismo dentro de los macrófagos del hospedero. Su importancia fue primeramente demostrada por la transferencia del gen *Mce1* de *M. tuberculosis* a *E. coli*, lo cual le dio la habilidad a esta última de entrar a los macrófagos sin ser procesada previamente. El genoma de *M. tuberculosis* contiene cuatro operones mce, que están relacionados con virulencia y con otras funciones como transportadores de lípidos y reguladores de la respuesta inmune del hospedero. Se cree que la expresión de los operones mce puede estar regulada por condiciones ambientales, estado nutricional o situaciones de estrés. (15). Por su parte, *N. brasiliensis* HUJEG-1 posee 33 genes que codifican para proteínas mce, organizados en seis operones. (7)
7. La sobrevivencia de la bacteria dentro de los macrófagos en un estado celular alterado (Formas L) se ha relacionado con la latencia y la recurrencia de la enfermedad. (16)

1.6 Espectro Clínico: Actinomicetoma

El actinomicetoma es una enfermedad granulomatosa crónica, más frecuente en hombres que en mujeres, que se localiza principalmente en las extremidades y se caracteriza por aumento de volumen del área afectada, formación de tractos sinuosos y secreción de granos a través de dichos tractos. (17).

Aspectos epidemiológicos

El actinomicetoma es una enfermedad endémica en varias regiones tropicales y subtropicales del mundo; la mayor incidencia ocurre en Asia, India, Yemen, Pakistán y África. También está presente en muchos países del continente americano con mayor número de casos reportados en México y Venezuela. (18)

En México, *Nocardia brasiliensis* es considerado el principal agente etiológico del actinomicetoma, constituyendo el 66% de los casos (3). Afecta principalmente a hombres en una proporción de 3:1, en edades entre 16 a 50 años, que trabajan en el campo. El área corporal más afectada son las extremidades inferiores (60%), seguida del tronco (19%) y otras partes del cuerpo. La mayoría de los estados de la República Mexicana han reportado casos de actinomicetoma (24 de 31 estados), siendo Jalisco el estado con mayor número.

Patogénesis y manifestaciones clínicas

El actinomicetoma inicia con la inoculación traumática del microorganismo en la piel a través de espinas o astillas. Después de la inoculación, se desarrolla tumefacción en la zona afectada, con aparición de nódulos que evolucionan hasta formar microabscesos los cuales drenan hacia el exterior un exudado purulento que contiene gránulos formados por el microorganismo infectante. Las lesiones suelen ser indoloras y en algunos casos pueden llegar a diseminarse hasta zonas adyacentes al hueso dando lugar a osteomielitis, deformación del tejido óseo y destrucción total del hueso (5).

Los sitios anatómicos primariamente afectados son aquéllos que están expuestos al ambiente y por lo tanto son más susceptibles a la inoculación traumática, por ejemplo las extremidades superiores e inferiores que constituyen el 82% de los casos (19); otras partes

del cuerpo también pueden ser afectadas, como la espalda, el cuello, la cabeza, entre otras (17, 19).

La diseminación hematológica y/o linfática del microorganismo a sitios distantes del lugar primario de inoculación es rara, sin embargo existen casos reportados en la literatura, y dependerá de la condición inmunológica del hospedero.

Diagnóstico de laboratorio

Una vez establecida la sospecha clínica de actinomicetoma, se deben realizar diversos estudios de laboratorio que ayuden a identificar el agente etiológico de la enfermedad y por lo tanto una guía para el tratamiento del paciente.

El diagnóstico de laboratorio inicia con la realización de un examen en fresco y el estudio histopatológico del tejido afectado; posteriormente se realiza cultivo y pruebas bioquímicas para identificar con precisión el agente causal. También se recomienda realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos para optimizar el resultado del tratamiento. En caso de que no sea posible identificar el agente etiológico a través de métodos convencionales de laboratorio, es recomendable realizar procedimientos moleculares (20).

Examen microscópico en fresco: este procedimiento es utilizado para definir la naturaleza del agente etiológico. Consiste en la observación microscópica de los granos en un portaobjetos con KOH al 10%. En general los granos de *Nocardia* se caracterizan por ser pequeños (50-150µm) de color blanco a blanco amarillento, los cuales presentan filamentos finos localizados en la periferia (17).

Estudio histopatológico: este estudio es útil para confirmar el diagnóstico clínico de micetoma y diferenciar la mayoría de los micetomas de etiología bacteriana. La tinción de hematoxilina-eosina es suficiente para localizar los granos, rodeados de un proceso inflamatorio intenso limitado por tejido fibroso. Los granos se encuentran en el centro de un absceso rodeados de un gran acúmulo de neutrófilos. Alrededor del absceso hay un área densa de fibrosis y tejido de granulación rico en capilares, células epitelioides, macrófagos y células gigantes multinucleadas. Los granos de *Nocardia* se tiñen con hematoxilina en la periferia y con eosina en la parte central (21).

Cultivo: se recomienda realizar este estudio en medios convencionales como agar dextrosa saboraud o agar BHI. Después de varios días de incubación (8-15 días), se realizan tinciones como Gram y Ziehl-Neelsen para visualizar la morfología microscópica del microorganismo. Sin embargo es necesaria la realización de pruebas bioquímicas para la diferenciación de especies, algunas de las cuales se muestran en la tabla 1(20).

Tabla 1. Pruebas para identificación de *N. brasiliensis*

**Pruebas bioquímicas para la identificación de
*Nocardia brasiliensis***

Prueba	Resultado
Hidrólisis de caseína	Positivo
Hipoxantina	Positivo
Tirosina	Positivo
Xantina	Negativo
Hidrólisis de la urea	Positivo
Reducción de nitratos	Positivo

Tomado de Brown-Elliott, Brown et al. 2006

Procedimientos moleculares: éstas técnicas han sido desarrolladas para la identificación rápida de los microorganismos. En el caso de la identificación de *Nocardia* dos locus han sido el blanco de amplificación por PCR: el gen hsp65, que codifica para la proteína de choque térmico de 65KDa, y el gen 16S rRNA. (20). La identificación a nivel de especie es realizada a través de análisis bioinformáticos posterior a la secuenciación parcial o completa de los genes mencionados anteriormente.

Pruebas inmunológicas: un ensayo de ELISA es utilizado para detectar anticuerpos contra antígenos de 24 y 26 kDa de *N. brasiliensis*. Ha sido usado para confirmar la infección producida por este microorganismo y para evaluar la evolución terapéutica (18, 22).

Tratamiento

El tratamiento de elección para casos de actinomicetoma no complicado es trimetoprim-sulfametoxazol (8/40 mg/kg/día) por 6 meses a 2 años. En caso de existir resistencia y falta

de respuesta al tratamiento se usa amoxicilina-ácido clavulánico (1,5 g/día) por un periodo de 6 meses. Sin embargo, para aquéllos casos en los cuales los pacientes no responden a las terapias previas, o presentan lesiones localizadas en tórax, cuello o cabeza, se han utilizado tratamientos donde se combina amikacina por 3 semanas y trimetoprim-sulfametoxazol por 5 semanas, por un periodo total de 5 a 20 semanas, con el cual se ha observado buena respuesta. Cuando haya resistencia a amikacina, se puede cambiar a netilmicina. Recientes estudios demuestran que otros antibióticos como imipenem, meropenem, rifampicina y linezolid, también pueden ser utilizados en el tratamiento del actinomicetoma (18).

2 GENERALIDADES HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES

Las hormonas son sustancias químicas producidas por glándulas endocrinas que regulan la función de sus células blanco. Pueden ser de naturaleza proteica o esteroide y algunos autores las han clasificado en cinco grupos: 1) derivadas de aminoácidos, 2) neuropéptidos pequeños, 3) grandes proteínas, 4) hormonas esteroides y 5) derivados de vitaminas. (23)

Las hormonas esteroides son moléculas lipofílicas usadas como mensajeros químicos entre varios tejidos. En los vertebrados, actúan en un amplio rango de tejidos e influyen en muchos aspectos de la biología incluyendo la diferenciación sexual, la fisiología de la reproducción y algunos aspectos metabólicos. Los principales sitios de síntesis y secreción de hormonas esteroides incluyen los ovarios, los testículos, las glándulas adrenales y la placenta (24).

Las hormonas esteroides sexuales incluyen estrógenos, progesterona y andrógenos y han sido definidas por su papel en la función reproductiva normal. En mamíferos son producidas principalmente por los ovarios y los testículos a partir del colesterol. Sin embargo, también pueden ser producidas localmente por conversión en tejidos periféricos tales como el hígado o tejido adiposo (23).

2.1 Síntesis de las hormonas esteroides sexuales

Las hormonas esteroides son derivadas del colesterol y son sintetizadas por deshidrogenasas y enzimas citocromo P450, que catalizan reacciones de hidroxilación, deshidroxilación y oxidación.

La conversión de colesterol a pregnenolona constituye el primer paso en la biosíntesis de las hormonas sexuales, y es catalizada por la enzima citocromo p450 para el rompimiento de la cadena lateral del colesterol (cytP450_{scc}) (24). Dependiendo del tipo de célula que participa en la síntesis, la pregnenolona es convertida a testosterona, progesterona o estradiol.

En vertebrados, la síntesis y secreción de hormonas esteroideas es regulada por hormonas hipofisarias como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH).

2.1.1 Testosterona (T)

La T es el principal andrógeno circulante en hombres; su principal fuente de producción son los testículos. Sin embargo, las glándulas suprarrenales proveen pequeñas cantidades por síntesis directa, o por conversión en tejidos periféricos, de otros productos como androstenediona, dehidroepiandrosterona y dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) a T (23).

En los testículos, la T es sintetizada por la células de Leydig bajo el control de la hormona luteinizante (LH) producida por la hipófisis. Es transportada en sangre unida a proteínas como la albúmina y la globulina de unión a testosterona. Sólo la fracción de la hormona que se encuentra libre es la que ejerce el efecto sobre las células. Alrededor del 7% de la T es reducida a dihidrotestosterona (DHT) por la 5α -reductasa. La DHT tiene mayor afinidad por el receptor de andrógenos que la T y por lo tanto, mayor actividad biológica (23).

El paso limitante de la velocidad de síntesis de T es el aporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna. Después del transporte de colesterol hacia la mitocondria, el desdoblamiento de la cadena lateral por $\text{cytP450}_{\text{scc}}$ da lugar a la formación de pregnenolona. A partir de aquí, y por varias reacciones enzimáticas catalizadas por enzimas como 17α -hidroxilasa, $17,20$ -liasa y deshidrogenasa 3 de 17β -hidroxiesteroide, se forma la T (23).

Por su parte la T se une al receptor de andrógenos (AR), para ejercer su función sobre los tejidos blanco. Después de la unión de la T al AR, este complejo regula la transcripción de genes por unión a los elementos de respuesta a hormonas (HREs) en la vecindad del gen regulado, o actúa regulando directamente los factores de transcripción (25).

En general la T es responsable del desarrollo de los genitales externos en la pubertad, el cambio del tono de voz y desarrollo del músculo esquelético. (25)

2.1.2 Estrógenos (E₂)

Los estrógenos son sintetizados y secretados primariamente por folículos maduros y cuerpo lúteo en los ovarios, y por la placenta durante el embarazo. El principal estrógeno sintetizado es el 17β- estradiol. La síntesis de E₂ al igual que para T, inicia a partir de la conversión del colesterol a pregnenolona. El estradiol es sintetizado por las células de la granulosa a partir de la aromatización de los andrógenos (sintetizados en las células de la teca) por la enzima aromatasa o CYP19. Su síntesis es controlada por la hormona folículo estimulante (FSH) y la LH.

El mecanismo de acción clásico de los E₂ en los tejidos blanco es semejante al de las otras hormonas esteroides; inicia con la unión al receptor nuclear de estrógenos (ER), que conlleva a la regulación de la transcripción genética. (26)

Las principales funciones de los E₂ están relacionadas con el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en la mujer, el crecimiento uterino, engrosamiento de la mucosa vaginal, disminución de la viscosidad del moco cervical y el desarrollo del sistema de conductos mamarios. (23)

2.1.3 Progesterona (P₄)

La P₄ es secretada principalmente por el cuerpo lúteo, y la placenta durante el embarazo. Su síntesis está controlada por LH. Al igual que las otras hormonas esteroides, deriva del colesterol; después de que el colesterol es convertido a pregnenolona, ésta es convertida a progesterona por medio de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

La P₄ también ejerce su función a través de receptores nucleares de progesterona (PR), que como otros receptores de hormonas esteroides, regulan la transcripción mediante su unión a HREs en promotores de genes regulados por PR y conllevan al inicio de la transcripción de genes específicos en los tejidos blanco. (27)

La P₄ actúa en la segunda fase del ciclo menstrual regulando los cambios del endometrio, preparándolo para la implantación del embrión. (23)

2.2 Mecanismo de acción de las hormonas esteroides sexuales

2.2.1 Mecanismos genómicos

El mecanismo de acción clásico de las hormonas esteroides implica la interacción de la hormona con el receptor específico, que pertenece a un grupo de receptores intracelulares, que al unirse con el ligando induce la transcripción de genes, que se traducen a proteínas, las cuales participan en funciones celulares específicas (23).

En ausencia de hormonas, los receptores de estrógenos y de progesterona están localizados principalmente en el núcleo, y el receptor de andrógenos en el citoplasma. Las hormonas se mueven pasivamente a través de las membranas, se unen y activan a los receptores nucleares. Este complejo receptor activado-ligando a su vez, se une a proteínas correguladoras, y finalmente todo el complejo se une a secuencias específicas de DNA, denominadas elementos de respuesta a hormonas (HREs), las cuales están asociadas con regiones promotoras involucradas en la regulación de la transcripción génica (24).

2.2.2 Receptores

Los receptores nucleares de hormonas esteroides sexuales se caracterizan por tener una estructura modular con diferentes dominios funcionales. Están organizados en seis regiones: la región N-terminal que contiene la función de activación (AF-1); una región media que contiene el dominio de unión al DNA (DBD), seguido de la región de bisagra, y otra, de unión al ligando (LBD) que está contenida en el C-terminal, junto con el dominio de activación 2 (AF-2) (figura 1). La función de cada receptor es modulada por la interacción de agonistas, antagonistas y diversas proteínas que permiten la activación o represión transcripcional de ciertos genes (28).

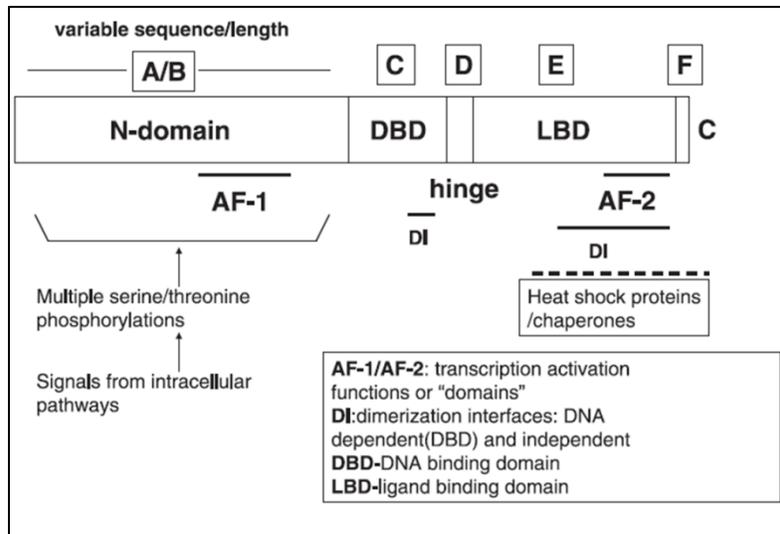


Figura 1. Estructura general del receptor nuclear de hormonas esteroides sexuales. Tomado de Wierman 2007.

Se han descrito dos isoformas de receptor para estrógenos ERs ($ER\alpha$ y $ER\beta$), dos para progesterona PRs (PRA y PRB) y un receptor de andrógenos AR.

En el caso del ER, se ha visto que el dominio LBD contiene 251 aminoácidos en la isoforma $ER\alpha$ y 245 en $ER\beta$. Este dominio forma un bolsillo hidrofóbico que exhibe alta afinidad y especificidad por el estradiol. La unión de los estrógenos a este receptor, produce un cambio conformacional, que permite el reclutamiento de correguladores transcripcionales que conllevan a la activación o inhibición de la transcripción de los genes blanco (24, 26).

El AR contiene una región N-terminal de 555 aminoácidos, los cuales forman más de la mitad de la proteína (25). En estado inactivo, es encontrado en el citoplasma unido a proteínas de choque térmico. Después de la unión de hormonas como T o DHT al dominio LBD del receptor, el complejo receptor-ligando, se transloca al núcleo, favorecido por una señal de localización nuclear que se encuentra flanqueado la región de unión a DNA (DBD) y la región de bisagra. Posteriormente, el receptor une al DNA, e inicia el proceso de regulación de la transcripción (29).

Las isoformas del PR se diferencian en que PRB contiene 164 aminoácidos adicionales en la región N-terminal, con respecto a PRA. El receptor inactivo puede encontrarse en el citoplasma o en el núcleo. En el primer caso y en ausencia de progestinas, se encuentra unido a proteínas de choque térmico; una vez el ligando se une al receptor, éste se dimeriza y se transloca al núcleo; posteriormente reconoce los PREs sobre el DNA y da inicio a la regulación de la transcripción (27).

Por otra parte, se ha descrito la presencia de receptores de membrana para las hormonas esteroides. Algunos estudios han mostrado que los receptores de membrana por ejemplo para estrógenos, aislados de cáncer de mama, son idénticos al receptor nuclear ER α . Asimismo, se han reportado receptores acoplados a proteínas G, y otros receptores putativos (30).

2.2.3 Mecanismos de acción no genómicos

Además de los mecanismos genómicos clásicos de acción de las hormonas esteroides sexuales, los cuales ejercen sus efectos sobre el tejido blanco en varios minutos u horas, también se ha observado que estas hormonas son capaces de inducir respuestas rápidas, en segundos o minutos después de su administración. Los mecanismos de acción no genómicos resultan en la rápida activación de moléculas que participan en la señalización celular como MAPKs, adenil ciclasa, proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC) (24). Estos mecanismos de acción son insensibles a la inhibición por antagonistas o inhibidores de la transcripción, por lo cual son considerados no genómicos.

Los mecanismos de acción no genómicos, se clasifican en mecanismos que involucran receptores de membrana y por tanto llevan a cabo su función a través de cascadas de señalización que por último alteran la función celular; o en aquéllos que no involucran la participación de receptores y que alteran las propiedades fisicoquímicas de la membrana como la fluidez (28, 31).

3 ANTECEDENTES

Anteriormente se creía que el predominio de algunas enfermedades en hombres estaba únicamente relacionado con factores ocupacionales debido a que los hombres quienes desarrollan actividades en el campo están más en contacto con aquellos microorganismos que se encuentran en el suelo y por lo tanto tienen mayor riesgo de contraer infección. Sin embargo, diversos estudios clínicos y epidemiológicos han mostrado que los hombres son más susceptibles a sufrir infecciones por diferentes microorganismos, debida en parte al efecto que ejercen algunas hormonas sexuales sobre la respuesta inmune del hospedero y sobre el crecimiento, metabolismo y virulencia de los microorganismos.

3.1 Hormonas sexuales esteroides y la regulación de la respuesta inmune

Algunos estudios han demostrado la relación de las hormonas sexuales sobre las diferencias en la susceptibilidad a diversas infecciones causadas por hongos, bacterias, parásitos y virus, entre hombres y mujeres. Se cree que estas diferencias se deben a una interacción entre las hormonas y la respuesta inmune. En general, se estima que los hombres (y machos de otras especies) son más susceptibles a infecciones que las mujeres (y hembras) y se atribuye la diferencia tanto a andrógenos como a estrógenos, los cuales pueden modular diversos aspectos de la inmunidad del huésped. (32)

Los hombres son más susceptibles que las mujeres a disentería, gonorrea, meningitis, neumonía, rabia, sífilis, tétanos, entre otros. Estudios de laboratorio en ratones han demostrado que incluso bajo condiciones controladas de exposición, los machos siguen siendo más susceptibles a infecciones causadas por parásitos, hongos, bacterias y virus que las hembras. (32)

Se ha observado que ratones gonadectomizados muestran mejor respuesta inmune y por lo tanto son más resistentes a las infecciones por protozoarios comparados con aquellos con las gónadas intactas (32). Por otro lado, se ha detectado que los ratones machos infectados con *Candida albicans* tienen menor respuesta de anticuerpos que las hembras, y cuando son

gonadectomizados muestran niveles de anticuerpos similares a los de éstas últimas, lo que sugiere una supresión de la respuesta inmune mediada por testosterona. También, se ha visto la resistencia a infecciones directamente relacionadas con el nivel de estrógenos como la paracoccidiodomicosis, candidosis, y leishmaniasis. En general, en aquellas fases del ciclo menstrual donde la concentración de estrógenos es mayor (como la fase folicular), se reduce la susceptibilidad a dichas infecciones, mientras que en la fase lútea (baja concentración de estrógenos) la respuesta inmune de hombres y mujeres frente a estas infecciones es comparable. Lo anterior sugiere que los estrógenos participan en un aumento de la respuesta inmune humoral y celular y por lo tanto disminuye la tasa de infección generada por ciertos microorganismos (32).

Se han identificado receptores de andrógenos sobre varios tejidos linfoides como el timo, médula ósea, bazo, y en células como los macrófagos. Se ha reportado que la testosterona reduce la actividad de las células NK en ratones y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, mientras que incrementa la síntesis de citocinas anti-inflamatorias. También disminuye la expresión de TLR-4, el cual pertenece a la familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y por lo tanto están involucrados en la activación de la respuesta inmune innata (33).

También se han identificado receptores de estrógenos en diferentes tejidos linfoides y células de la respuesta inmune. Los estrógenos pueden aumentar la respuesta inmune adaptativa mediante el aumento de la citotoxicidad de las células NK y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (33).

Los receptores de progesterona se han encontrado en células epiteliales, granulocitos, mastocitos, linfocitos y macrófagos. La progesterona es una hormona reconocida como inmunosupresora debido a que reduce la actividad de los macrófagos, células NK y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. (33)

3.2 Efecto de las hormonas esteroides sexuales sobre algunas infecciones micóticas y sus agentes causales

Datos derivados de varios estudios han puesto en evidencia que algunas enfermedades infecciosas producidas por hongos son más frecuentes en hombres que en mujeres. Entre estas micosis se encuentra la coccidioidomicosis, que tiene mayor predilección por los hombres; sin embargo, las mujeres embarazadas tienen mayor tendencia a desarrollar enfermedad diseminada (34). La paracoccidioidomicosis tiene una marcada predilección por los hombres, cuya proporción varía entre reportes y países de 10:1 hasta 100:0 (35-37). Por otro lado, la forma verrugosa de la cromoblastomicosis infecta principalmente a hombres en una relación de hombre a mujer de 4:1. (38)

En 1981 Drutz y cols reportaron el efecto de la progesterona, testosterona y 17β -estradiol sobre el crecimiento de *Coccidioides immitis* y su relación con la diseminación de la enfermedad en hombres y mujeres embarazadas. Encontraron que en todos los casos después de exponer el hongo a las diferentes hormonas, se favoreció el crecimiento de la fase parasítica del mismo (39). Powell y cols demostraron la presencia de proteínas que unen E_2 y P_4 en el citosol de *C. immitis*, y lo relacionaron con la mayor susceptibilidad de las mujeres embarazadas a sufrir una coccidioidomicosis más severa y diseminada (34).

Por otro lado, Restrepo y cols demostraron que los E_2 inhiben la conversión de micelio a levadura en *Paracoccidioides brasiliensis* y se detectó la presencia de proteínas de unión a E_2 (40-42).

Méndez-Tovar y cols demostraron el efecto inhibitorio de la P_4 sobre el crecimiento *in vitro* de agentes etiológicos del eumicetoma como *M. mycetomatis* y *P. romeroi* (43).

Hernández-Hernández y cols estudiaron el efecto de P_4 , E_2 y T sobre *Phialophora verrucosa* *in vitro*, un agente etiológico de la cromoblastomicosis. Encontraron que tanto P_4 como T inhibieron el crecimiento del hongo. También demostraron la presencia de sitios de unión a P_4 en el citosol de *P. verrucosa*, los cuales podrían mediar el efecto de esta hormona sobre el crecimiento del hongo. (38).

En un estudio realizado por González-Velázquez y cols se demostró que la progesterona inhibe tanto la fase micelial como la fase parasitaria de *Sporothrix schenkii* (44).

Algunos autores han reportado la relación de diversas hormonas sexuales y las dermatofitosis producidas por *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *M. canis* (45-47). También se ha reportado la presencia de proteínas de unión a P₄ en otros hongos como *Trichophyton* y *Microsporum* y su relación con la inhibición del crecimiento de los dermatofitos. (46).

Candida albicans es la levadura responsable de la mayoría de los casos de candidiasis vaginal. Esta infección puede presentarse en mujeres inmunocompetentes e inmunosuprimidas. Entre los factores de riesgo se encuentra el uso de anticonceptivos orales o terapia de remplazo hormonal con estrógenos. Se ha evidenciado que los E₂ pueden afectar la respuesta inmune del hospedero y modifican el crecimiento y/o la virulencia del patógeno. Diversos estudios han mostrado un aumento tanto del crecimiento como de la expresión de genes después de exponer a la levadura a diversas concentraciones de 17β-estradiol (48). Se ha visto que la adición de E₂ a *C. albicans* aumenta la formación y longitud del tubo germinal y la expresión de genes como *CDRI*, el cual está relacionado con la resistencia a drogas antifúngicas, y actúa como una bomba de eflujo de los medicamentos. (48-50). También se ha reportado la presencia de una proteína de unión a E₂ en *C. albicans*, la cual tiene actividad de oxidoreductasa; se encuentra localizada en vacuolas y es inhibida débilmente por 17β-estradiol (48, 51, 52).

3.3 Efecto de las hormonas esteroides sexuales sobre algunas infecciones bacterianas y sus agentes causales

Diversos estudios han demostrado que las hormonas esteroides ejercen un efecto sobre el crecimiento y metabolismo de algunas bacterias patógenas. Morse y Fitzgerald reportaron el efecto de P₄ sobre *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. (53). En ambos casos se observó una disminución de la tasa de crecimiento dependiente de la concentración de hormona agregada al medio de cultivo. Sin embargo, un estudio más reciente demostró que P₄ promueve la infección de *N. gonorrhoeae* en las células epiteliales cervicales y aumenta su supervivencia en las mismas. (54).

Yotis y Stanke, también reportaron el efecto de P₄ sobre el crecimiento de distintas especies de *Staphylococcus spp* y otras bacterias Gram positivas y Gram negativas. (55).

Las infecciones producidas por micobacterias son más frecuentes en hombres que en mujeres. En el caso de *M. tuberculosis* la relación de hombre a mujer infectado es de 2:1, y se cree que en parte esta mayor susceptibilidad de los hombres es debida al efecto que ejercen las hormonas sexuales sobre la respuesta inmune a dicha infección (56).

Un estudio realizado por Hosoda y cols, mostró que la progesterona inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori*, y sugieren que esta hormona probablemente tiene un sitio de unión común con el colesterol en la superficie bacteriana, ya que el colesterol libre anula el efecto de P₄ cuando está presente junto con la hormona (57).

Por otro lado, se ha evidenciado el papel de E₂ sobre infecciones producidas por *Coxiella burnetii*, el agente etiológico de la fiebre Q. A pesar de que la seroprevalencia es igual en hombres que en mujeres, los hombres presentan con mayor frecuencia la enfermedad sintomática. En un estudio realizado por Leone y cols, se mostró que ratones machos infectados con *C. burnetti* tenían mayor carga bacteriana y mayor número de granulomas en el bazo que las hembras. Por su parte, las hembras ovariectomizadas mostraron niveles de carga bacteriana y granulomas similares a los machos. Cuando éstas últimas fueron tratadas con estradiol la infección se redujo, lo que sugiere el papel protector de los E₂ frente a dicha infección (58).

Amirshahi y cols, reportaron el efecto de E₂ y P₄ sobre la expresión genética de *Chlamydia trachomatis*. Encontraron que ambas hormonas modifican la expresión de alrededor del 25% de los genes del microorganismo, y que los genes que sufren modificación están predominantemente relacionados con el metabolismo energético (59).

También se ha reportado el efecto de las hormonas en infecciones más prevalentes en mujeres que en hombres, por ejemplo la neumonía producida por *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha observado que la administración de estradiol a machos con neumonía por *P. aeruginosa* induce una inflamación más severa del tejido pulmonar. (60).

Otro ejemplo es la mayor susceptibilidad de las mujeres a sufrir infección por *Listeria monocytogenes* durante el embarazo, estado en que los niveles de E₂ y P₄ están aumentados. (33). También se ha reportado el efecto diferencial de las hormonas sexuales y su posible asociación sobre el desarrollo de enfermedades de la cavidad bucal como la caries, las cuales suelen ser más frecuentes en mujeres. (61)

Asimismo, se han detectado proteínas de unión a hormonas sexuales esteroides similar a receptores en algunas bacterias: proteínas de unión a P₄ en *Streptomyces hydrogenans* y *P. aeruginosa* (62, 63) y proteínas de unión a estrógenos en *P. aeruginosa* (64).

Comamonas testosteroni expresa genes en respuesta a esteroides incluyendo algunos que funcionan como receptores, y otras proteínas que le permiten su adaptación al ambiente. (33)

3.4 Efecto de las hormonas esteroides sexuales el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Nocardia brasiliensis*

Varios estudios epidemiológicos han mostrado la mayor prevalencia del actinomicetoma producido por *N. brasiliensis* en hombres (2, 3, 17-19, 65, 66).

Lavalle, hace énfasis en que la mayor incidencia del actinomicetoma en hombres respecto a las mujeres, podría deberse a un “factor de resistencia antimicetoma ligado al sexo”. Plantea que esa resistencia esta posiblemente relacionada con las hormonas sexuales. En este trabajo se menciona el caso de una joven de 21 años, que durante tres años había presentado una lesión pequeña de actinomicetoma y que no se desarrolló hasta su primer embarazo. Después del parto se le administró tratamiento y la recuperación fue notoria. Sin embargo, sobrevino un segundo embarazo y con él una recaída del micetoma. También reporta el caso de una mujer joven muy prolífica que acudía siempre a consulta con cada embarazo por el empeoramiento de su micetoma. Un tercer caso citado por el autor incluye el de un paciente que presentó micetoma a los dos años de edad, el cual se resolvió sin necesidad de tratamiento; pero en la pubertad presentó un nuevo micetoma que crecía con rapidez. En todos los casos mencionados el agente aislado fue *N. brasiliensis*. (67)

En un estudio más reciente realizado por Hernández-Hernández y cols, se evaluó el efecto de las hormonas esteroides sexuales sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *N. brasiliensis* (66).

En los experimentos *in vitro*, *N. brasiliensis* fue cultivada en presencia de P₄, E₂ o T en tres concentraciones diferentes, tanto en medio líquido como en medio sólido. El diámetro de la colonia y el consumo de glucosa fueron medidos semanalmente durante siete y seis semanas respectivamente. Se encontró que la P₄ tiene un efecto inhibitor significativo en el crecimiento del actinomiceto *in vitro* y sobre el consumo de glucosa. La T también tuvo un efecto inhibitor sobre el consumo de glucosa.

Por otro lado, se produjo el actinomicetoma experimental en ratones machos y hembras tratados con hormonas, se midió el diámetro plantar y la tasa de invasión fue estimada, así como el número de retrocultivos positivos. Se observó que el 17β-estradiol limita el desarrollo del actinomicetoma experimental producido por *N. brasiliensis*. El diámetro plantar de los ratones tratados con E₂ fue el más pequeño al final del experimento. En contraste los ratones tratados con P₄ y T tuvieron el mayor diámetro plantar. La mayor tasa de invasión se obtuvo en los ratones tratados con T y la menor en aquéllos tratados con E₂. Por último, el mayor número de retrocultivos positivos se obtuvo de los ratones tratados con T y el menor de los tratados con E₂ respectivamente.

En general, en los estudios *in vitro* se demostró que la P₄ y la T tienen un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *N. brasiliensis*. Sin embargo, los ensayos *in vivo* demostraron efectos opuestos, donde el estradiol ejerce un efecto inhibitor sobre el desarrollo del actinomicetoma en los ratones traducido en un menor diámetro plantar, un menor número de retrocultivos positivos, así como una menor tasa de invasión, contrario a lo sucedido con P₄ y T. Los resultados anteriores concuerdan con algunos reportes epidemiológicos en los cuales las mujeres parecen tener un efecto protector ante la infección por *N. brasiliensis* (66).

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado el efecto que ejercen las hormonas esteroides sexuales sobre el desarrollo de enfermedades más frecuentes en hombres que en mujeres. Actualmente no se conoce el efecto de la progesterona y la dihidrotestosterona sobre la expresión genética de *N. brasiliensis*, por esta razón se propuso llevar a cabo un estudio que ayude a explicar la relación de estas hormonas con el crecimiento y/o metabolismo del microorganismo y de esa forma, esclarecer parcialmente, las razones del predominio dependiente del género en el actinomicetoma.

5 HIPÓTESIS

La expresión genética de *Nocardia brasiliensis* será modificada por acción de la progesterona y la dihidrotestosterona.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar si la expresión genética de *Nocardia brasiliensis* es modificada ante la presencia de progesterona y dihidrotestosterona.

6.2 Objetivos específicos

- 6 Determinar genes de *N. brasiliensis* cuya expresión sea modificada por la progesterona.
- 7 Determinar genes de *N. brasiliensis* cuya expresión sea modificada por la dihidrotestosterona.
- 8 Caracterizar por lo menos dos genes cuya expresión sea modificada por alguna de las dos hormonas probadas y que se considere importante en el crecimiento y/o metabolismo de *N. brasiliensis*.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepa bacteriana

Para este estudio se utilizó la cepa de *Nocardia brasiliensis* FM-825, aislada a partir de una lesión en extremidad inferior de un paciente masculino de 54 años con actinomicetoma, proveniente de Puebla- México.

Esta cepa fue previamente identificada por procedimientos morfológicos, bioquímicos y moleculares, y ha sido utilizada en estudios previos (68, 69). Además en el estudio de Jasso-Escutia se determinó la curva de crecimiento de esta cepa y se encontró que la fase logarítmica media está en el quinto día de cultivo en caldo BHI a 28°C en agitación (68). Este parámetro fue considerado para los tiempos de incubación bacteriana en presencia de las diferentes hormonas.

7.2 Descripción general de la metodología

Para determinar los genes que son expresados diferencialmente después del tratamiento con P₄ y DHT, el método de estudio utilizado fue RAP-PCR (RNA arbitrarily-primed differential display PCR) (70-72).

La técnica de despliegue diferencial reportada por Liang y Pardee en 1992 permite la identificación de genes eucariotas diferencialmente expresados, mediante el uso de transcripción reversa con oligo-dT que se une a las colas poliadeniladas de los RNAm y su posterior amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos aleatorios de 11 y 13 nucleótidos, los cuales se unen arbitrariamente sobre el cDNA, permitiendo que una subpoblación del RNAm, sea amplificada y posteriormente visualizada en geles de poliacrilamida (71, 72). Sin embargo, la falta de poli-adenilación en las células procariotas limita este procedimiento; es por ello que se han diseñado métodos basados en RAP-PCR para ser utilizados en el análisis de la expresión diferencial en procariotas. El RAP-PCR consiste en la utilización de un primer arbitrario o una mezcla de hexanucleótidos, para la realización de la transcripción reversa y la subsecuente amplificación por PCR de cDNA, con dos random primers (73-75).

En general la metodología utilizada en el presente trabajo consistió en cultivar *N. brasiliensis* en presencia de P₄ o DHT a diferentes concentraciones y tres tiempos de incubación. Se extrajo RNA total y mediante el uso de los oligonucleótidos aleatorios descritos por Fislaje y cols, se realizó RAP-PCR (equivalente a RT-PCR). Los fragmentos diferencialmente expresados fueron clonados y enviados a secuenciar (Figura 2). Además, se analizó la modificación de la expresión de genes específicos, algunos previamente reportados (59), mediante RT-PCR de un solo paso.

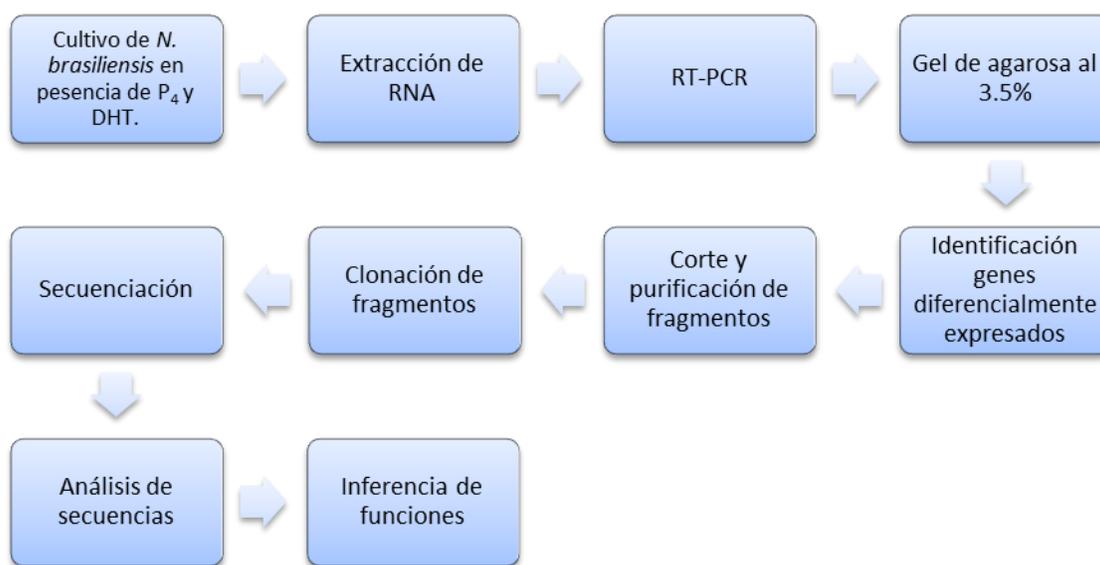


Figura 2. Diagrama general de la metodología

7.3 Concentración de hormonas esteroideas

Para evaluar el cambio en la expresión genética de *N. brasiliensis* inducido por P₄ o DHT, se utilizaron concentraciones hormonales equivalentes a la concentración sérica humana normal (CSHN) y diez veces dicha concentración (10x-CSHN).

- P₄ (CSHN en la fase lútea): 3ng/mL (9.54nM)
- DHT (CSHN en un hombre adulto sano): 0.3ng/mL (1.03nM)

Se preparó una solución de P₄ (Sigma; P.M. 314.46 g/mol) a una concentración de 1.6mM. A partir de esta solución se realizó una dilución 1:100, y de la dilución resultante se

agregaron 60µL de la hormona al medio de cultivo marcado como CSHN y 600µL al medio marcado como 10x-CSHN.

En el caso de la DHT (Sigma; P.M. 290.4 g/mol), se preparó una solución stock de 3.4nM. Se diluyó 1:1000 y a partir de ésta solución se agregaron 30µL a 100mL de medio de cultivo marcado como CSHN y 300µL al medio marcado como 10x-CSHN.

7.4 Condiciones de cultivo

A partir de la cepa congelada de *N. brasiliensis*, se realizó un primer cultivo en caldo BHI con la finalidad de reactivarla. Se incubó durante 5 días a 28°C en agitación a 120 rpm. Pasado este tiempo, se filtró la masa bacteriana a través de papel filtro estéril y se lavó con agua destilada estéril para remover el medio. Esta masa bacteriana fue colocada en un mortero, se agregaron aproximadamente 2mL de solución salina fisiológica (0.86%) y se procedió a homogenizarla suavemente con ayuda del pistilo. Esta suspensión fue transferida a un tubo estéril y se llevó a una concentración de 15×10^8 bacterias/mL. A partir de esta suspensión, se tomaron 50µL (aproximadamente 75×10^6 bacterias/mL) y se transfirieron a cada uno de nueve matraces que contenían 100mL de caldo BHI, los cuales fueron etiquetados de la siguiente manera:

- Grupo 1: tres matraces que contenían solo el vehículo (ciclodextrina para P₄ y etanol para DHT) en el que la hormona fue diluida y que fueron utilizados como control sin hormona.
- Grupo 2: tres matraces que contenían la CSHN de cada una de las hormonas (P₄ o DHT)
- Grupo 3: tres matraces que contenían 10 veces la CSHN (10x-CSHN) de cada una de las hormonas (P₄ o DHT).

Estos cultivos fueron incubados a 28°C en agitación (120 rpm) durante 5 días. Al quinto de incubación se procedió a agregar las distintas concentraciones de hormonas ó vehículo.

Después de 2, 8 y 24 horas de incubación con hormona o vehículo, se retiró un matraz de cada grupo para proceder a la extracción de RNA. La figura 3 resume las condiciones de

cultivo utilizadas para el estudio de la expresión diferencial de genes de *N. brasiliensis* inducida por P₄ o DHT.

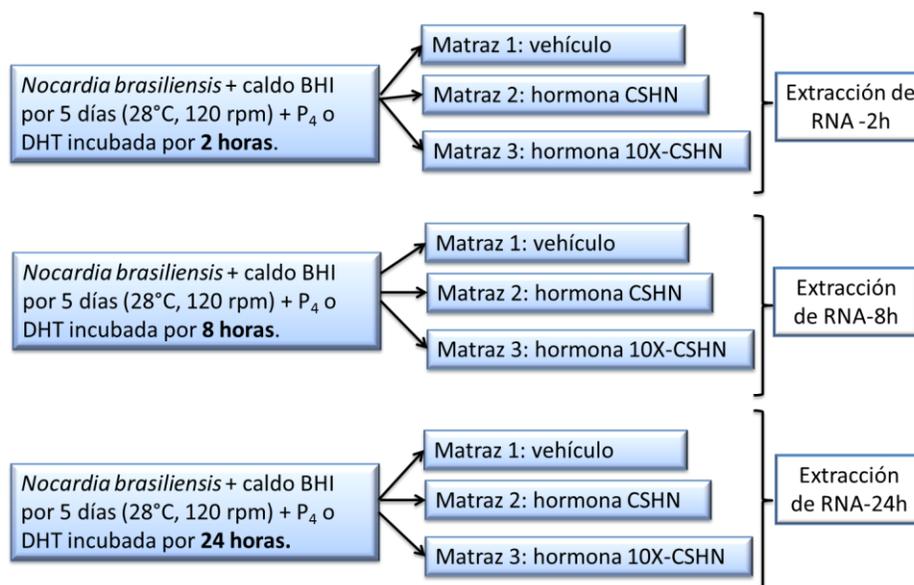


Figura 3. Condiciones de cultivo para la extracción de RNA y el estudio de expresión diferencial de genes.

7.5 Extracción de RNA total con Trizol® (Invitrogen)

Después de incubar el inóculo bacteriano con la hormona, se procedió a realizar la extracción de RNA a las 2, 8 y 24 horas respectivamente. Se recuperó la masa bacteriana por filtración, se lavó dos veces con agua destilada estéril para remover el medio de cultivo y se secó en un segundo papel filtro estéril. Posteriormente, se pasó a un mortero estéril y se maceró en presencia de nitrógeno líquido hasta que quedara un polvo fino. El producto macerado resultante se transfirió a 2 tubos que contenían 1mL de Trizol cada uno. Se dejó 30 minutos en hielo y se adicionaron 200µL de cloroformo en frío. Se agitó en vortex por 40 segundos, se dejó reposar 10 minutos en hielo y se centrifugó¹ a 13362 g por 15 minutos. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril de 1.0mL. Se agregó un volumen igual de isopropanol. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó a 13362 g por 15 minutos y se observó la formación de un precipitado en el fondo del tubo. Se decantó el sobrenadante, se agregaron 500µL de etanol frío al 80% con agua tratada con dietil-pirocarbonato (agua DEPC). Se agitó en vortex y se centrifugó a

¹ En todos los experimentos se utilizó una centrifuga Eppendorf 5414D. Rotor F45-24-11.

13362 g durante 8 minutos. Se decantó el sobrenadante y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA obtenido fue eluído en 30 μ L de agua DEPC.

El RNA obtenido fue visualizado en un gel de agarosa desnaturalizante al 1%, que contenía formaldehído y MOPS 1x. Las muestras de RNA fueron preparadas así: a 3 μ L de RNA se le adicionó formaldehído al 6%, Mops 1x, formamida (50%) y agua DEPC. Esta mezcla se calentó a 75°C por 5 minutos, se pasó a hielo por otros 5 minutos. Finalmente se adicionó el buffer de carga (2.5 μ L) y bromuro de etidio 2.5mg/mL (1 μ L). Se dio un pulso de centrifuga y el volumen total de la mezcla se adicionó al pozo del gel de agarosa desnaturalizante. Se corrió a 80V por 1 hora y se visualizó en el transiluminador.

7.6 Cuantificación del RNA

El RNA obtenido se cuantificó directamente en el Nanodrop® ND-1000 de Thermo-Scientific. Se utilizó agua DEPC como blanco. La concentración fue expresada en ng/ μ L.

7.7 Tratamiento con DNAsa I (Invitrogen)

Para disminuir la posibilidad de obtener resultados falsos positivos, se procedió a trata el RNA obtenido con DNAsa I, para lo cual se diluyó el RNA a una concentración final de 2.5 μ g/ μ L. En un tubo de 0.2mL se depositaron los reactivos mostrados en la tabla 2 y se incubó la reacción 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1 μ L de EDTA 25mM y se incubó a 65°C por 10 minutos, para inactivar la enzima

Tabla 2. Mezcla de reacción para el tratamiento del RNA con DNAsa I.

Reactivos	Volumen para 1 reacción (μL)
H2O DEPC	6
BUFFER 10X	1
DNAsa 1U/ μ L	1
RNA (2,5 μ g/ μ L)	2

Para comprobar la ausencia de DNA contaminante en la muestra de RNA tratado con DNAsa, se procedió a realizar un PCR utilizando el RNA como muestra, esperando la ausencia de amplificación.

7.8 RAP-PCR

- **Oligonucleótidos usados**

Se utilizaron los oligonucleótidos arbitrarios, reportados por Fislage *et al*, de 10 y 11 nucleótidos, tanto para la transcripción reversa como para la PCR (73). Las secuencias y combinaciones de oligonucleótidos probados y que arrojaron mejores resultados se presentan en las tablas 3 y 4 respectivamente.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')
Ea3	TTTATCCAGCG
Ea4	TCAGCGTTTTA
Ea8	ATCATCCAGCA
Es5	TGGCGGCGGC
Es7	ATGCGCTGGC
Es8	TGCCGATGAA

Tabla 4. Combinaciones de oligonucleótidos usados para el RAP-PCR

Combinaciones
Ea3 + Es5
Ea4 + Es5
Ea4 + Es8
Ea8 + Es5
Ea8 + Es7

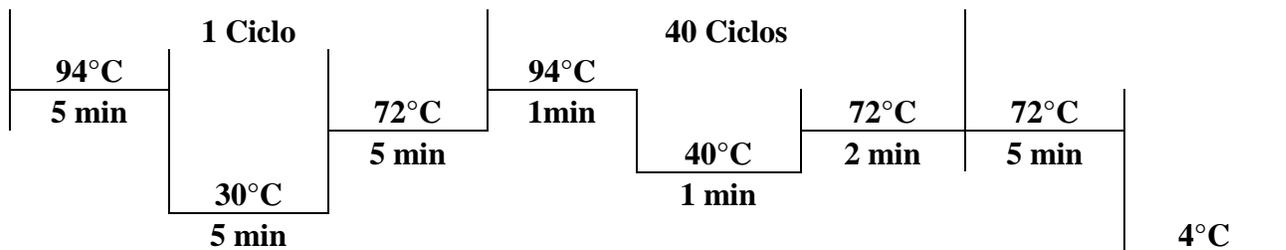
- **Transcripción reversa**

Para sintetizar cDNA a partir del RNA tratado con DNAsa se utilizó la enzima SuperScript II (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones del fabricante: en un tubo de 0.2mL se colocó 1µL de oligonucleótido (Ea-250ng), 1µL de cada dNTP (10mM), 1µL

de agua DEPC y 6µL de RNA tratado con DNAsa (0.4µg). Se calentó la reacción a 65°C por 5 minutos y se pasó inmediatamente a hielo. Se centrifugó brevemente para homogenizar la reacción y se agregaron 4 µL de Buffer 5X (buffer de la transcriptasa reversa) y 2µL de DTT 0.1M. Se mezcló suavemente y se incubó a 25°C por 2 minutos. Posteriormente se añadió 1µL de la enzima SuperScript II (200U). Se mezcló por pipeteo suave y se añadió 1µL de agua ultra pura libre de RNAsas para completar el volumen final de reacción a 20µL. Se incubó a 42°C por 50 minutos y luego a 72°C por 15 minutos para inactivar la reacción.

- **PCR**

Una vez obtenido el cDNA, se procedió a realizar la amplificación por PCR utilizando las combinaciones de oligonucleótidos mostradas en la tabla 4. Se realizó una mezcla de reacción con un volumen final de 30µL que contenía: buffer 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTP's 200µM de cada uno, oligonucleótidos 2µM de cada uno, 3.75U de Taq polimerasa (Fermentas) y 5µL de cDNA. Las condiciones de amplificación utilizadas son las reportadas por Welsh, con algunas modificaciones (70) y son las siguientes:



7.9 Selección de genes expresados diferencialmente

Los productos obtenidos después de la amplificación por PCR, fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 3.5%, teñido con bromuro de etidio (10mg/mL), a 80V por 1 hora y 45 minutos. Se observó el gel en el transiluminador y se obtuvo la foto en el equipo de fotodocumentación UVP 120. Se eligieron las bandas en las cuales se observó expresión diferencial, se cortaron con un bisturí estéril No. 22 y se depositaron en un tubo

estéril de 1.5mL (previamente pesado). Posteriormente se pesó nuevamente el tubo que contenía la banda cortada y se calculó el peso del gel, para realizar la purificación del DNA a partir de gel.

7.10 Purificación de genes expresados diferencialmente

Las bandas seleccionadas fueron purificadas con el kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen). Se siguieron las instrucciones del fabricante, las cuales se describen a continuación: después de conocer el peso del gel contenido en el tubo de 1.5mL, se añadió el buffer solubilizador de geles L3 (60µL de buffer L3 por cada 10mg de gel). El tubo fue incubado a 50°C por 15 minutos; se agitó el tubo para asegurar que el gel estuviera completamente disuelto y se incubó por otros 5 minutos. Luego, se pipeteó la solución que contenía el gel disuelto a una columna de extracción de gel con su respectivo tubo de lavado. Se centrifugó a 15682 g por 1 minuto. Se descartó el líquido pasado a través de la columna y se colocó nuevamente en un tubo de lavado. Se adicionaron 500µL de buffer de lavado (W1). Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13362 g por 1 minuto. Nuevamente se descartó el contenido a través de la columna y se centrifugó a 13362 g por 2 minutos, para eliminar el remanente de buffer. Por último se colocó la columna en un tubo de recuperación y se colocaron 30µL de buffer de elución (E5) precalentado a 68°C, en el centro de la columna. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13362 g por 2 minutos. El DNA purificado se almacenó en congelación a -20°C hasta su uso.

7.11 Cuantificación del DNA purificado

El DNA purificado se cuantificó en el Nanodrop-1000 de Thermo Scientific. El blanco utilizado fue el buffer E5 en el que se diluyó el DNA. La concentración se expresó en ng/µL.

7.12 Clonación de los genes expresados diferencialmente

Se utilizaron dos vectores para clonar los genes expresados diferencialmente: TOPO TA 2.1 y pGEM-T Easy (figura 4 y 5). Ambos vectores están linearizados y se caracterizan por tener timidina en la posición 3' terminal de ambos extremos, lo cual permite la clonación de productos de PCR que hayan sido amplificados con una Taq polimerasa; esta enzima en presencia de los cuatro dNTP's adiciona desoxiadenosina al extremo 3' terminal del DNA amplificado por PCR (76).

- **Reacción de Ligación**

TOPO TA 2.1: en un tubo de 0.5mL se colocaron 2.5µL del DNA purificado a partir del gel, 1µL de solución con sales, 1.5 µL de agua y 1µL del vector. Se mezcló el contenido del tubo agitando suavemente y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el tubo en hielo.

pGEM-T Easy: en un tubo de 0.5mL se colocaron 5µL de buffer de ligación 2X, 1µL de vector, 5µL de DNA purificado a partir del gel y 1µL de DNA ligasa T4. Se mezcló la reacción por pipeteo suave y se incubó a 4°C toda la noche.

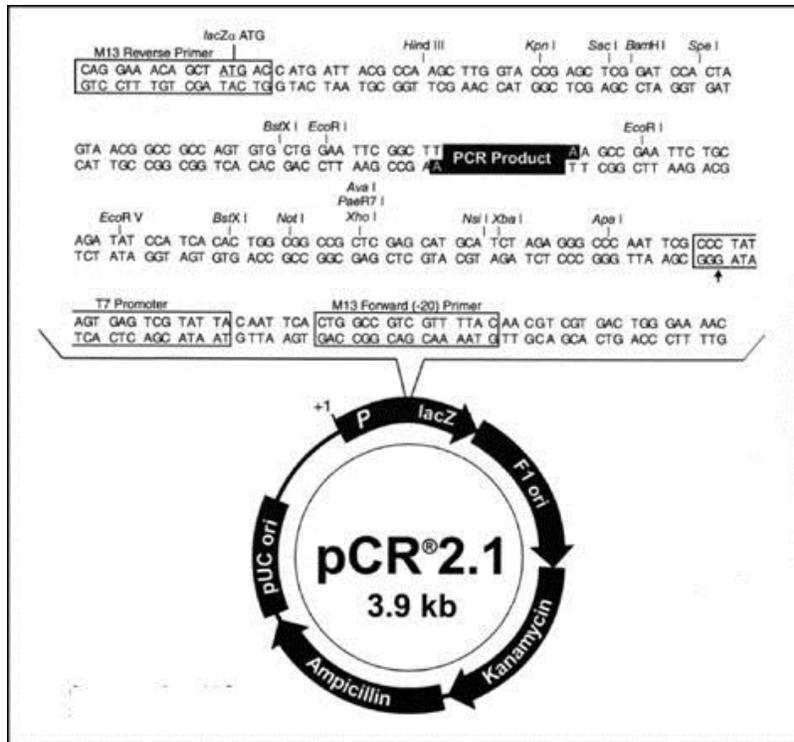


Figura 4. Mapa del vector TOPO TA 2.1

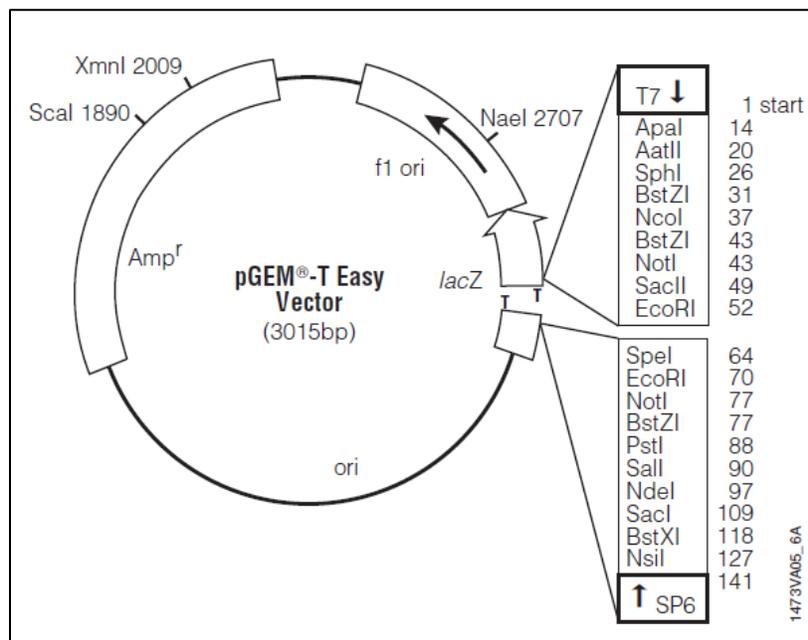


Figura 5. Mapa del vector pGEM-T Easy

- **Transformación de células competentes**

Se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* TG1. En un tubo de 1.5mL estéril se colocaron 2μL de la reacción de ligación y 50μL de células competentes. Se incubó en hielo por 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se calentó la mezcla a 42°C por 30 segundos y se retornó al hielo por 2 minutos. Posteriormente, se adicionaron 950μL de medio SOC y se incubó a 37°C por 1.5 horas en agitación a 200rpm.

Se cultivaron las células por duplicado en Agar Luria-Bertani preincubado a 37°C y que contenía ampicilina (100μg/mL) y 40μL de X-gal (40mg/mL). En el caso del p-GEM T Easy, se adicionaron 100μL de IPTG 100mM además de la ampicilina y el X-gal. Se incubaron las cajas a 37°C por toda la noche.

- **Análisis de las colonias transformantes**

Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron entre 5 y 7 colonias blancas (consideradas como clonas positivas, es decir, que contenían el inserto) y se sembraron en 5mL de caldo Luria-Bertani con ampicilina (100μg/mL).

Para confirmar la presencia del inserto en el vector de clonación, se realizó PCR utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R en el caso de TOPO TA 2.1, y SP6 y T7 en el caso de pGEM-T Easy. Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para comprobar la presencia del inserto en los vectores de clonación

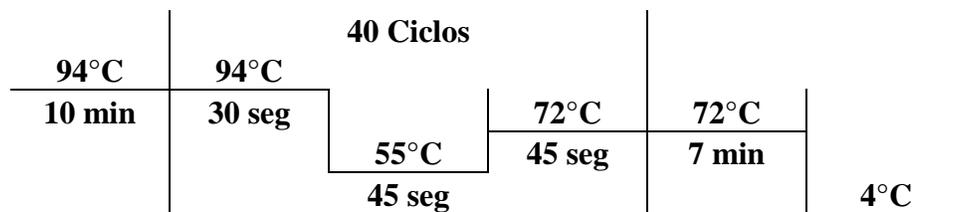
Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
SP6	TATTTAGGTGACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

En ambos casos, a partir de las colonias seleccionadas, se realizó la extracción de DNA por un método rápido de choque térmico. Una parte de la colonia se sembró en caldo

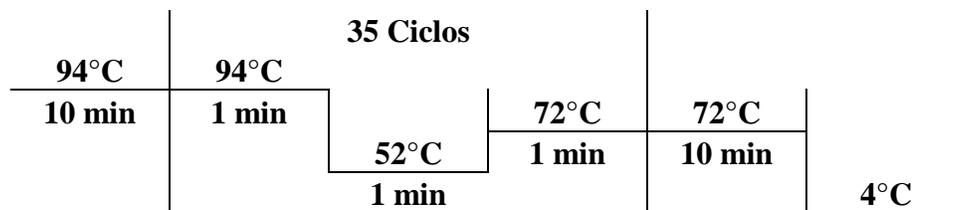
LB con antibiótico, se incubó a 37°C toda la noche; y otra parte se mezcló con 50µL de agua destilada estéril. Esta última se incubó a 95°C por 20 minutos y luego se pasó a hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 15682 g por 5 minutos y se recuperó el DNA contenido en el sobrenadante y con el cual se realizó la PCR para corroborar la presencia del inserto.

Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas para cada uno de los vectores. En estos experimentos se utilizó Taq polimerasa recombinante de Invitrogen.

PCR para los productos obtenidos con el kit de clonación TOPO TA 2.1: se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25µL que contenía buffer 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTP's 0.2mM de cada uno, M13F 1µM, M13R 1µM, Taq 1U. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



PCR para los productos obtenidos con el kit de clonación pGEM-T Easy: se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25µL que contenía buffer 1X, MgCl₂ 1.5mM, dNTP's 0.2mM de cada uno, SP6 0.5µM, T7 0.5µM, Taq 1U. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



Los productos de amplificación obtenidos fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio (10mg/mL). Diez µL del producto de amplificación

más 2µL de buffer de carga fueron depositados en cada pozo del gel. La electroforesis se realizó a 80V por 1 hora. El tamaño del producto esperado correspondió al tamaño del fragmento amplificado (TOPO TA 2.1=202pb; pGEM-T Easy=179pb) más el tamaño del fragmento insertado.

- **Purificación del DNA plasmídico**

Una vez identificadas las clonas positivas, se procedió a realizar la purificación mediante el kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, las cuales se describen a continuación.

Se centrifugó 1mL del caldo LB incubado toda la noche a 5938 g por 15 min. Se decantó el sobrenadante y la masa bacteriana se resuspendió en 250µL de buffer de resuspensión. Se adicionaron 250µL de buffer de lisis, se mezcló por inversión y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 350µL de buffer de precipitación y se mezcló agitando el tubo. Se centrifugó la mezcla a 15682 g por 15 minutos, se pasó el sobrenadante a una columna, se centrifugó a 13362 g por 1 minuto y se descartó el líquido. Sobre la membrana del filtro de la columna se colocaron 500µL de buffer de lavado W10, se incubó por 1 minuto y se centrifugó a 13362 g por 1 minuto. Se descartó el líquido. La membrana se lavó con 700µL de buffer W9, y se centrifugó a 13362 g por 1 minuto. Se descartó el líquido y se centrifugó nuevamente por 1 minuto para eliminar el remanente de buffer. Finalmente se pasó la columna a un tubo de recuperación y se adicionaron 30µL de buffer TE precalentado a 68°C, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13362 g por 2 minutos. El DNA plasmídico purificado se almacenó a -20°C hasta su secuenciación.

7.13 Secuenciación y análisis de secuencias

El DNA plasmídico purificado fue enviado al servicio de secuenciación del instituto de Biología. Los electroferogramas fueron visualizados en el programa CHROMAS Lite 2.1.1. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los programas disponibles en el NCBI

como VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) para eliminar la secuencia contaminante del vector y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para alinear las secuencias obtenidas y tratar de predecir las proteínas para las cuales codifican dichas secuencias y así, inferir las funciones de las mismas. Específicamente, se usó BlastX en el cual se introduce la secuencia de nucleótidos de interés, se traduce y se compara la secuencia traducida contra una base de datos de proteínas.

7.14 Análisis del cambio de expresión de genes específicos inducidos por P4 y DHT

- **Selección de genes a estudiar**

Los genes relacionados con virulencia fueron el blanco de interés para evaluar el efecto de las hormonas sobre su expresión. En un estudio realizado en 2011 se encontró que la progesterona induce un cambio en la expresión de los genes que codifican para la enzima tiorredoxina reductasa y la subunidad alfa de la ribonucleosido difosfato reductasa de *Chlamydia trachomatis* (59). *N. brasiliensis* también contiene estos genes, por lo cual se eligieron para este estudio.

Por otra parte, se ha observado que la pared celular de *Nocardia* tiene un papel importante en su virulencia (14); por ello, se quiso evaluar si P₄ y/o DHT estaban involucradas en el cambio de expresión del gen que codifica para la enzima ciclopropano ácido graso sintasa, involucrada en la síntesis de ácidos micólicos. También se evaluó el efecto de estas hormonas sobre el gen que codifica para la enzima superóxido dismutasa, involucrada en la respuesta al estrés oxidativo.

- **Diseño de oligonucleótidos**

Una vez seleccionados los genes a estudiar, se diseñaron los oligonucleótidos específicos (Tabla 6) mediante el uso del programa PRIMER-BLAST disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los oligonucleótidos

utilizados para estudiar el cambio en la expresión del gen de la superóxido dismutasa fueron reportados previamente (77).

Tabla 6. Oligonucleótidos para el estudio de genes específicos

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Producto esperado (pb)
trxB-F	GGTCGAGAACTATCCCGGCT	301
trxB-R	GATGTCCTGCCCTTGAAGAA	
nrdA-F	CATGTTGAGGACACGGTGA	528
nrdA-R	CACACCTGCTCGGTGTACTT	
cyp-F	ACCGTTCTGACGTCTTAGCC	281
cyp-R	CATCGCCTTCAGGATGTCGT	
sod-F*	AACCGATCGGGTGTAGGAAT	630
sod-R*	CCAGTTGACGACGTTCCAGA	

* Reportados por Révol, *et al* (2006).

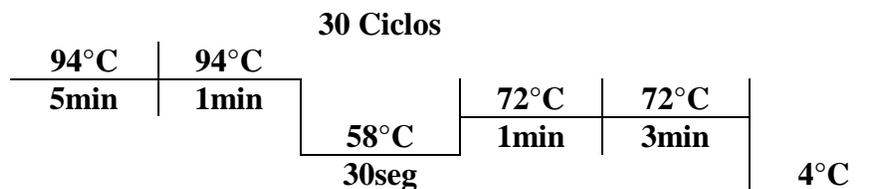
- **Estandarización de las condiciones de amplificación**

Se utilizó DNA de *N. brasiliensis*, el cual fue extraído con el kit DNA GeneAll Exgene Plant SV mini, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se probaron diferentes temperaturas de alineamiento, concentraciones de MgCl₂ y cantidad de Taq (Fermentas).

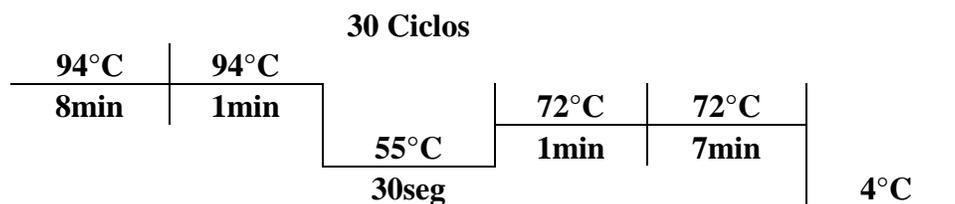
Las condiciones de amplificación que consideramos óptimas se muestran a continuación:

Superóxido dismutasa: condiciones recomendadas por Révol y cols en 2006.

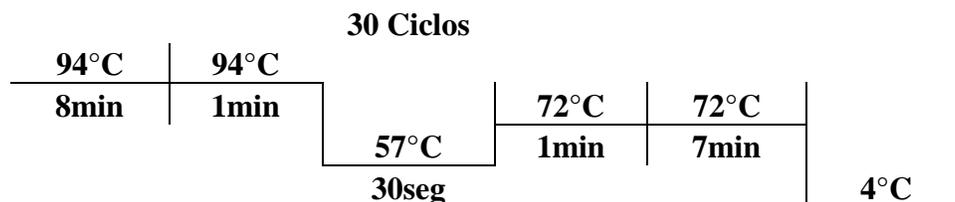


Las condiciones de los siguientes tres genes fueron estandarizadas durante el desarrollo del presente trabajo.

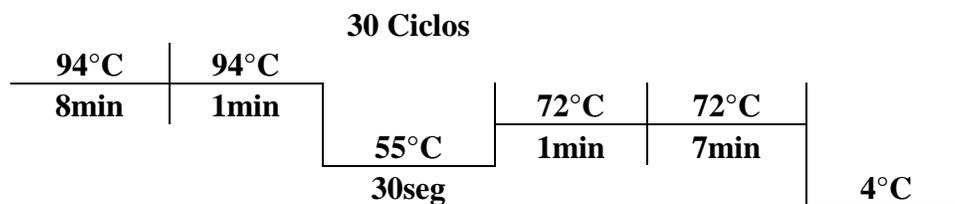
Tiorredoxina reductasa



Ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α



Ciclopropano ácido graso sintasa



- **RT-PCR de un solo paso**

Para evaluar los cambios en la expresión inducidos por P₄ o DHT de los genes relacionados con virulencia y mencionados previamente, se utilizó el método de transcripción reversa-PCR de un solo paso, mediante el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen), con el cual se sintetiza cDNA a partir de RNA total tratado con DNAsa y en la misma

mezcla de reacción se lleva a cabo la amplificación por PCR, usando oligonucleótidos específicos. Para utilizar cantidades equivalentes de RNA bacteriano en todas las reacciones de RT-PCR, el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA fue utilizado como control; los oligonucleótidos utilizados para su amplificación fueron reportados previamente y se muestran en la tabla 7 (78).

Tabla 7. Oligonucleótidos para amplificar un fragmento del rRNA 16S

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Producto esperado (pb)
Noc-1	GCTTAACACATGCAAGTCG	606
Noc-2	GAATTCCAGTCTCCCCTG	

Mezcla de reacción: se preparó una mezcla de reacción para un volumen final de 25µL que contenía 2x Reaction Mix 1x, oligonucleótidos forward y reverse 0.5µM de cada uno, 1µg de RNA tratado con DNAsa y 0.5µL de la enzima SuperScript III.

Se realizó un primer paso de síntesis de cDNA en un ciclo a 55°C por 30 minutos; seguido de la amplificación por PCR, de acuerdo a las condiciones estandarizadas anteriormente.

Los productos del RT-PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (10mg/mL). 10µL del producto de amplificación más 2µL de buffer de carga fueron depositados en cada pozo del gel. La electroforesis se realizó a 85V por 1 hora y 10 minutos. El gel fue visualizado en el transiluminador de luz U.V y la foto fue obtenida en el equipo de fotodocumentación UVP 120. Posteriormente se realizó el análisis densitométrico a través del software Image J versión 1.47, para cuantificar la concentración aproximada del producto en las distintas condiciones (tiempo y concentración de hormona).

8 RESULTADOS

8.1 Cultivo, extracción y cuantificación de RNA

Pasados los cinco días de cultivo (tiempo en el que la bacteria se encontraba en fase logarítmica de crecimiento), se tomó una alícuota y se realizó una coloración de Gram para comprobar la pureza del cultivo. En la figura 6, se observan los filamentos Gram positivos característicos de *N. brasiliensis*.

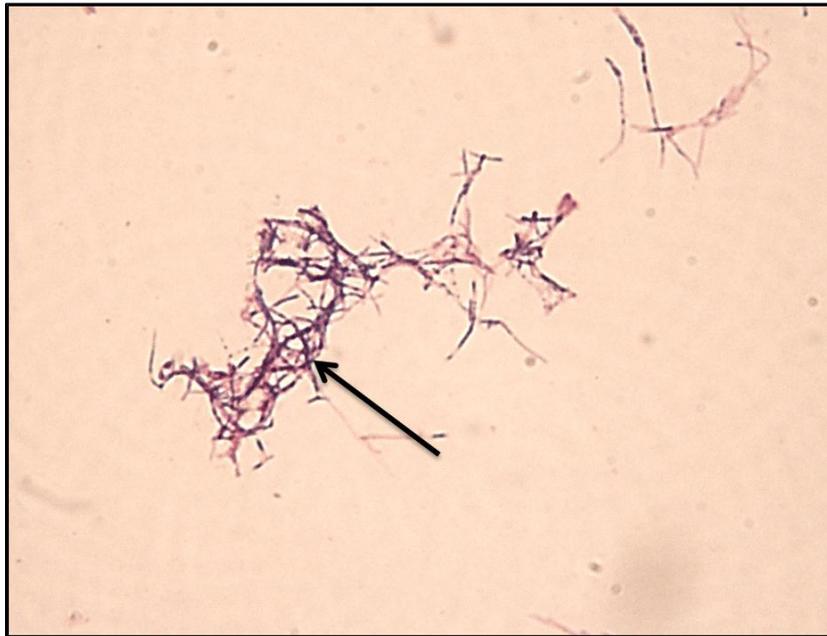
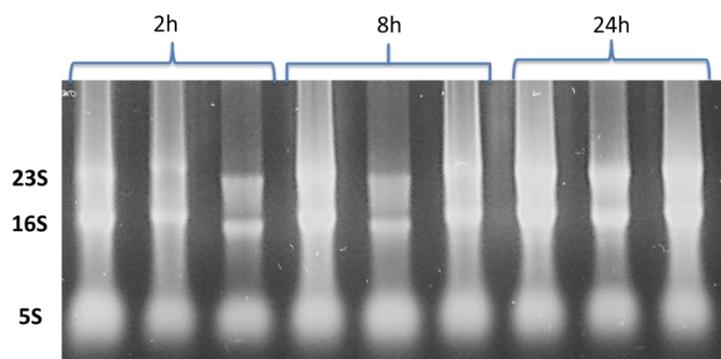


Figura 6. Tinción de Gram. Frotis realizado a partir del cultivo de *N. brasiliensis* a los cinco días de incubación. La flecha señala los filamentos Gram positivos característicos de esta bacteria que miden de 0.8 a 1.0 μm de diámetro

Posteriormente, se adicionaron las hormonas en concentraciones equivalentes a la CSHN y 10x CSHN, se incubó por 2, 8 y 24 horas y se hizo la extracción de RNA total por el método de Trizol®. La figura 7 muestra el RNA total obtenido tanto de las bacterias cultivadas con la hormona, como sus respectivos controles sin hormona. Se muestra el RNA obtenido a las 2, 8 y 24 horas de incubación respectivamente, se observan las subunidades del RNA ribosomal 23S, 16S y en algunas ocasiones 5S.

A.



B.

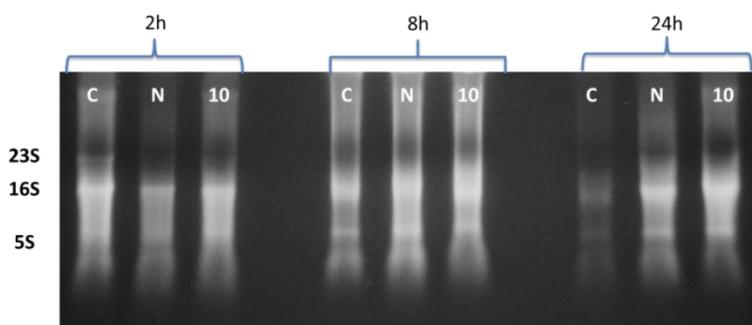


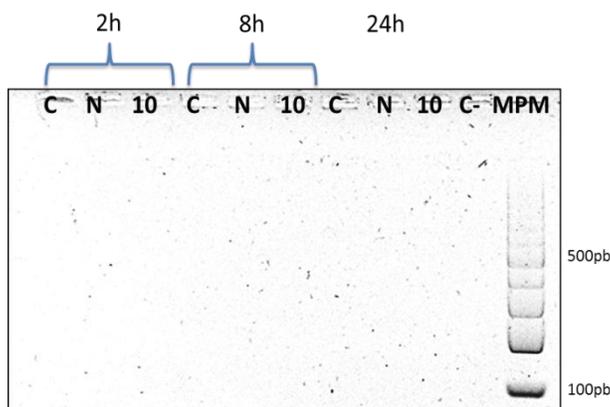
Figura 7. RNA total de *N. brasiliensis*. Gel de agarosa desnaturalizante al 1%. RNA total de *N. brasiliensis* incubada con P₄ (A) o DHT (B). C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

Una vez extraído y visualizado, el RNA fue cuantificado (Anexo 1). Los datos obtenidos, mostraron una buena cantidad de RNA en la mayoría de muestras y una pureza aceptable (relación 260/280 cercana o igual a 2.0).

8.2 Tratamiento con DNAsa I

El RNA extraído fue tratado con DNAsa. Para comprobar si el tratamiento había sido efectivo y por tanto había ausencia de DNA en las muestras, se realizó una PCR con el RNA tratado, esperando la ausencia total de amplificación. La figura 8, muestra los resultados obtenidos, donde no se observa amplificación después de realizar la PCR con el RNA tratado con DNAsa, lo cual indica ausencia de contaminación con DNA genómico.

A.



B.

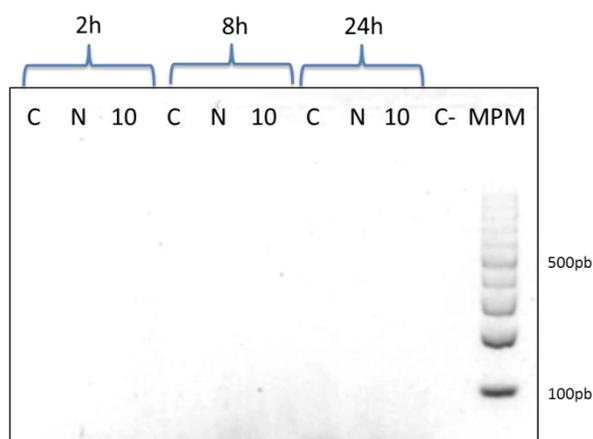
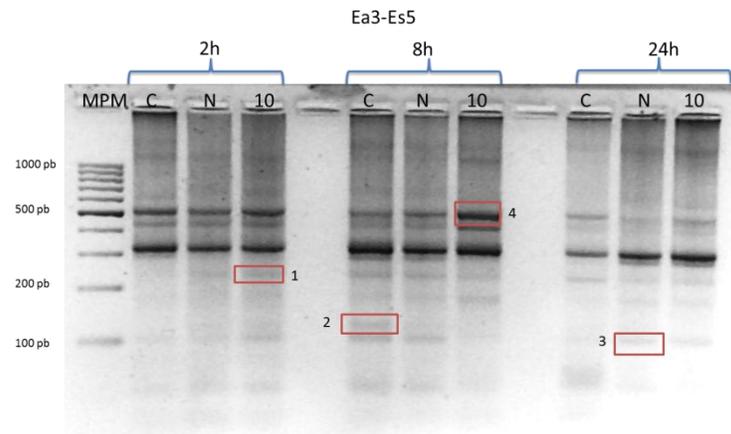


Figura 8. Tratamiento con DNAsa. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PCR realizada con RNA total de *N. brasiliensis* tratado con DNAsa, incubado con P₄ (A) o DHT (B). C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN. C-=control negativo, MPM=marcador de peso molecular.

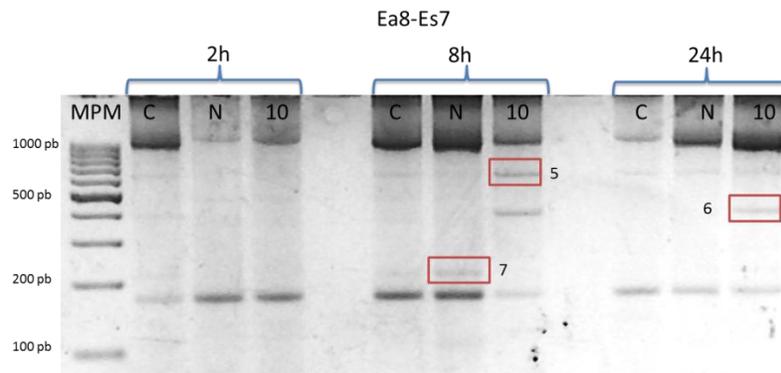
8.3 RAP-PCR

Una vez confirmado que el tratamiento con DNAsa fue efectivo, se procedió a realizar la RT-PCR utilizando los oligonucleótidos y las combinaciones mostradas en las tablas 3 y 4 (en la sección de Materiales y Métodos). La figura 9, muestra trece bandas enmarcadas en recuadros rojos, que correspondieron a genes que fueron expresados diferencialmente, después de la adición de P₄ al cultivo bacteriano; ocho de estos genes (62%) aumentaron su expresión y cinco (38%) la disminuyeron.

A



B



C

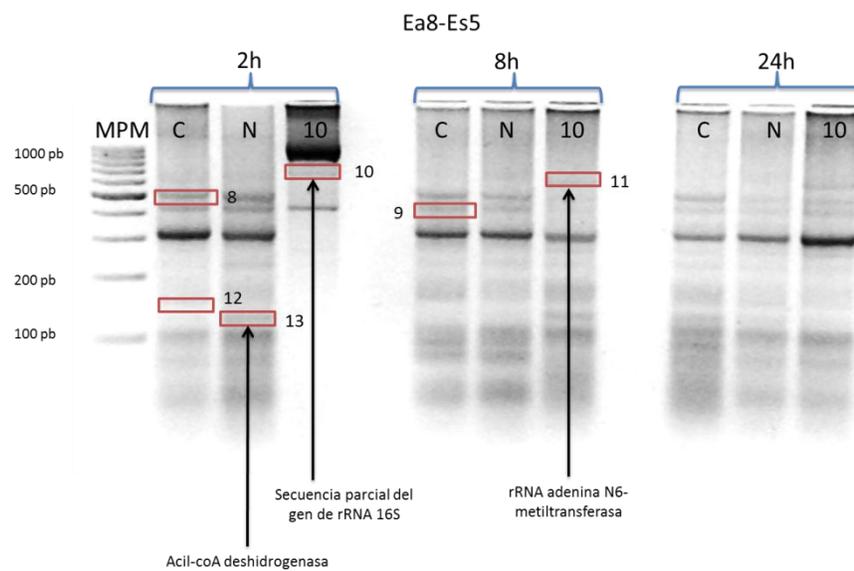
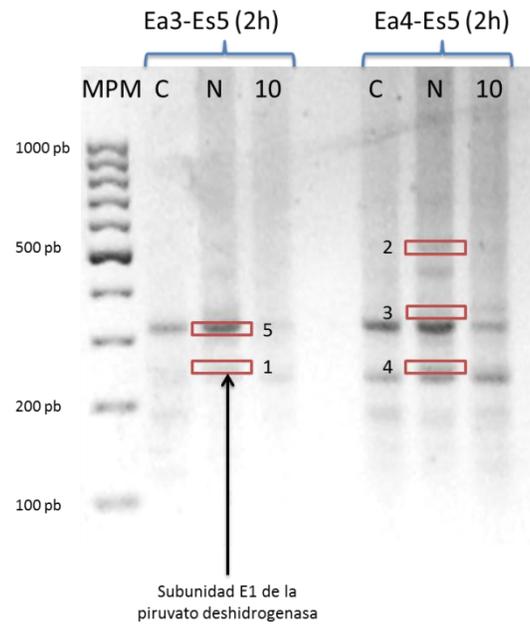


Figura 9. Genes expresados diferencialmente después de adición de P_4 al cultivo de *N. brasiliensis*. Gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio. Combinación de oligonucleótidos Ea3-Es5 (A). Ea8-Es7 (B). Ea8-Es5 (C). MPM=marcador de peso molecular, C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

La figura 10, muestra doce bandas en recuadros rojos, correspondientes a genes que se expresaron diferencialmente después de la adición de DHT al cultivo bacteriano, nueve (75%) de los cuales, aumentaron su expresión y tres (25%) la disminuyeron

A.



B.

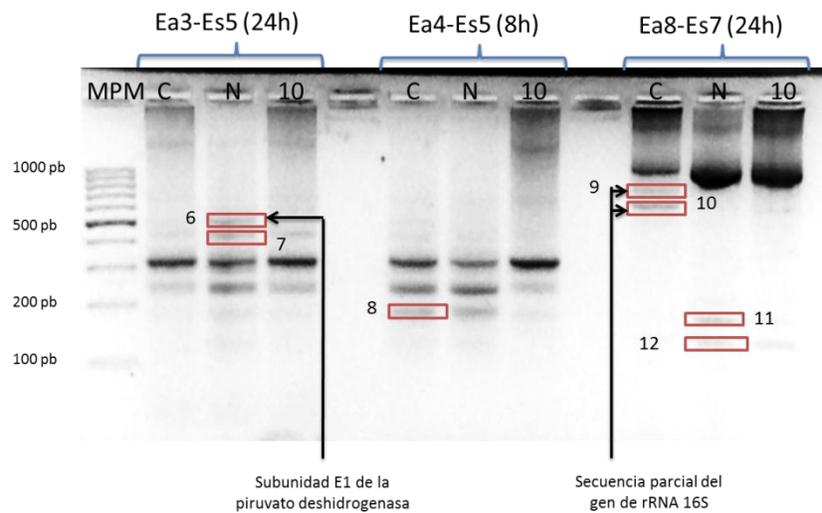


Figura 10. Genes expresados diferencialmente después de adición de DHT al cultivo de *N. brasiliensis*. Gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio. Combinación de oligonucleótidos Ea3-Es5, Ea4-Es5 (A). Ea3-Es5, Ea4-Es5, Ea8-Es7 (B). MPM=marcador de peso molecular, C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

Un total de 25 genes fueron expresados diferencialmente después del tratamiento hormonal. En general, los mayores efectos de la progesterona sobre la expresión genética se observaron a las 2 y 8 horas de incubación. La mayor parte de los cambios que indicaron aumento en la expresión después del estímulo con esta hormona se evidenció con la mayor concentración de hormona, aunque algunos cambios también fueron evidentes con la concentración equivalente a la CSHN. Por otro lado, después del estímulo con DHT, se evidenciaron efectos sobre la expresión principalmente a las 2 y 24 horas de incubación, y con concentraciones correspondientes a la CSHN de esta hormona.

8.4 Selección y purificación de genes de *N. brasiliensis* expresados diferencialmente

Una vez seleccionadas, las bandas diferenciales fueron cortadas y purificadas. Este DNA fue cuantificado para su posterior clonación. En los Anexos 2 y 3 se muestran los resultados de la cuantificación, en donde se observan cantidades suficientes para la clonación.

8.5 Clonación de los genes expresados diferencialmente

Después de realizar la reacción de ligación, células de *E. coli* TG1 fueron transformadas y las clonas positivas seleccionadas. La figura 11 muestra el crecimiento de las células transformadas en agar LB con X-gal. Las colonias blancas (señaladas con flechas) fueron seleccionadas para comprobar la presencia del inserto de interés mediante PCR.

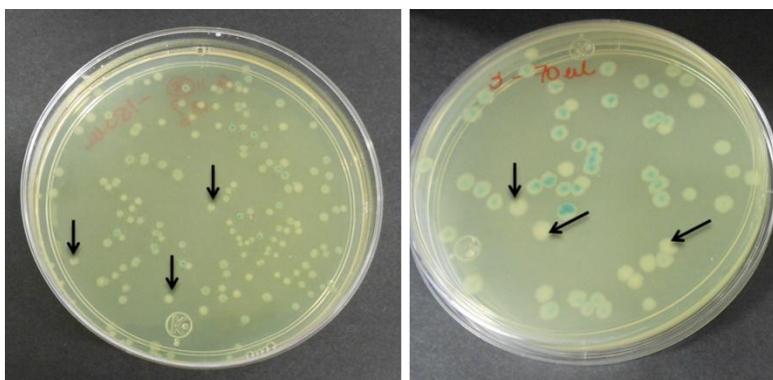
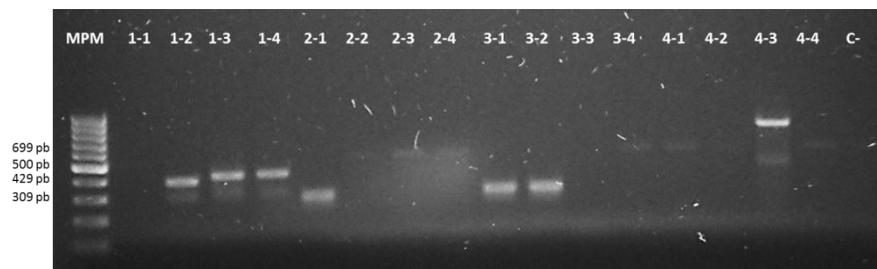


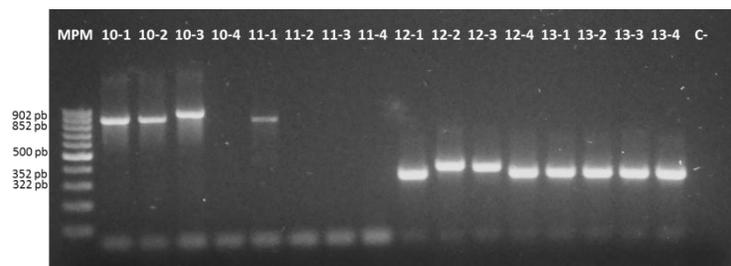
Figura 11. Transformación. Cultivo de células transformadas de *E. coli* TG1 en agar LB con x-gal.

La figura 12 muestra los resultados de algunas PCR's obtenidas después de seleccionar las clonas positivas. Todos los fragmentos mostrados en esta figura fueron exitosamente clonados. Por ejemplo en la figura 12A se observan los resultados de la clonación de los fragmentos correspondientes a las bandas 1, 2, 3 y 4 del gel mostrado en la figura 9A (que corresponde a RNA de *N. brasiliensis*, cultivada en presencia de progesterona). El fragmento 1 tenía un tamaño aproximado de 250pb (figura 9A); posterior a la clonación el tamaño esperado de la banda fue de aproximadamente 429pb (carriles 1-1 a 1-4 de la figura 11A), que corresponde a 250pb (tamaño de la banda purificada) más el tamaño del vector, que en este caso fue p-GEM-T easy (179pb), lo que da como resultado 429pb. Asimismo se hizo el cálculo para las siguientes bandas. En el Anexo 4 se amplían los resultados mostrados en esta figura.

A.



B.



C.

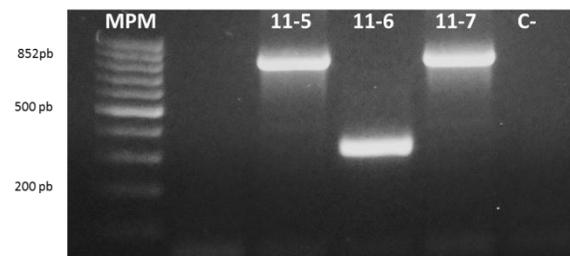


Figura 12. Comprobación de la clonación por PCR. (A) Fragmentos clonados con el kit pGEM-T Easy. (B) y (C) Fragmentos clonados con TOPO TA 2.1. MPM=marcador de peso molecular; C-=control negativo; los números corresponden al número de la banda purificada de los geles con P₄ (mostrados en la figura 7).

8.6 Análisis de las secuencias de los fragmentos expresados diferencialmente

Después de comprobar la clonación de los fragmentos de interés por PCR, se purificó el DNA plasmídico y se envió al servicio de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

De los 13 fragmentos que mostraron expresión diferencial después del tratamiento con P₄ (figura 8), 11 fueron exitosamente clonados y secuenciados. La tabla 8 muestra los resultados obtenidos después de realizar el análisis con BLAST.

De estos 11 genes, siete mostraron un aumento en la expresión después del tratamiento con P₄ y la mayoría correspondieron a proteínas hipotéticas. Se detectaron dos proteínas cuya expresión es presuntamente modificada por acción de la progesterona: la rRNA (adenina-N6) metiltransferasa y la acil-CoA deshidrogenasa. La primera está implicada en la resistencia a macrólidos y la segunda en el metabolismo de lípidos. Por otra parte, cuatro genes disminuyeron su expresión después del tratamiento hormonal y todos correspondieron a proteínas hipotéticas.

De los 12 fragmentos que mostraron expresión diferencial después de la adición de DHT (figura 9), nueve fueron exitosamente clonados y secuenciados. La tabla 9 muestra los resultados obtenidos después de realizar el análisis con BLAST.

Siete genes correspondientes a los fragmentos purificados mostraron un aumento en la expresión después del tratamiento con DHT. La mayoría correspondieron a proteínas hipotéticas de *N. brasiliensis*. Sin embargo una proteína relacionada con el metabolismo del piruvato, la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa, fue identificada en dos fragmentos expresados diferencialmente. En ambos casos se observó que el tratamiento de la bacteria con una concentración equivalente a la CSHN de DHT aumenta la expresión de dicho gen, comparado con el control sin hormona (banda 1 y 6, figura 9).

Dos fragmentos cuya secuencia tiene homología con una parte de la secuencia del rRNA 16S de *N. brasiliensis*, presentaron disminución en la expresión después del tratamiento hormonal; la banda es visible solamente en el control sin hormona (banda 9 y 10, figura 9B).

Tabla 8. Análisis de secuencias de genes con cambio de expresión después del tratamiento con progesterona

ANÁLISIS DE SECUENCIAS CON BLAST (P4)												
No. de la banda	Vector usado	Resultado de análisis en BLAST	Max score	Total score	Query Score	E-Value	Ident	Expresión o Inhibición	Concentración de hormona	Tiempo	Combinación	Función
1	PGEM	Proteína hipotética NOCYR_2433 [<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> GUH-2]	36.2	36.2	25%	2 e -04	90%	↑	Normal y 10x	2 horas	Ea3-Es5	Desconocida
3	PGEM	Proteína hipotética O3I_032930 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	37.0	37.0	25%	4 e -04	95%	↑	Normal y 10x	24 horas	Ea3-Es5	Desconocida
5	TOPO	Proteína hipotética nfa55870 [<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152]	118	192	80%	1 e -43	89%	↑	10x	8 horas	Ea8-Es7	Desconocida
6	TOPO	Proteína hipotética nfa55870 [<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152]	57,4	57,4	66%	8 e -11	57%	↑	10x	8 y 24 horas	Ea8-Es7	Desconocida
7	TOPO	Proteína hipotética O3I_006310 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	29,3	29,3	80%	0,19	33%	↓	10x (sólo aparece en el control y normal)	2 y 8 horas	Ea8-Es7	Desconocida
8	TOPO	Proteína hipotética O3I_005060 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	193	193	99%	2 e -61	100%	↓	10x (sólo aparece en el control y normal)	2, 8 y 24 horas	Ea8-Es5	Desconocida
9	TOPO	Proteína hipotética O3I_005060 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	110	110	74%	8 e -30	96%	↓	10x (sólo aparece en el control y normal)	2,8 y 24 horas	Ea8-Es5	Desconocida
10	TOPO	Secuencia parcial del gen de RNA ribosomal 16S de <i>Nocardia brasiliensis</i>	1160	1160	94%	0.0	99%	↑	10x	2 horas	Ea8-Es5	Síntesis de proteínas
11	TOPO	rRNA (adenina-N(6)-)metiltransferasa [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	357	357	98%	5 e -25	85%	↑	10x	8 horas	Ea8-Es5	Metilación de residuos de adenina en el RNAr 23s; induce resistencia a los antibióticos de tipo macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B.
12	TOPO	Proteína hipotética O3I_030585 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	60.8	60.8	53%	6 e -13	94%	↓	Solo aparece en el control sin hormona	2 horas	Ea8-Es5	Desconocida
13	TOPO	acyl-CoA deshidrogenasa [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	86.7	86.7	98%	4 e -22	98%	↑	Normal y 10x	2 y 8 horas	Ea8-Es5	Oxidación de ácidos grasos

Tabla 9. Análisis de secuencias de genes con cambio de expresión después del tratamiento con dihidrotestosterona

ANÁLISIS DE SECUENCIAS CON BLAST (DHT)												
No. de la banda	Vector usado	Resultado de análisis en BLAST	Max score	Total score	Query Score	E-Value	Ident	Expresión o Inhibición	Concentración de hormona en la que aparece la banda	Tiempo	Combinación	Función
1	Topo	Piruvato deshidrogenasa subunidad E1 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	143	143	97%	1 e -37	99%	↑	Normal	2 horas	Ea3-Es5	Metabolismo del piruvato; ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
3	Topo	Proteína hipotética O3I_005060 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	115	115	71%	1 e-28	96%	↑	Normal y 10X	2 horas	Ea4-Es5	Desconocida
4	Topo	Proteína hipotética O3I_020245 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	88.6	88.6	28%	1 e-16	95%	↑	Normal	2 horas	Ea4-Es5	Desconocida
5	Topo	Proteína hipotética O3I_005060 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	110	110	77%	6 e-27	96%	↑	Normal	2 horas	Ea3-Es5	Desconocida
6	PGEM	Piruvato deshidrogenasa subunidad E1 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	145	145	96%	2 e-38	100%	↑	Normal	24 horas	Ea3-Es5	Metabolismo del piruvato; ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
7	PGEM	Proteína hipotética O3I_028560 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	149	149	83%	5 e-43	94%	↑	Normal	24 horas	Ea3-Es5	Desconocida
9	PGEM	Secuencia parcial del gen de RNA ribosomal 16S de <i>Nocardia brasiliensis</i>	1133	1133	98%	0	99%	↓	Sólo en el control sin hormona	24 horas	Ea8-Es7	Síntesis de proteínas
10	PGEM	Secuencia parcial del gen de RNA ribosomal 16S de <i>Nocardia brasiliensis</i>	1138	1138	98%	0	100%	↓	Sólo en el control sin hormona	24 horas	Ea8-Es7	Síntesis de proteínas
12	PGEM	Proteína hipotética O3I_026050 [<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358]	95.1	95.1	97%	1 e-26	98%	↑	Normal y 10X	24 horas	Ea8-Es7	Desconocida

8.7 Análisis del cambio de expresión de genes específicos, inducido por P4 y DHT

En esta parte experimental se buscó algún cambio de expresión probablemente influenciado por el efecto hormonal, en cuatro genes específicos:

- Superóxido dismutasa
- Tiorredoxina reductasa
- Ciclopropano ácido graso sintasa
- Ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α

Se utilizó como control interno, la expresión de un segmento del gen del rRNA 16S.

8.8 Estandarización de las condiciones de amplificación

Se extrajo DNA de *N. brasiliensis*, el cual se utilizó para estandarizar las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos diseñados. La figura 13 muestra un gel de agarosa al 0.8% donde se visualiza el DNA obtenido después de la extracción.

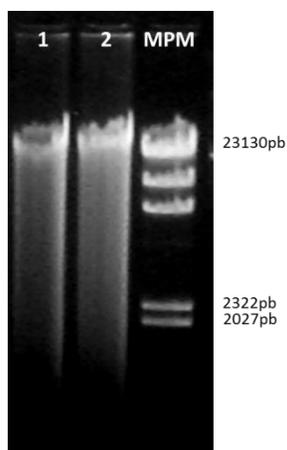


Figura 13. DNA purificado de *N. brasiliensis*. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. 1. Elución con 50µL de buffer TE. 2. Elución con 100µL de buffer TE. MPM. Marcador de peso molecular.

Una vez extraído y visualizado, el DNA se cuantificó y 100ng se usaron para los experimentos de estandarización.

8.8.1 Gen de la superóxido dismutasa

Para amplificar el segmento del gen de la enzima superóxido dismutasa, se utilizó el DNA extraído, y las condiciones reportadas en un estudio realizado en 2006 por Révol y cols. Sin embargo, las concentraciones de $MgCl_2$, las unidades de Taq polimerasa y las temperaturas de alineamiento utilizadas fueron ajustadas hasta obtener una amplificación óptima. La figura 13 y 14 muestran los resultados obtenidos en esta parte experimental: en la figura 14, se muestra, que con una cantidad de 2.5 U de Taq polimerasa (Fermentas) se obtuvo amplificación. La concentración final de $MgCl_2$ utilizada en ese experimento fue de 1.5mM y la temperatura de alineamiento usada fue de 58°C. La concentración final de dNTP's fue de 0.2mM, oligonucleótidos forward y reverse 0.5 μ M de cada uno, y el volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L.

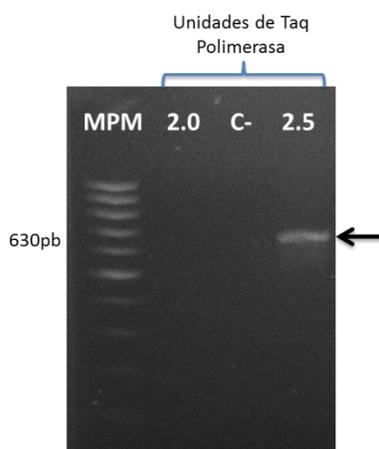


Figura 14. Amplificación del gen de superóxido dismutasa con 2.0 y 2.5 U de Taq. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. MPM=marcador de peso molecular; 2.0=Taq polimerasa 2 U; C-=control negativo; 2.5=Taq polimerasa 2.5 U.

En la figura 15, se muestra el resultado de una PCR donde se probaron varias temperaturas de alineamiento y dos concentraciones de $MgCl_2$ para observar si había cambio o mejora en la amplificación de dicho segmento del gen; sin embargo, no hubieron grandes cambios, por lo que se decidió trabajar con una concentración final de $MgCl_2$ de 1.5mM, 2.5 U de Taq polimerasa y la temperatura de alineamiento recomendada por el artículo (77).

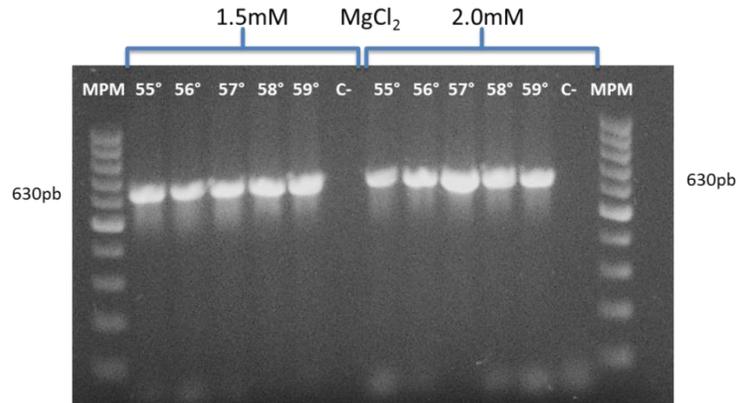


Figura 15. Curva de temperaturas de alineamiento y concentración de MgCl₂ para la amplificación del gen de la superóxido dismutasa. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. MPM=marcador de peso molecular; C-=control negativo. *Los números se refieren a las temperaturas de alineamiento probadas.

Para los siguientes experimentos de estandarización se utilizó una concentración final de MgCl₂ igual a 1.5mM y 2.5 U de Taq polimerasa. Asimismo, se utilizaron concentraciones finales de dNTP's de 0.2mM y de oligonucleótidos 0.5µM de cada uno. Sólo se realizaron curvas de temperaturas de alineamiento para encontrar la mejor condición de amplificación para cada par de oligonucleótidos.

8.8.2 Gen de la tiorredoxina reductasa

La figura 16 muestra la curva de temperatura obtenida para el gen que codifica la enzima tiorredoxina reductasa. En todas las temperaturas probadas se obtuvo amplificación; sin embargo, a 55°C se observa una buena intensidad de la banda y ningún resto de oligonucleótidos, por lo cual ésa temperatura se seleccionó como óptima.

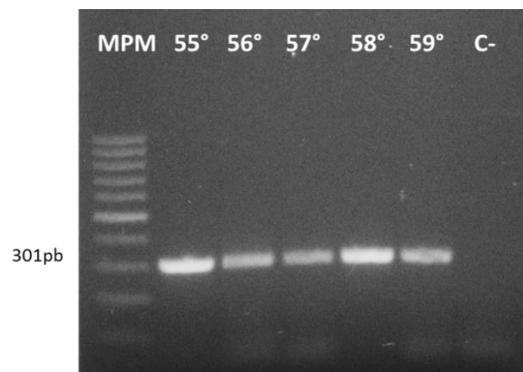


Figura 16. Curva de temperaturas para el gen de tiorredoxina reductasa. Gel de agarosa al 1.5%. MPM=marcador de peso molecular; C-=control negativo. *Los números se refieren a las temperaturas de alineamiento probadas.

8.8.3 Gen de la ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α

La figura 17 muestra la curva de temperatura para el gen de la subunidad α de la enzima ribonucleosido difosfato reductasa. En este caso, la temperatura a la cual se obtuvo mejor amplificación fue 57°C.

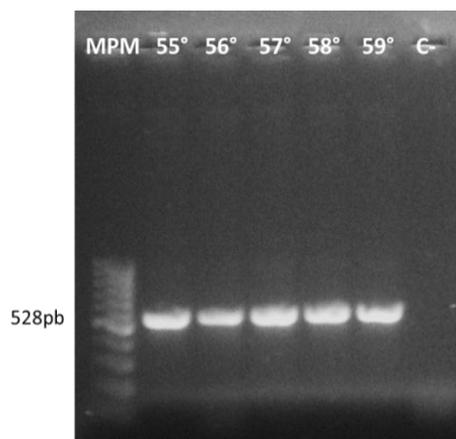


Figura 17. Curva de temperatura para el gen de ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α . Gel de agarosa al 1.5%. MPM=marcador de peso molecular; C-=control negativo. . *Los números se refieren a las temperaturas de alineamiento probadas.

8.8.4 Gen de la ciclopropano ácido graso sintasa

La figura 18 muestra la curva de temperaturas del gen de la enzima ciclopropano ácido graso sintasa. La temperatura óptima de alineamiento para la amplificación de este gen fue 55°C.

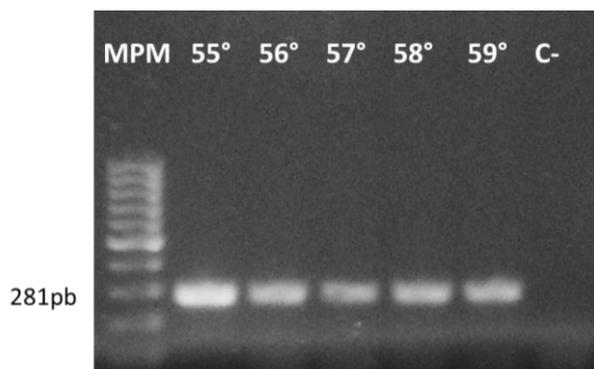


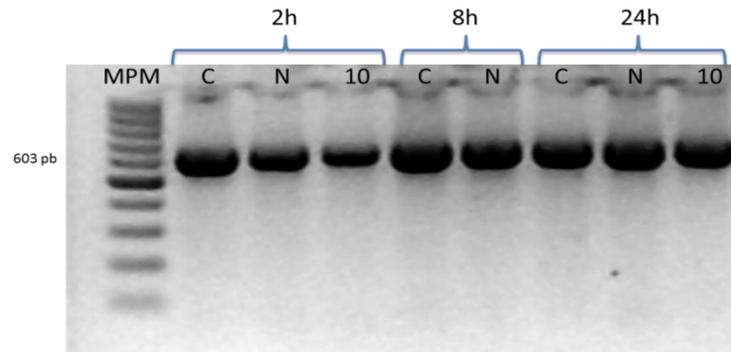
Figura 18. Curva de temperatura para el gen de la enzima ciclopropano ácido graso sintasa. Gel de agarosa al 1.5%. MPM=marcador de peso molecular; C-=control negativo.

8.9 RT-PCR

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación de cada uno de los cuatro genes relacionados con virulencia, se procedió a realizar RT-PCR de un solo paso para conocer si existía algún cambio en la expresión de estos genes después del tratamiento con P_4^2 o DHT.

La figura 19 muestra los resultados obtenidos después de la amplificación de un segmento de 603 pb del gen de rRNA 16S utilizado como control, después del tratamiento con P_4 . Asimismo, se muestran los resultados del análisis densitométrico respectivo.

A.



B.

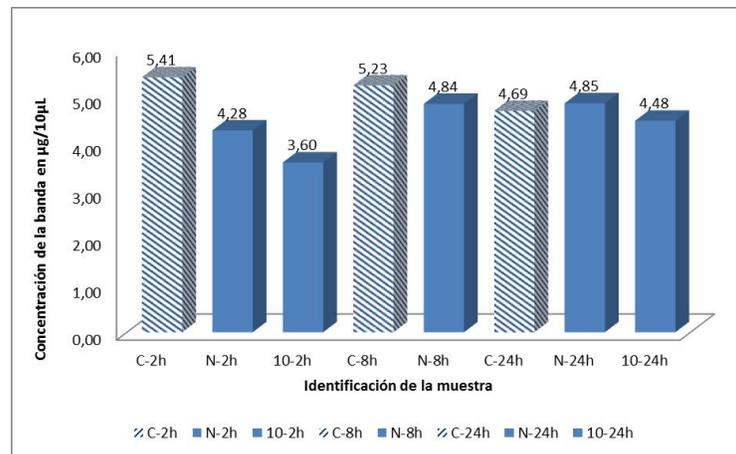
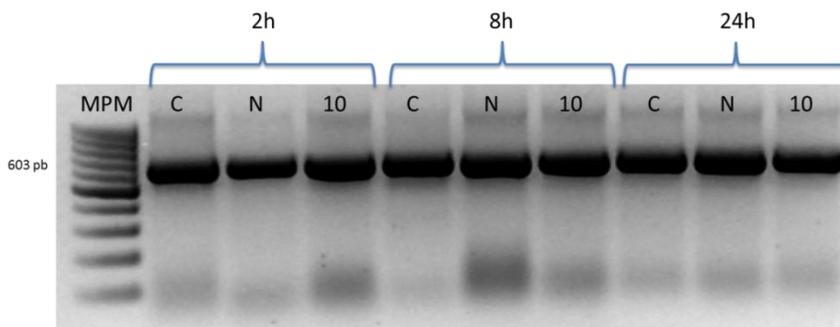


Figura 19. Amplificación de un segmento de 603 pb del rRNA 16S de *N. brasiliensis* cultivada con P_4 . A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con P_4 . B. Análisis densitométricos del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

²Sólo se muestran los resultados obtenidos del control sin hormona y del tubo tratado con P_4 a una concentración equivalente a la CSHN a las 8 horas de incubación.

La figura 20 muestra los resultados obtenidos de la amplificación del segmento del gen de rRNA 16S después del tratamiento con DHT, en conjunto con los resultados del análisis densitométrico de ese gel.

A.



B.

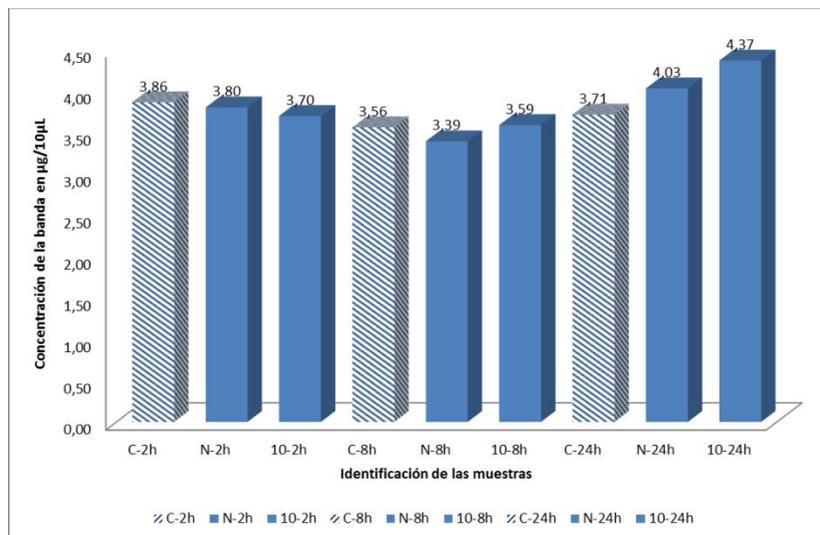


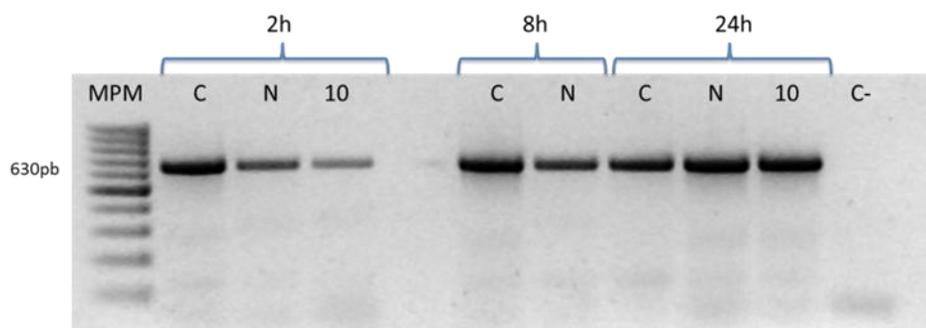
Figura 20. Amplificación de un segmento de 603 pb del rRNA 16S de *N. brasiliensis* cultivada con DHT. A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con DHT. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

Las figuras 19 y 20, mostraron que la cantidad agregada de RNA fue aproximadamente la misma y por lo tanto, los cambios visualizados en la expresión de los genes de interés, no se deben a cambios en la cantidad de material genético utilizado. Sin embargo, se efectuó una corrección sobre los valores densitométricos de los geles correspondientes a los genes

relacionados con virulencia, para eliminar cualquier sesgo en la interpretación del resultado.

La figura 21A, muestra los resultados obtenidos después de amplificar un segmento de 630pb del gen de la enzima superóxido dismutasa después de incubar la bacteria con P₄. Se observa una ligera disminución de la expresión a las 2 y 8 horas después de la adición de la hormona, la cual es proporcional a la concentración de hormona agregada. En contraste, a las 24 horas se observa un ligero aumento en la expresión después de la adición de la hormona. El análisis densitométrico (figura 21B), muestra la misma relación de aumento y disminución de la expresión, observada en el gel.

A.



B.

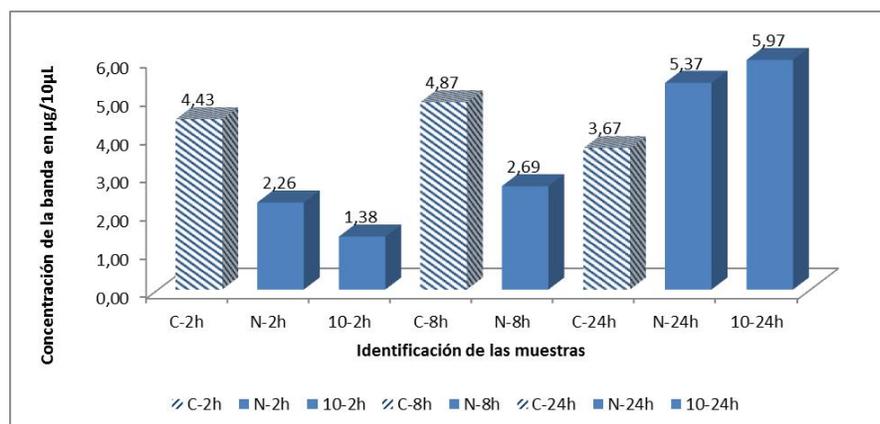
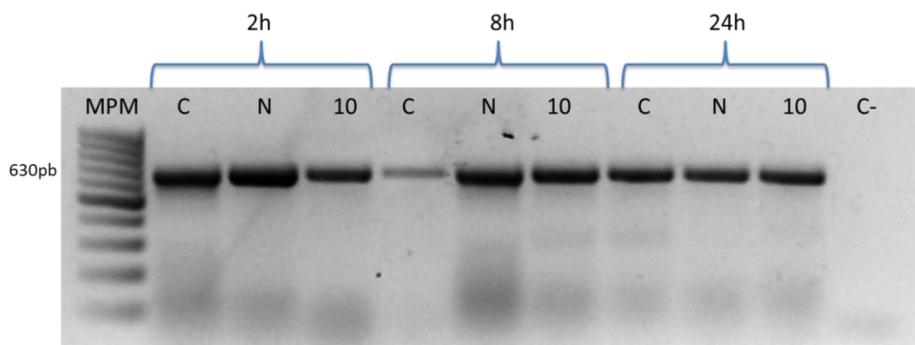


Figura 21. Amplificación de un segmento de 630pb del gen de la enzima superóxido dismutasa de *N. brasiliensis* cultivada con P₄. A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con P₄.

B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

Por otra parte, se observan ligeros cambios en la expresión del gen de superóxido dismutasa, en el caso del RNA obtenido de la bacteria incubada con DHT (figura 22A). La figura 22B muestra los resultados obtenidos del análisis densitométrico, en el cual se pueden apreciar ligeras disminuciones de la expresión del gen, con respecto al control sin hormona, en todos los tiempos de incubación; excepto, con respecto al control a las 8 horas.

A.



B.

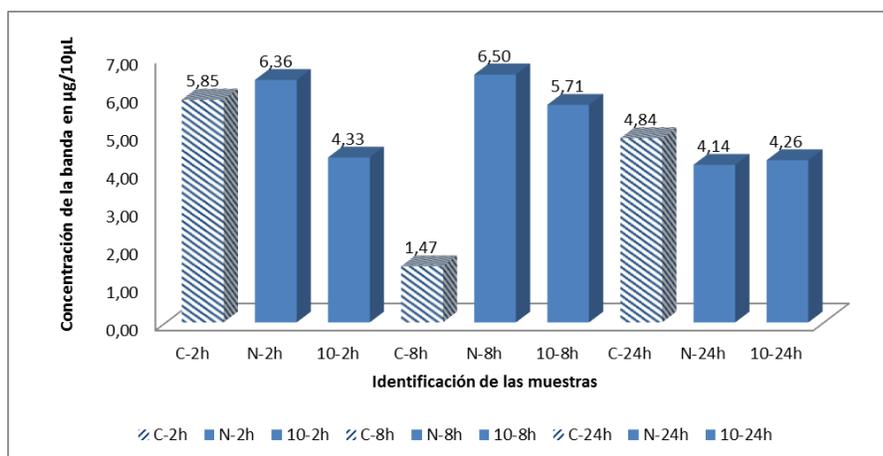
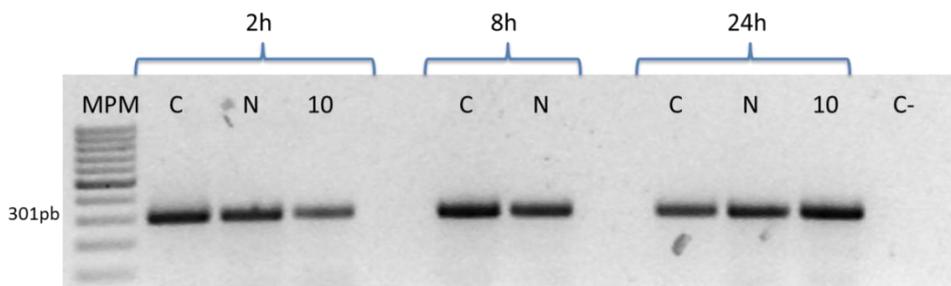


Figura 22. Amplificación de un segmento de 630pb del gen de la enzima superóxido dismutasa de *N. brasiliensis* cultivada con DHT. A. Gel de agarosa al 1,5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con DHT. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

En la figura 23A se muestra el gel obtenido después de realizar la RT-PCR, en el cual se amplificó un segmento del gen que codifica para la enzima tiorredoxina reductasa, a partir del RNA tratado con P₄. Se observa una ligera disminución en la expresión a las 2 y 8 horas, mientras que a las 24 horas de incubación hay un aumento de la expresión conforme

aumenta la concentración de hormona. La figura 23B muestra los análisis densitométricos del gel.

A.



B.

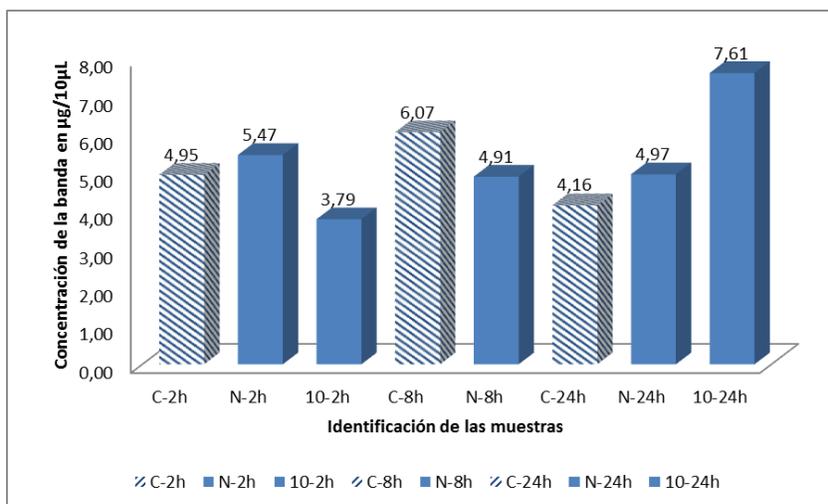
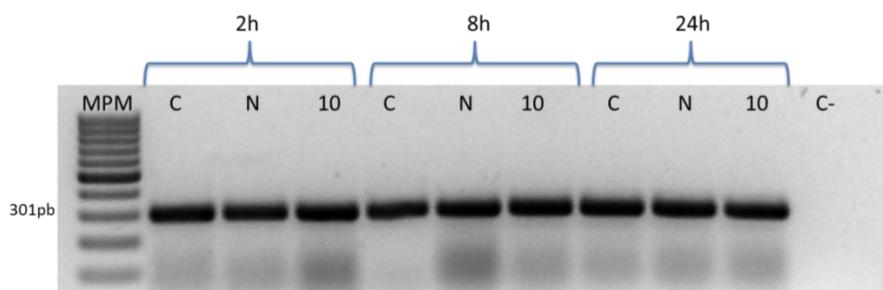


Figura 23. Amplificación de un segmento de 301pb del gen de la enzima tiorredoxina reductasa de *N. brasiliensis* cultivada con P₄. A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con P₄. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

Por el contrario, en el gel del RNA tratado con DHT, no se observan cambios en la expresión del gen de tiorredoxina reductasa, después de la adición de la hormona (figura 24A). El análisis densitométrico mostrado en la figura 24B, confirma que no hay cambios en la expresión de este gen después del tratamiento hormonal.

A.



B.

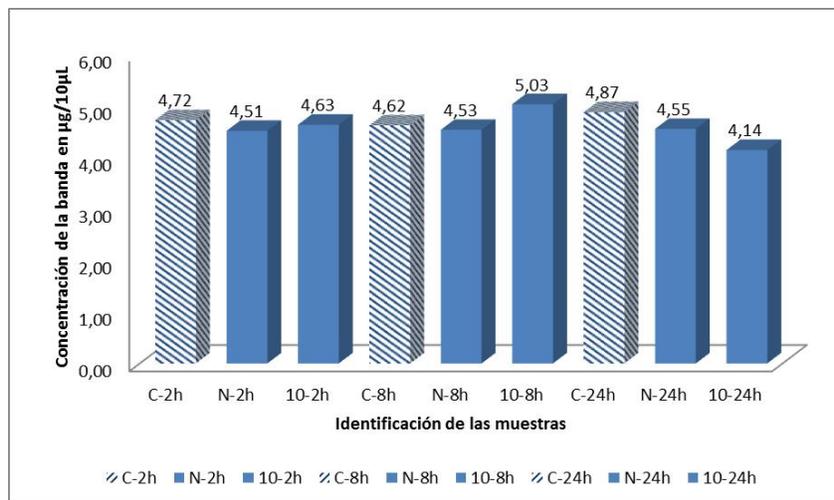
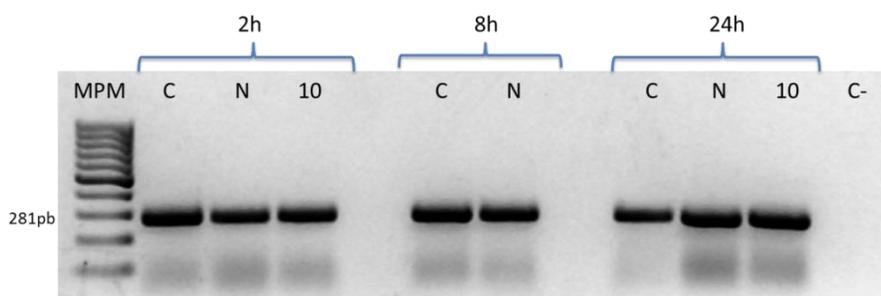


Figura 24. Amplificación de un segmento de 301pb del gen de la enzima tioredoxina reductasa de *N. brasiliensis* cultivada con DHT. A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con DHT. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

Los resultados de la amplificación del gen que codifica para la enzima ciclopropano ácido graso sintasa, mostraron ligeros cambios en la expresión después de la adición de P₄ (figura 25). Aunque los cambios no fueron muy evidentes en el gel (Figura 25A), después de realizar el análisis densitométrico del mismo (figura 25B), se puede apreciar un ligero aumento de la expresión, después del tratamiento hormonal, en todos los tiempos de incubación.

A.



B.

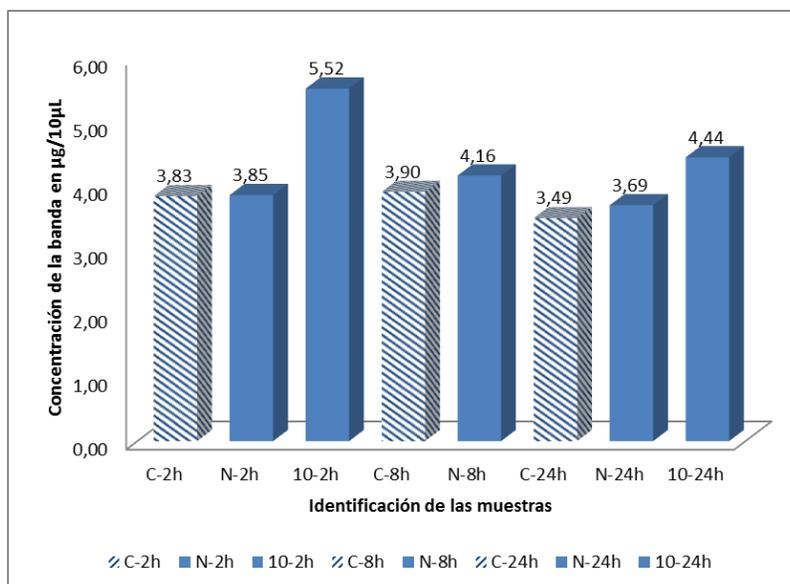
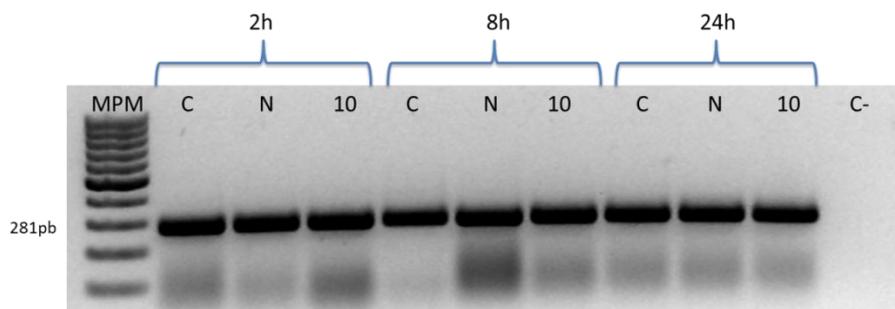


Figura 25. Amplificación de un segmento de 281pb del gen de la enzima ciclopropano ácido graso sintasa de *N. brasiliensis* cultivada con P₄. A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con P₄. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

La figura 26, muestra los resultados de la amplificación del gen que codifica para la enzima ciclopropano ácido graso sintasa, a partir del RNA tratado con DHT. No se observaron grandes cambios en la expresión de este gen después del tratamiento hormonal. El análisis densitométrico (figura 26B), demuestra que las concentraciones de cada banda son similares, en todos los tiempos de incubación.

A.



B.

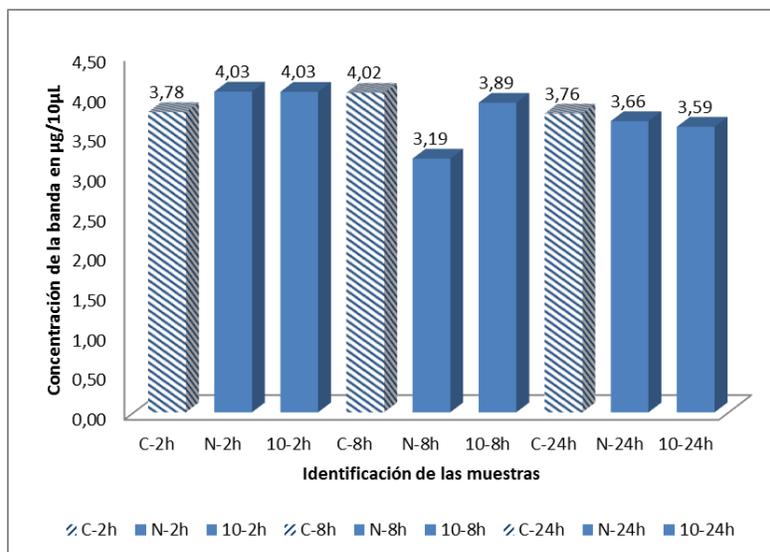
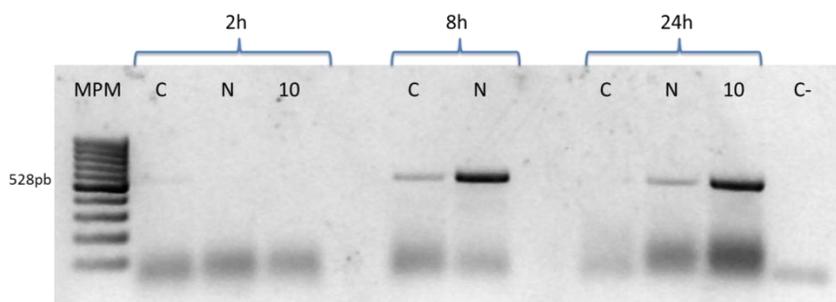


Figura 26. Amplificación de un segmento de 281pb del gen de la enzima ciclopropano ácido graso sintasa de *N. brasiliensis* cultivada con DHT. A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con DHT. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

En la figura 27 se observan los resultados obtenidos después de realizar la RT-PCR para el gen que codifica la enzima ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α , del RNA de la bacteria incubada con P_4 . Se observa muy poca amplificación a las 2 horas en el control sin hormona, y en los carriles correspondientes a la CSHN y 10x CSHN no se observa ningún rastro de amplificación. A las 8 horas, se observa un aumento de la expresión después de adicionar la hormona a una CSHN comparado con el control, y lo mismo sucede a las 24 horas, a una CSHN y 10x CSHN aumenta la expresión (figura 27A). La figura 27B, muestra el análisis densitométrico de este gel.

A.



B.

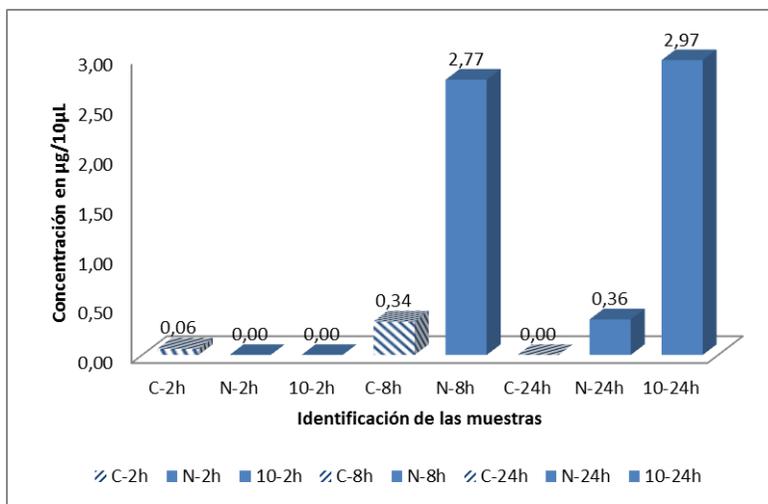
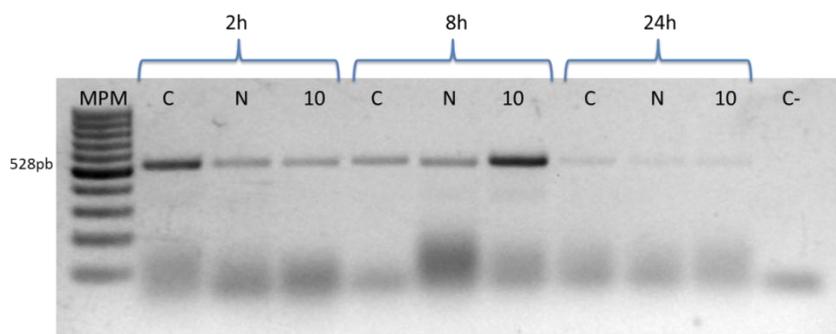


Figura 27. Amplificación de un segmento de 528pb del gen de la enzima ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α de *N. brasiliensis* cultivada con P_4 . A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con DHT. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

La figura 28 muestra los resultados de la amplificación del gen de ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α , a partir del RNA tratado con DHT. Se observa una disminución de la expresión del gen conforme aumenta el tiempo de incubación (figura 28A). Sin embargo, a las 8 horas de incubación en la concentración de hormona correspondiente a 10x CSHN, hay un marcado aumento de expresión. La figura 28B muestra los resultados de la densitometría del gel.

A.



B.

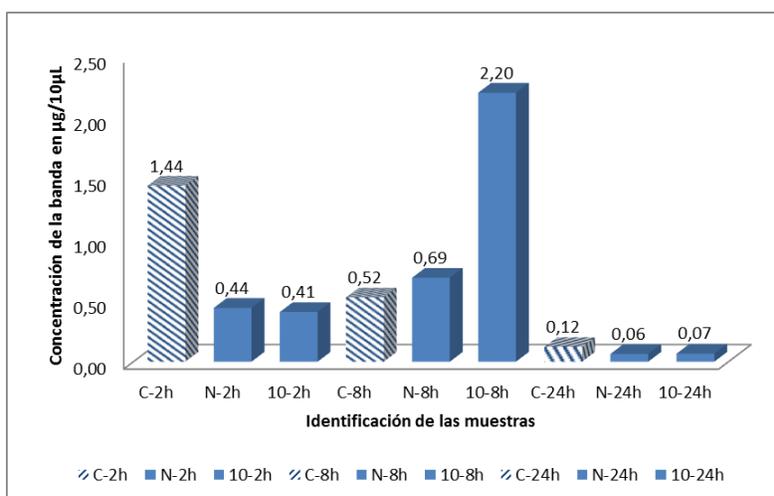
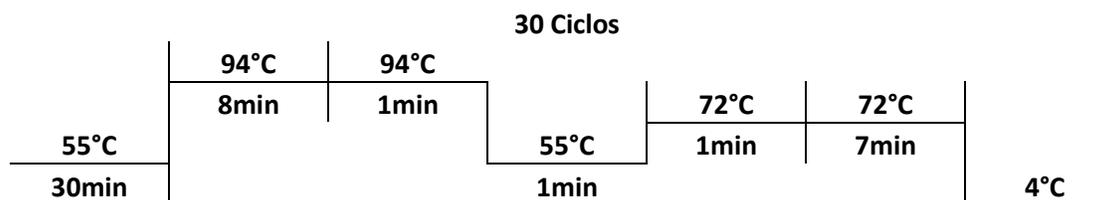


Figura 28. Amplificación de un segmento de 528pb del gen de la enzima ribonucleosido difosfato reductasa subunidad α de *N. brasiliensis* cultivada con DHT. A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de amplificación después del tratamiento con DHT. B. Análisis densitométrico del gel. C=control sin hormona, N=concentración de hormona equivalente a CSHN, 10=concentración de hormona equivalente a 10 veces la CSHN.

Para confirmar el hallazgo del cambio de expresión de la enzima rRNA adenina (N6) metiltransferasa, encontrado en los resultados obtenidos del despliegue diferencial con primers aleatorios, después del tratamiento con P₄ (tabla 8), se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen, se estandarizaron las condiciones de amplificación y se realizó una RT-PCR.

Las condiciones bajo las cuales se realizó la RT-PCR fueron las siguientes³:

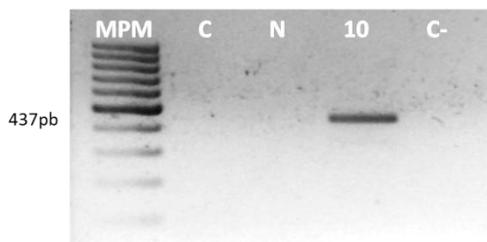


La tabla 10 muestra los oligonucleótidos utilizados y la figura 29, los resultados obtenidos.

Tabla 10. Secuencia de oligonucleótidos específicos para el gen de la enzima rRNA adenina (N6) metiltransferasa

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Producto esperado (pb)
MetilT-F	TCCGAGCCGATTTACACAAA	437
MetilT-R	GGTGATGCCTGTGACGTGTA	

A.



B.

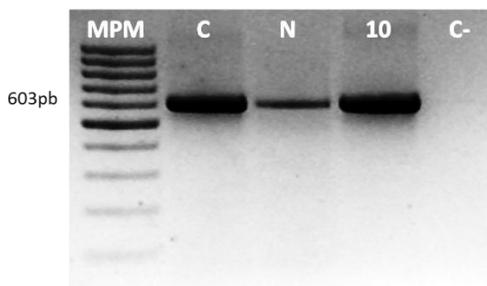


Figura 29. Amplificación del gen de la enzima rRNA adenina (N6) metiltransferasa y del gen control (rRNA 16S). A. Gel de agarosa al 1.5% que muestra la amplificación por RT-PCR de un segmento de 437 pb del gen de la enzima rRNA adenina (N6) metiltransferasa a partir de RNA tratado con P₄ a las 8 horas de incubación. (B) Amplificación del control interno de expresión. Segmento de 603 pb del gen de rRNA 16S.

³ La mezcla de reacción utilizada para la RT-PCR son las mismas que las descritas en materiales y métodos.

Como se observa en la figura 29A, por este método se confirmó que sólo hubo expresión del gen de la rRNA adenina (N6) metiltransferasa, cuando la concentración de progesterona fue equivalente a 10 veces la CSHN, a las 8 horas de incubación; corroborando el hallazgo encontrado en los experimentos de despliegue diferencial con primers aleatorios, específicamente con la combinación Ea8-Es5 mostrados en la figura 9C (banda 11).

La figura 29B, muestra la existencia de RNA en todos los tubos (correspondientes a control sin hormona, con P₄ a concentración normal y P₄ 10x), lo cual permite afirmar que la ausencia de amplificación no se debe a la falta de material genético, sino a la ausencia de expresión del gen bajo esas condiciones de crecimiento.

9 DISCUSIÓN

Varios estudios han mostrado que los hombres son más susceptibles que las mujeres a contraer infecciones producidas por parásitos, virus, hongos y bacterias, y tal diferencia se atribuye en parte al efecto que tienen las hormonas sexuales sobre la regulación de la respuesta inmune, y por lo tanto éstas influyen en la susceptibilidad o resistencia del huésped (32, 79).

Entre las infecciones bacterianas se encuentra el actinomicetoma, que es una enfermedad inflamatoria crónica frecuente en México, y que descrita en diversos estudios epidemiológicos es predominante en hombres (3, 19, 80). En México, *Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal del actinomicetoma (3, 81). Se caracteriza por ser una bacteria filamentosa Gram positiva, con un genoma de 9.436.348 pb, en donde la mayor parte de las secuencias codificantes identificadas, codifican para proteínas hipotéticas (5745/8414) (7).

La explicación del predominio del actinomicetoma en hombres no es muy clara. Sin embargo, ha sido comúnmente atribuida a la mayor exposición de los hombres a la fuente de infección (generalmente el suelo) durante el desarrollo de sus actividades en el campo. En contraste, se ha observado que en áreas en las cuales el micetoma es muy frecuente como Sudán, en donde no existe diferencia de exposición al microorganismo entre mujeres y hombres, la mayor incidencia sigue siendo en hombres (19). Lo anterior, conduce a suponer que las mujeres tienen una resistencia natural a la infección, tal vez, debido a las diferencias en los niveles de hormonas sexuales que pueden regular la respuesta inmune y el comportamiento del agente infectante (66). También se han reportado algunos casos en los cuales durante el embarazo, el desarrollo del micetoma tiende a exacerbarse, lo cual puede explicarse parcialmente por la condición de inmunosupresión propia de las mujeres en este estado y que pudiera deberse a la acción de la progesterona (19, 32, 82).

Por otro lado, se ha observado que las hormonas sexuales pueden modificar la expresión de genes de varios microorganismos (33). Un estudio reciente mostró el cambio en la expresión de genes de *Chlamydia trachomatis* después del tratamiento con estrógenos y

progesterona. A través del uso de microarreglos se encontró que estas hormonas modificaron la expresión de aproximadamente el 25% de los genes de la bacteria (59).

Asimismo, se han hecho reportes de la presencia de proteínas de unión a hormonas sexuales en procariotas como *S. hydrogenans* y *P. aeruginosa*, que podrían contribuir al entendimiento del mecanismo de acción de las hormonas en estos microorganismos (62-64).

A pesar de que varios reportes ponen en evidencia el efecto de las hormonas sobre diversas bacterias, poco se ha estudiado en este ámbito con *N. brasiliensis*. Un estudio realizado en 1995 mostró el efecto de las testosterona, progesterona y estrógenos sobre el crecimiento de esta bacteria, y el desarrollo del actinomicetoma experimental (66).

El despliegue diferencial de genes es una técnica empleada para el estudio del cambio en la expresión genética inducido bajo ciertas condiciones experimentales. Inicialmente fue descrita por Liang y Pardee, para el estudio de la expresión diferencial en células eucariotas (71). Sin embargo, la ausencia de poliadenilación en las células procariotas dificulta este procedimiento. La utilización de oligonucleótidos aleatorios ofrece una alternativa para el uso de esta metodología en procariotas y ha facilitado en cierta medida el desarrollo de estudios de expresión diferencial en este grupo de organismos (70). Actualmente, existen técnicas como los microarreglos y la secuenciación de siguiente generación que permiten el estudio de los cambios en la expresión genética en organismos cuyo genoma haya sido secuenciado.

A pesar de que el despliegue diferencial es una técnica descrita hace varios años, ofrece la ventaja de dar una visión general y cualitativa de la expresión genética bajo diversas condiciones experimentales.

En el presente trabajo, se demostró mediante el uso de la técnica de despliegue diferencial con primers aleatorios (RAP-PCR), que la progesterona y la dihidrotestosterona modifican la expresión de genes de *N. brasiliensis*. Un total de 25 fragmentos mostraron cambio en la expresión genética. El tiempo en el cual se evidenció el cambio fue variable, pero en general, con progesterona se observaron mayores cambios en las primeras horas del estudio (2 y 8 horas), y con dihidrotestosterona a las 2 y a las 24 horas.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los alineamientos de las secuencias, la mayoría correspondieron a proteínas hipotéticas; de los 25 fragmentos que mostraron cambios en la expresión, 20 fueron exitosamente clonados y secuenciados, y 13 correspondieron a proteínas hipotéticas. Por lo temprano de su expresión, estas proteínas podrían estar participando en el metabolismo y/o virulencia de *N. brasiliensis* y por tanto estar modulando el comportamiento del microorganismo en el transcurso de la infección. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para corroborar la función de estas proteínas y así poder asociarlas o no, con la fisiopatogenia de la enfermedad.

Por otro lado, se encontraron tres secuencias que presentaron homología con una región del rRNA 16S y cuya expresión fue modificada después del tratamiento con las dos hormonas. El rRNA 16S desempeña un papel activo en la función de la subunidad 30s del ribosoma (83), interactúa con la subunidad 50s y es importante para el inicio de la traducción, debido a que en el extremo 3' contiene la secuencia complementaria a la secuencia Shine-Delgarno del mRNA (84). Esta modificación de la expresión inducida por hormonas podría favorecer o no la síntesis proteica en alguna etapa del crecimiento bacteriano y, por lo tanto, podría encontrarse una relación con la fisiopatogenia de la enfermedad.

Asimismo, tres fragmentos que mostraron expresión diferencial después de la exposición bacteriana a las hormonas esteroides, presentan homología con proteínas de las cuales se conoce su función y se mencionan a continuación:

rRNA adenina-N6 metiltransferasa

La rRNA adenina-N6 metiltransferasa es una enzima que cataliza la dimetilación de un residuo de adenina del rRNA 23S (85). Pertenece a una familia de metiltransferasas o metilasas denominada Erm (metiltransferasas de resistencia a eritromicina), las cuales usan S-adenosil metionina como donador de grupos metilo para modificar un residuo de adenina (N6) en el rRNA 23S (86).

La metilación del residuo de adenina en el rRNA 23S induce la resistencia frente al grupo de antibióticos macrólidos y se ha observado el desarrollo de resistencia cruzada con las lincosamidas y estreptograminas B (87). En *E. coli*, la metilación modifica el residuo de adenina 2058 (A2058) o su equivalente en otro grupo de bacterias, el cual se encuentra en

una región conservada del rRNA 23S, implicada en la función de peptidil transferasa del ribosoma.

Los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos que interfieren con la función de peptidil transferasa del ribosoma inhibiendo la elongación del péptido naciente durante la síntesis de proteínas (88). Se ha sugerido que la metilación del residuo de adenina en el rRNA 23S induce un cambio conformacional en la subunidad 50S del ribosoma que evita la unión del antibiótico a su sitio blanco (88). Las lincosamidas y estreptograminas B tienen sitios de unión al ribosoma que se superponen con el sitio de unión de los macrólidos, por lo que dicho cambio conformacional resulta en una resistencia cruzada con estos antibióticos (89).

Los genes que codifican las metiltransferasas de la familia Erm son inducibles (89). Otros estudios han demostrado que las bacterias Gram positivas, bajo condiciones normales de sensibilidad a antibióticos, carecen de residuos de adenina mono o dimetilados en su rRNA 23S (90). Cuando estas bacterias son cultivadas en presencia de eritromicina, aparece un residuo de adenina dimetilado en el rRNA 23S; este cambio también es observado en los aislamientos clínicos resistentes de bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (90). La naturaleza inducible de estos genes fue explicada por Gupta y cols, quienes sugieren que la expresión de los mismos es energéticamente desfavorable para los microorganismos y afecta la composición del proteoma celular (89).

Por otro lado, se sabe que los microorganismos productores de antibióticos, como los actinomicetos, tienen mecanismos que evitan el “suicidio”, es decir, la acción de los antibióticos producidos por ellos mismos (86). Existen varios mecanismos que auto-protegen a estos organismos de la acción de los antibióticos: 1) la modificación química de los antibióticos, 2) bombas de eflujo que expulsan el antibiótico al exterior de la célula, y por último 3) la modificación del sitio blanco de unión del antibiótico (91). Un ejemplo de este último mecanismo sucede en *Saccharopolyspora erythraea*, el actinomiceto productor de eritromicina, el cual mediante una rRNA metiltransferasa, dimetila un residuo de adenina en el rRNA 23S, confiriéndole resistencia al macrólido (91).

En el presente trabajo se evidenció un cambio en la expresión de la enzima rRNA adenina N6 metiltransferasa de *N. brasiliensis* después del tratamiento con progesterona, a una

concentración equivalente a 10 veces la concentración sérica humana normal en mujeres. En el ensayo de confirmación de la expresión de este gen, utilizando oligonucleótidos específicos, se corroboró que la expresión sólo sucedía a esta concentración y no en el control sin hormona o con progesterona a la concentración normal. Es posible que la progesterona esté jugando un papel en la inducción del gen, el cual es de naturaleza inducible ya que es energéticamente costoso expresarlo bajo condiciones que no lo requieren. Existe un reporte en la literatura de *N. brasiliensis* como productora de eritromicina (92), lo que sugiere que la expresión de esta enzima podría ser un mecanismo de auto-protección frente al antibiótico. Sin embargo, como no existe evidencia de que la bacteria estuviera produciendo eritromicina en el momento de la incubación, es imposible confirmar esta premisa. Lo que se podría sugerir es que la progesterona a esa concentración y en ese tiempo de incubación estuviera actuando similar al antibiótico y conllevara a la expresión de dicho gen; o que participe en los mecanismo de regulación de la expresión del gen.

Acil-CoA deshidrogenasa

La acil-CoA deshidrogenasa es una flavoproteína que participa en la deshidrogenación de los ésteres de acil-CoA durante el catabolismo de los ácidos grasos y aminoácidos (93). Está presente en humanos, plantas, bacterias, hongos y parásitos, lo que pone en evidencia su importancia para el metabolismo desde la vida temprana (94).

Aunque esta familia de enzimas y su importancia en humanos está bien descrita (95), en bacterias no es mucho lo que se ha explorado. Un estudio realizado en 1969 muestra la participación de esta enzima en el control del metabolismo de los ácidos grasos en *E. coli*. Se exploró el crecimiento de la bacteria en medios que contenían palmitato como fuente de carbono, y se observó que su presencia en el medio inducía las enzimas necesarias para llevar a cabo la β -oxidación de ácidos grasos (incluyendo la acil-CoA deshidrogenasa) y para la obtención de energía (96).

Un estudio realizado con *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces avermitilis* demostró el papel de la acil-CoA deshidrogenasa en el metabolismo de aminoácidos de cadena

ramificada como leucina, valina e isoleucina. En este estudio, una cepa de *S. avermitilis* mutante para un gen de la acil-CoA deshidrogenasa fue incapaz de crecer en un medio sólido mínimo que contenía valina, leucina o isoleucina como única fuente de carbono; estos resultados sugieren que la acil-CoA deshidrogenasa en estos microorganismos tiene una amplia especificidad por el sustrato (diferente a lo que sucede en humanos cuyas deshidrogenasas son específicas de un sustrato) y que participa en el catabolismo de esos tres aminoácidos (97). En este estudio también mencionan que en trabajos previos han observado una relación entre el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y la producción de antibióticos: la vía de degradación de los aminoácidos provee de algunos sustratos acil-CoA que son utilizados para la síntesis del esqueleto de carbono del antibiótico (97).

Desde hace varios años se sabe que las actinobacterias tienen la habilidad de metabolizar esteroides (98). *M. tuberculosis* cataboliza el colesterol para obtener energía y algunos intermediarios para la síntesis de lípidos, proceso importante en la virulencia (99). El genoma de *M. tuberculosis* contiene genes que codifican para diversas enzimas que participan en el metabolismo de lípidos (100). Recientemente, fue descrita una familia de acil-CoA deshidrogenasas que podría participar en la degradación de la cadena lateral del colesterol (101). A diferencia de otras acil-CoA deshidrogenasas que se caracterizan por tener una estructura homotetramérica u homodimérica, las acil-CoA deshidrogenasas de *M. tuberculosis* que participan en el catabolismo del colesterol, son heterotetraméricas y su expresión es regulada por colesterol *in vitro* (101).

Nocardia brasiliensis, como otros actinomicetos se caracteriza por tener una gran cantidad de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos. En su genoma se han identificado genes que codifican para dichas enzimas, incluyendo aquellas que participan en la β -oxidación como las acil-CoA deshidrogenasas (7). En el presente trabajo, se encontró que la progesterona aumentó la expresión de un gen que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa de *N. brasiliensis*. Este cambio de expresión podría ser debido a que la progesterona al ser un derivado del colesterol y tener una estructura química similar estuviera favoreciendo la expresión de ese gen.

Subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa

La piruvato deshidrogenasa es un complejo multienzimático que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA, CO₂ y NADH. El complejo está compuesto por 3 subunidades (102, 103):

1. Subunidad E1: piruvato descarboxilasa
2. Subunidad E2: dihidrolipoamida acetiltransferasa
3. Subunidad E3: dihidrolipoamida deshidrogenasa

La subunidad E1 cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato, seguida de la acilación de la lipoamida unida a la subunidad E2. La subunidad E2 transfiere del grupo acilo (unido a la lipoamida) a la coenzima A, dando lugar a la formación de la acetil-coA. Por último la subunidad E3 cataliza la oxidación de la lipoamida con la formación de NADH (102).

El piruvato es un intermediario del metabolismo central en organismos eucariotas y procariotas. Bajo condiciones aerobias el piruvato es convertido a acetil-CoA a través del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa; este último puede participar en la vía de los ácidos tricarboxílicos y servir como metabolito clave en diversas vías anabólicas, como la síntesis de aminoácidos y la síntesis de ácidos grasos (104).

Estudios realizados con *Corynebacterium glutamicum*, una bacteria taxonómicamente relacionada con *N. brasiliensis*, han demostrado la importancia del complejo piruvato deshidrogenasa y particularmente de la subunidad E1 en el crecimiento bacteriano. Estudios con mutantes para esta enzima demostraron que en condiciones de crecimiento donde la glucosa, el piruvato o el lactato son la única fuente de energía, la piruvato deshidrogenasa es la principal enzima responsable de proveer acetil-CoA durante el crecimiento (105).

Otros estudios han demostrado la presencia de la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa en la membrana celular de algunos microorganismos, y se cree que podrían participar activamente en la adhesión a los tejidos blanco del hospedero (106, 107). La adhesión de las bacterias a los tejidos del hospedero es un paso esencial y previo a la colonización y el desarrollo de infecciones. En general, se ha visto que las bacterias patógenas interactúan con los componentes de la matriz extracelular del tejido huésped

principalmente con la fibronectina, dando lugar al inicio y establecimiento de la infección. *Mycoplasma pneumoniae*, una bacteria patógena para los humanos, media su adhesión a las células blanco a través de proteínas de adhesión similares a las encontradas en las células eucariotas. Sin embargo, recientemente se encontró que la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa, la cual se creía era solamente citoplásmica, se encuentra expresada en la superficie del microorganismo y es capaz de unirse a la fibronectina. Por lo anterior, se cree que podría estar involucrada en la adhesión celular y por tanto le permitiría a la bacteria colonizar e invadir el tejido blanco (107).

Por otro lado, *Lactobacillus plantarum*, una especie con actividad probiótica, también expresa la subunidad E1(β) de la piruvato deshidrogenasa en su superficie celular. En el mismo estudio se demostró que dicha proteína une a la fibronectina. También se observó que cepas mutantes para el gen que codifica la proteína fueron menos eficientes para adherirse a pozos recubiertos con fibronectina, lo que demuestra su papel en la adhesión celular (106).

Algunos estudios han mostrado que enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs como la malato deshidrogenasa pueden ser reguladas por hormonas. Por ejemplo, se sabe que en mamíferos esta enzima puede ser regulada por hormonas tiroideas y esteroides, las cuales incrementan la transcripción genética y aumentan la actividad de la enzima (108).

En el presente estudio se mostró que después del tratamiento de los cultivos de *N. brasiliensis* con DHT, hubo un aumento en la expresión de la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa. Podría sugerirse una posible regulación de la expresión del gen mediada por esta hormona y, por tanto, una ventaja sobre el metabolismo energético y el crecimiento bacteriano.

Análisis de la expresión de genes específicos

En general, no se observaron cambios después del tratamiento hormonal en la expresión de los genes que codifican para la tiorredoxina reductasa y ciclopropano ácido graso sintasa después del tratamiento del cultivo con DHT.

En contraste, el gen que codifica para la superóxido dismutasa mostró un ligero cambio en la expresión después del tratamiento de *N. brasiliensis* con progesterona a las 2 y 8 horas de incubación. Se observó que la expresión del gen disminuía conforme la concentración de hormona aumentaba. La superóxido dismutasa es una enzima que participa en la respuesta al estrés oxidativo; es considerada un factor de virulencia porque permite a la bacteria sobrevivir dentro de los macrófagos durante la infección (77). Un estudio previo sobre la expresión del gen de la superóxido dismutasa durante la infección de macrófagos peritoneales murinos con *N. brasiliensis*, mostró que la expresión de este gen en la primera hora de la infección disminuyó, comparado con el nivel de expresión del gen *hsp* y del gen del rRNA 16S. Los autores sugieren que en la primera hora de infección de los macrófagos, *N. brasiliensis* desarrolla una respuesta adaptativa a las condiciones de estrés, la cual induce un aumento en la expresión de genes “SOS” como *hsp*; sin embargo la transcripción del gen de SOD no se conserva y en cambio disminuye durante la primera hora de infección (77). Con los resultados del presente trabajo, no es posible afirmar que la disminución de la expresión del gen de la superóxido dismutasa se deba a una condición de adaptación o sea el resultado del tratamiento hormonal, por lo que se requieren estudios adicionales para corroborar este hallazgo.

Por otra parte, el gen que codifica para la subunidad α de la ribonucleósido difosfato reductasa mostró cambios en la expresión después del tratamiento del cultivo de *N. brasiliensis* con progesterona y dihidrotestosterona. Esta enzima es la responsable de la síntesis de deoxirribonucleótidos en procariotas y eucariotas (109). Se han descrito varias clases: la clase I (subdividida en Ia y Ib) constituidas por enzimas oxígeno-dependientes que se encuentran en eucariotas, algunas bacterias y virus; la clase II, las cuales son independientes de oxígeno y son encontradas en algunas bacterias, arqueas y organismos unicelulares; y la clase III, enzimas sensibles al oxígeno encontradas en anaerobios (110). La clase Ia de estas enzimas consiste en dos homodímeros presentes en una estructura $\alpha_2\beta_2$. La subunidad α de la ribonucleósido difosfato reductasa es codificada por el gen *nrDA* y contiene el sitio catalítico y sitios de unión para efectores y reguladores alostéricos (111). En un estudio se encontró que en *Streptomyces clavuligerus* el gen *nrDA* es expresado en etapas tempranas del crecimiento exponencial, pero su expresión cae en las etapas posteriores del crecimiento (112). También se ha visto que la expresión de estas enzimas es

regulada por mecanismos alostéricos y por proteínas como NrdA que regula la transcripción del gen (110, 113). Además el daño del DNA también conduce al aumento en la expresión del gen, ya que los precursores desoxirribonucleotídicos sintetizados por esta enzima son necesarios para la reparación del material genético (114). A pesar de que en este estudio se notó un cambio en la expresión del gen *nrdA* después de cultivar a *N. brasiliensis* en presencia de hormonas esteroides, no es posible atribuir tal cambio al efecto hormonal. En el gel correspondiente al tratamiento de la bacteria con DHT se puede observar una disminución de la expresión del gen en el transcurso del tiempo en el cual fue extraído el RNA; podría decirse que conforme aumenta el tiempo de incubación, las bacterias que se encontraban en fase exponencial de crecimiento, empiezan a llegar a fase estacionaria y por tanto la expresión del gen disminuye, tal y como lo reportaron Borovok y cols en 2002, y no por el efecto que la hormona pudiera estar ejerciendo sobre la expresión de éste gen. Igualmente, son necesarios estudios adicionales para definir si el cambio en la expresión de este gen es el resultado del efecto hormonal o del tiempo de incubación.

10 CONCLUSIONES

1. En este trabajo se demostró que la expresión genética de *Nocardia brasiliensis* es modificada en presencia de progesterona y dihidrotestosterona.
2. La técnica de RAP-PCR mostró ser de utilidad para evidenciar cambios en la expresión genética en presencia/ausencia de hormonas esteroides. Se lograron detectar 25 fragmentos expresados diferencialmente, de los cuales 20 fueron clonados y secuenciados con éxito.
3. Las hormonas esteroides sexuales indujeron cambios en la expresión de genes correspondientes, en su mayoría a proteínas hipotéticas (13/20). Asimismo, tres genes mostraron homología con la secuencia del rRNA 16S y cuatro genes con proteínas de función conocida: un gen para la rRNA adenina-N6 metiltransferasa, un gen para la acil-CoA deshidrogenasa y dos genes para la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa.
4. Aunque el cambio en la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente pudiera haber sido inducido por las hormonas, es necesario realizar experimentos adicionales que nos permitan confirmar estos resultados, así como dilucidar el papel de las proteínas correspondientes en la fisiopatogenia de la enfermedad.
5. En el análisis del cambio de expresión de genes específicos relacionados con virulencia, después de cultivar a *N. brasiliensis* en presencia de progesterona o dihidrotestosterona, se observaron cambios en genes que codifican para la enzima superóxido dismutasa y la subunidad α de la ribonucleósido difosfato reductasa. Sin embargo, por el momento, no es posible atribuir el cambio en la expresión al efecto hormonal, por lo que se requieren estudios adicionales para confirmar estos hallazgos.

11 PERSPECTIVAS

1. Validar los resultados del presente trabajo mediante qPCR.
2. Determinar los mecanismos mediante los cuales las hormonas esteroides sexuales actúan sobre *Nocardia brasiliensis*, a través de la búsqueda de receptores y/o proteínas de unión a hormonas.
3. Estudiar la expresión diferencial de proteínas después del estímulo hormonal, y hacer una correlación con los resultados de cambios en la expresión genética encontrados en este estudio.
4. Determinar si los genes regulados por las hormonas sexuales son importantes para el desarrollo del micetoma, y por lo tanto constituyen un blanco potencial para establecer nuevas estrategias terapéuticas.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev. 1994;7(2):213.
2. Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. Microbes Infect. 2000 Sep;2(11):1373-81.
3. Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, et al. [Update on the epidemiology of mycetoma in Mexico. A review of 3933 cases]. Gac Med Mex. 2013 Sep-Oct;149(5):586-92.
4. Wilson JW. Nocardiosis: updates and clinical overview. Mayo Clin Proc. 2012 Apr;87(4):403-7.
5. Lichon V, Khachemoune A. Mycetoma : a review. Am J Clin Dermatol. 2006;7(5):315-21.
6. Koneman E, Allen S. Koneman Diagnóstico Microbiológico. In: Panamericana EM, editor. 6ta ed. ed2008. p. 1431-2.
7. Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Ocampo-Candiani J. Complete genome sequence analysis of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 reveals a saprobic lifestyle and the genes needed for human pathogenesis. PLoS One. 2013;8(6):e65425.
8. Beaman BL, Black CM, Doughty F, Beaman L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun. 1985 Jan;47(1):135-41.
9. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. Free Radic Biol Med. 2013 Jul 27.
10. Emeruwa AC. Isolation and some properties of beta-hemolysin produced by *Nocardia asteroides*. Mycopathologia. 1986 Jul;95(1):29-35.
11. Spargo BJ, Crowe LM, Ioneda T, Beaman BL, Crowe JH. Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Feb 1;88(3):737-40.

12. Hunter RL, Armitige L, Jagannath C, Actor JK. TB research at UT-Houston--a review of cord factor: new approaches to drugs, vaccines and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Dec;89 Suppl 1:S18-25.
13. Kan-Sutton C, Jagannath C, Hunter RL, Jr. Trehalose 6,6'-dimycolate on the surface of *Mycobacterium tuberculosis* modulates surface marker expression for antigen presentation and costimulation in murine macrophages. *Microbes Infect*. 2009 Jan;11(1):40-8.
14. Trevino-Villarreal JH, Vera-Cabrera L, Valero-Guillen PL, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* cell wall lipids modulate macrophage and dendritic responses that favor development of experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2012 Oct;80(10):3587-601.
15. Zhang F, Xie JP. Mammalian cell entry gene family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Biochem*. 2011 Jun;352(1-2):1-10.
16. Bourgeois L, Beaman BL. Probable L-forms of *Nocardia asteroides* induced in cultured mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun*. 1974 Mar;9(3):576-90.
17. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC. Mycetoma. *Clin Dermatol*. 2007 Mar-Apr;25(2):195-202.
18. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E, Salinas MC. Actinomycetoma and advances in its treatment. *Clin Dermatol*. 2012 Jul-Aug;30(4):372-81.
19. Sande AHFWJvd. The Epidemiology of Mycetoma. *Current fungal infection reports*. 2012 2012;6:320-7.
20. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):259-82.
21. Mendez Tovar LJ, López Martínez, R., Hernández-Hernández, F. . Actualidades en Micología Médica. Cuarta Edición ed. México2008. p. 167-71.
22. Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J Clin Microbiol*. 1993 Nov;31(11):2901-6.
23. Dennis L. Kasper EB, Anthony S. Fauci, Stephen L., Hauser DLL, J. Larry Jameson, y Kurt J. Isselbacher, Eds. HARRISON: Principios de Medicina Interna 2005.

24. Melmed S, Conn P. ENDOCRINOLOGY: Basic and Clinical Principles 2005.
25. Hiipakka RA, Liao S. Molecular mechanism of androgen action. Trends Endocrinol Metab. 1998 Oct 1;9(8):317-24.
26. Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, et al. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000 Nov 30;74(5):279-85.
27. Jacobsen BM, Horwitz KB. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. Mol Cell Endocrinol. 2012 Jun 24;357(1-2):18-29.
28. Wierman ME. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. Adv Physiol Educ. 2007 Mar;31(1):26-33.
29. van de Wijngaart DJ, Dubbink HJ, van Royen ME, Trapman J, Jenster G. Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. Mol Cell Endocrinol. 2012 Apr 16;352(1-2):57-69.
30. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. Endocr Rev. 2007 Dec;28(7):726-41.
31. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev. 2000 Dec;52(4):513-56.
32. Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. Neurosci Biobehav Rev. 2000 Aug;24(6):627-38.
33. Garcia-Gomez E, Gonzalez-Pedrajo B, Camacho-Arroyo I. Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. Biomed Res Int. 2013;2013:928290.
34. Powell BL, Drutz DJ, Huppert M, Sun SH. Relationship of progesterone- and estradiol-binding proteins in *Coccidioides immitis* to coccidioidal dissemination in pregnancy. Infect Immun. 1983 May;40(2):478-85.
35. Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev. 2011 Apr;24(2):296-313.
36. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, et al. [Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 Jul-Aug;36(4):455-9.

37. Loth EA, Castro SV, Silva JR, Gandra RF. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Parana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Oct;44(5):636-7.
38. Hernandez-Hernandez F, De Bievre C, Camacho-Arroyo I, Cerbon MA, Dupont B, Lopez-Martinez R. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa* in vitro and characterization of progesterone receptors. *J Med Vet Mycol.* 1995 Jul-Aug;33(4):235-9.
39. Drutz DJ, Huppert M, Sun SH, McGuire WL. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 1981 May;32(2):897-907.
40. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984 Nov;46(2):346-53.
41. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* 1988 Mar;56(3):711-3.
42. Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Dec;80(24):7659-63.
43. Mendez Tovar L, J. De Bievre C., Lopez-Martinez. Effets des hormones sexuelles humaines sur le developpement in vitro des agents d'eumycetomes. *J Mycol Med.* 1991 1991;118:141-3.
44. Gonzalez-Velazquez W, Gonzalez-Mendez R, Rodriguez-del Valle N. Characterization and ligand identification of a membrane progesterone receptor in fungi: existence of a novel PAQR in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol.* 2012;12:194.
45. Schar G, Stover EP, Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Progesterone binding and inhibition of growth in *Trichophyton mentagrophytes*. *Infect Immun.* 1986 Jun;52(3):763-7.
46. Clemons KV, Schar G, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Dermatophyte-hormone relationships: characterization of progesterone-binding specificity and growth inhibition in the genera *Trichophyton* and *Microsporum*. *J Clin Microbiol.* 1988 Oct;26(10):2110-5.

47. Clemons KV, Stover EP, Schar G, Stathis PA, Chan K, Tokes L, et al. Steroid metabolism as a mechanism of escape from progesterone-mediated growth inhibition in *Trichophyton mentagrophytes*. J Biol Chem. 1989 Jul 5;264(19):11186-92.
48. Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. Eukaryot Cell. 2006 Jan;5(1):180-91.
49. Zhang X, Essmann M, Burt ET, Larsen B. Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. J Infect Dis. 2000 Apr;181(4):1441-6.
50. Krishnamurthy S, Gupta V, Prasad R, Panwar SL. Expression of CDR1, a multidrug resistance gene of *Candida albicans*: transcriptional activation by heat shock, drugs and human steroid hormones. FEMS Microbiol Lett. 1998 Mar 15;160(2):191-7.
51. Madani ND, Malloy PJ, Rodriguez-Pombo P, Krishnan AV, Feldman D. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):922-6.
52. Buckman J, Miller SM. Binding and reactivity of *Candida albicans* estrogen binding protein with steroid and other substrates. Biochemistry. 1998 Oct 6;37(40):14326-36.
53. Morse SA, Fitzgerald TJ. Effect of progesterone on *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun. 1974 Dec;10(6):1370-7.
54. Edwards JL. *Neisseria gonorrhoeae* survival during primary human cervical epithelial cell infection requires nitric oxide and is augmented by progesterone. Infect Immun. 2010 Mar;78(3):1202-13.
55. Yotis W, Stanke R. Bacteriostatic action of progesterone on staphylococci and other microorganisms. J Bacteriol. 1966 Nov;92(5):1285-9.
56. Neyrolles O, Quintana-Murci L. Sexual inequality in tuberculosis. PLoS Med. 2009 Dec;6(12):e1000199.
57. Hosoda K, Shimomura H, Hayashi S, Yokota K, Hirai Y. Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett. 2011 May;318(1):68-75.
58. Leone M, Honstetter A, Lepidi H, Capo C, Bayard F, Raoult D, et al. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. J Infect Dis. 2004 Jan 15;189(2):339-45.

59. Amirshahi A, Wan C, Beagley K, Latter J, Symonds I, Timms P. Modulation of the *Chlamydia trachomatis* in vitro transcriptome response by the sex hormones estradiol and progesterone. BMC Microbiol. 2011;11:150.
60. Wang Y, Cela E, Gagnon S, Swezey NB. Estrogen aggravates inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis mice. Respir Res. 2010;11:166.
61. Kumar PS. Sex and the subgingival microbiome: do female sex steroids affect periodontal bacteria? Periodontol 2000. 2013 Feb;61(1):103-24.
62. Duchmann H, Trager L. Progesterone-binding protein from *Streptomyces hydrogenans*. J Steroid Biochem. 1979 Mar;10(3):277-83.
63. Mosier S, Nakao M, Herman M, Walia SK, Rosenthal N, Hurd C, et al. Progesterone binding in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Biochem Biophys. 1991 May 15;287(1):160-6.
64. Rowland SS, Falkler WA, Jr., Bashirelahi N. Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. J Steroid Biochem Mol Biol. 1992 Aug;42(7):721-7.
65. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev. 1994 Apr;7(2):213-64.
66. Hernandez-Hernandez F, Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P. *Nocardia brasiliensis*: in vitro and in vivo growth response to steroid sex hormones. Mycopathologia. 1995 Nov;132(2):79-85.
67. Lavalle P. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gac Med Mex. 1966;96:545-69.
68. Jasso V. Efecto del 17 β -estradiol y la testosterona sobre la expresión genética de *Nocardia brasiliensis*. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
69. Millan-Chiu BE, Hernandez-Hernandez F, Perez-Torres A, Mendez-Tovar LJ, Lopez-Martinez R. In situ TLR2 and TLR4 expression in a murine model of mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 Apr;61(3):278-87.
70. Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucleic Acids Res. 1992 Oct 11;20(19):4965-70.
71. Liang P, Pardee AB. Differential display. A general protocol. Mol Biotechnol. 1998 Dec;10(3):261-7.

72. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 1992 Aug 14;257(5072):967-71.
73. Fislage R, Berceanu M, Humboldt Y, Wendt M, Oberender H. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 1997 May 1;25(9):1830-5.
74. Rivera-Marrero CA, Burroughs MA, Masse RA, Vannberg FO, Leimbach DL, Roman J, et al. Identification of genes differentially expressed in *Mycobacterium tuberculosis* by differential display PCR. *Microb Pathog*. 1998 Dec;25(6):307-16.
75. Wong KK, McClelland M. Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan 18;91(2):639-43.
76. Guo B, Bi Y. Cloning PCR products. An overview. *Methods Mol Biol*. 2002;192:111-9.
77. Revol A, Espinoza-Ruiz M, Medina-Villanueva I, Salinas-Carmona MC. Expression of *Nocardia brasiliensis* superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. *Can J Microbiol*. 2006 Dec;52(12):1255-60.
78. Gouveia C, Fraga A, Filipe P, Sequeira H, Boiron P, Couble A, et al. Mycetoma of the chest wall due to *Nocardia brasiliensis*. *Acta Derm Venereol*. 2008;88(5):508-10.
79. Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun*. 2012 May;38(2-3):J282-91.
80. Lopez-Martinez R, Mendez Tovar LJ. Datos epidemiológicos del micetoma en México. *Monogr Dermatol*. 2006;19(1):5-12.
81. Bonifaz A, Ibarra G, Saul A, Paredes-Solis V, Carrasco-Gerard E, Fierro-Arias L. Mycetoma in children: experience with 15 cases. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Jan;26(1):50-2.
82. O'Neal S, Potter BK, Adams SC, Pitcher JD, Jr. Orthopaedic/radiology/pathology conference: a slow-growing anterior tibial mass in a 37-year-old woman. *Clin Orthop Relat Res*. 2010 Jan;468(1):302-6.
83. Noller HF, Hoang L, Fredrick K. The 30S ribosomal P site: a function of 16S rRNA. *FEBS Lett*. 2005 Feb 7;579(4):855-8.
84. Lewin B. *Genes IX*. McGraw Hill; 2008. p. 151-85.

85. Sipe JE, Anderson WM, Jr., Remy CN, Love SH. Characterization of S-adenosylmethionine: ribosomal ribonucleic acid-adenine (N⁶-) methyltransferase of *Escherichia coli* strain B. *J Bacteriol.* 1972 Apr;110(1):81-91.
86. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Mar;39(3):577-85.
87. Sander P, Meier A, Bottger EC. Ribosomal drug resistance in mycobacteria. *Res Microbiol.* 1996 Jan-Feb;147(1-2):59-67.
88. Sander P, Prammananan T, Meier A, Frischkorn K, Bottger EC. The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. *Mol Microbiol.* 1997 Nov;26(3):469-80.
89. Gupta P, Sothiselvam S, Vazquez-Laslop N, Mankin AS. Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why erm genes are inducible. *Nat Commun.* 2013;4:1984.
90. Tanaka T, Weisblum B. Systematic difference in the methylation of ribosomal ribonucleic acid from gram-positive and gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 1975 Aug;123(2):771-4.
91. Hopwood DA. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Mol Microbiol.* 2007 Feb;63(4):937-40.
92. Mikami Y, Yazawa K, Nemoto A, Komaki H, Tanaka Y, Grafe U. Production of erythromycin E by pathogenic *Nocardia brasiliensis*. *J Antibiot (Tokyo).* 1999 Feb;52(2):201-2.
93. Swigonova Z, Mohsen AW, Vockley J. Acyl-CoA dehydrogenases: Dynamic history of protein family evolution. *J Mol Evol.* 2009 Aug;69(2):176-93.
94. Shen YQ, Lang BF, Burger G. Diversity and dispersal of a ubiquitous protein family: acyl-CoA dehydrogenases. *Nucleic Acids Res.* 2009 Sep;37(17):5619-31.
95. Wilcken B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Oct;33(5):501-6.
96. Weeks G, Shapiro M, Burns RO, Wakil SJ. Control of fatty acid metabolism. I. Induction of the enzymes of fatty acid oxidation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1969 Feb;97(2):827-36.
97. Zhang YX, Denoya CD, Skinner DD, Fedechko RW, McArthur HA, Morgenstern MR, et al. Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from

Streptomyces coelicolor and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. *Microbiology*. 1999 Sep;145 (Pt 9):2323-34.

98. Van der Geize R, Yam K, Heuser T, Wilbrink MH, Hara H, Anderton MC, et al. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 6;104(6):1947-52.

99. Voskuil MI. *Mycobacterium tuberculosis* cholesterol catabolism requires a new class of acyl coenzyme A dehydrogenase. *J Bacteriol*. 2013 Oct;195(19):4319-21.

100. Ouellet H, Johnston JB, de Montellano PR. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2011 Nov;19(11):530-9.

101. Wipperfman MF, Yang M, Thomas ST, Sampson NS. Shrinking the FadE proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into cholesterol metabolism through identification of an alpha2beta2 heterotetrameric acyl coenzyme A dehydrogenase family. *J Bacteriol*. 2013 Oct;195(19):4331-41.

102. de Kok A, Hengeveld AF, Martin A, Westphal AH. The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Jun 29;1385(2):353-66.

103. Pei XY, Titman CM, Frank RA, Leeper FJ, Luisi BF. Snapshots of catalysis in the E1 subunit of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Structure*. 2008 Dec 10;16(12):1860-72.

104. Eikmanns BJ, Blombach B. The pyruvate dehydrogenase complex of *Corynebacterium glutamicum*: An attractive target for metabolic engineering. *J Biotechnol*. 2014 Jan 29.

105. Schreiner ME, Fiur D, Holatko J, Patek M, Eikmanns BJ. E1 enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects. *J Bacteriol*. 2005 Sep;187(17):6005-18.

106. Vastano V, Salzillo M, Siciliano RA, Muscariello L, Sacco M, Marasco R. The E1 beta-subunit of pyruvate dehydrogenase is surface-expressed in *Lactobacillus plantarum* and binds fibronectin. *Microbiol Res*. 2014 Feb-Mar;169(2-3):121-7.

107. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(4):1041-51.
108. Danis P, Farkas R. Hormone-dependent and hormone-independent control of metabolic and developmental functions of malate dehydrogenase - review. *Endocr Regul.* 2009 Jan;43(1):39-52.
109. Herrick J, Sclavi B. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol.* 2007 Jan;63(1):22-34.
110. Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, Aharonowitz Y, et al. NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol.* 2007 Jul;189(14):5012-21.
111. Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J Bacteriol.* 2001 Dec;183(24):7260-72.
112. Borovok I, Kreisberg-Zakarin R, Yanko M, Schreiber R, Myslovati M, Aslund F, et al. *Streptomyces* spp. contain class Ia and class II ribonucleotide reductases: expression analysis of the genes in vegetative growth. *Microbiology.* 2002 Feb;148(Pt 2):391-404.
113. Borovok I, Gorovitz B, Yanku M, Schreiber R, Gust B, Chater K, et al. Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol.* 2004 Nov;54(4):1022-35.
114. Sitjes J, Ysern P, Barbe J, Llagostera M. Induction of ribonucleoside diphosphate reductase gene transcription by chemicals in *Escherichia coli*. *Mutagenesis.* 1992 Jan;7(1):47-9.

13 ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de RNA total de *N. brasiliensis* cultivada con P₄ y DHT

CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

No. de muestras	Descripción	Concentración (ng/μl)	A260	A280	260/280
1	C-2h	3382,90	84,574	42,545	1,99
2	P ₄ -N-2h	4591,00	114,775	59,958	1,91
3	P ₄ -10-2h	4547,90	113,699	61,027	1,86
4	C-8h	7848,90	196,223	98,551	1,99
5	P ₄ -N-8h	4482,80	112,070	58,815	1,91
6	P ₄ -10-8h	2545,60	61,141	31,809	1,92
7	C-24h	2691,60	67,291	35,473	1,90
8	P ₄ -N-24h	7977,90	199,448	100,460	1,99
9	P ₄ -10-24h	9331,40	233,286	118,183	1,97
10	C-2h	4352,98	108,825	103,161	1,05
11	DHT-N-2h	3625,00	90,639	52,706	1,72
12	DHT-10-2h	4234,26	105,856	67,922	1,56
13	C-8h	4397,68	109,942	99,765	1,10
14	DHT-N-8h	3516,40	87,91	48,416	1,82
15	DHT-10-8h	3809,75	95,244	55,158	1,73
16	C-24h	3318,35	82,026	43,866	1,87
17	DHT-N-24h	4233,34	105,833	66,878	1,58
18	DHT-10-24h	3149,80	78,747	42,300	1,86

Anexo 2. Cuantificación de DNA purificado-P₄

No. de la banda	Concentración (ng/μL)
1	1,34
2	0,59
3	0,64
4	1,38
5	7,18
6	6,06
7	3,07
8	6,98
9	7,36
10	3,79
11	6,15
12	3,32
13	13,58

Anexo 3. Cuantificación DNA purificado-DHT

No. de la banda	Concentración (ng/μL)
1	5,77
2	4,43
3	1,04
4	2,35
5	0,54
6	11,24
7	6,24
8	8,28
9	11,24
10	12,25
11	15,52
12	12,55

Anexo 4. Tamaño esperado de la banda después de la clonación

No. de la banda (figura 7)	Tamaño aproximado de la banda purificada (pb)	Vector usado	Tamaño del vector sin inserto (pb)	Tamaño aproximado esperado después de la clonación (pb)
1	250	p-GEM-T easy	179	429
2	130	p-GEM-T easy	179	309
3	100	p-GEM-T easy	179	279
4	520	p-GEM-T easy	179	699
10	700	TOPO TA 2.1	202	902
11	650	TOPO TA 2.1	202	852
12	150	TOPO TA 2.1	202	352
13	120	TOPO TA 2.1	202	322