



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL 17  $\beta$ -ESTRADIOL Y LA TESTOSTERONA SOBRE LA  
EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Nocardia brasiliensis***

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

**LAURA VERÓNICA JASSO ESCUTIA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Francisca Hernández Hernández**  
Facultad de Medicina

**COMITÉ TUTOR: Dr. Luis Servín González**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**COMITÉ TUTOR: Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes**  
Facultad de Medicina

**MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013**



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 DEL 17  $\beta$ -ESTRADIOL Y LA TESTOSTERONA SOBRE LA  
EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Nocardia brasiliensis***

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

**LAURA VERÓNICA JASSO ESCUTIA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Francisca Hernández Hernández**  
Facultad de Medicina

**COMITÉ TUTOR: Dr. Luis Servín González**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**COMITÉ TUTOR: Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes**  
Facultad de Medicina

**MÉXICO, D.F. MAYO, 2013**

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **JASSO ESCUTIA LAURA VERÓNICA** con número de cuenta **301095736** con la tesis titulada **"EFECTO DEL 17  $\beta$ -ESTRADIOL Y LA TESTOSTERONA SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Nocardia brasiliensis*"** realizada bajo la dirección de la **DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ:**

Presidente: **DR. FERNANDO LARREA GALLO**  
Vocal: **DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL**  
Secretario: **DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ**  
Suplente: **DR. JUAN MIRANDA RÍOS**  
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 HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de mayo de 2013

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Asimismo, agradezco la beca que me fue otorgada por el CONACyT (369789) para llevar a cabo mis estudios.

Al CONACyT por el apoyo financiero para asistir al VI Congreso Nacional de Micología Médica “Dr. Pedro Lavalle Aguilar”.

Además, agradezco la beca otorgada por parte del Posgrado de la Facultad de Medicina para la asistencia al IX Diplomado de Micología Médica “Dr. Gastón García Guzmán”.

Por último, agradezco las valiosas aportaciones del comité tutorial:

Dra. Francisca Hernández Hernández

Dr. Luis Servín González

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

A las personas de las que he aprendido tanto

Mis padres Raquel Escutia Orta y

Miguel Ángel Jasso Padilla

Mi hermano Miguel Ángel Jasso Escutia

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo que me brindaron en el Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, especialmente al Dr. Rubén López Martínez por permitirme trabajar en su laboratorio. A mi asesora de tesis la Dra. Francisca Hernández Hernández por permitirme ser parte de su línea de investigación, por apoyarme en todo momento, por sus consejos, por motivarme tanto, por hacerme tener interés en la investigación y sobre todo por ser tan buena persona conmigo, le agradezco enormemente.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Luis Servín González y Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes por ser un apoyo indispensable para la realización de este trabajo, por sus consejos siempre atinados, por la paciencia y el conocimiento que me otorgaron durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado de mi examen de grado: Dr. Fernando Larrea Gallo, Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal, Dr. Juan Miranda Ríos y la M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso por ser parte de mi jurado y por la revisión de este trabajo.

A la Q.F.B. Erika Córdova Martínez por compartirme sus conocimientos, por la gran ayuda que me brindó por la amistad y por estar siempre al pendiente de este trabajo, muchas gracias.

A la Dra. María del Rocio Reyes Montes y a Lupita por las aportaciones tan importantes para este trabajo.

A la Biól. Elva Bazán Mora y la Biól. Blanca Edith Millán Chiu por tener el interés, la paciencia y las ganas de ayudarme, muchas gracias.

Agradezco a mis padres Raquel y Miguel por permitirme y enseñarme a tener una aspiración en la vida, por apoyarme siempre en todo lo que hago, por ser un ejemplo de dedicación y responsabilidad y por ser lo más valioso e importante que tengo en esta vida, los amo. A mi hermano Miguel que quiero con toda el alma, gracias por hacerme reír todos los días y dejarme compartir esta experiencia contigo, te amo. A mi familia Escutia por ser un apoyo fundamental en mi vida. A mi abuela, Ramona por creer tanto en mí y por ser un gran apoyo en mi vida. A mis primas que quiero y con las que he compartido tanto, Angélica, Adriana, Alejandra, Patricia, Susana, Miriam y Anita. A Mónica Nuncio que siempre me brinda su apoyo, gracias.

A todos los integrantes del laboratorio de Micología Médica: Erika, Elva, Blanca, Rosio, Mariana, Viviana, Amanda, Brianda, Tania, Claudia y Saúl por escucharme siempre, por los momentos tan chistosos que pasamos y por la buena vibra que siempre me brindaron, muchas gracias.

A la M. en C. Elda del Carmen Cortés González por todos los consejos y comentarios para la realización de este trabajo, por hacerme pasar siempre ratos alegres y divertidos en el laboratorio, por apoyarme siempre en todo lo que hago y por ser mi mejor amiga te quiero mucho.

Al M. en C. Alfredo López Caamal por el apoyo tan valioso que brindo para la realización de este trabajo, por ser un pilar importante en mi vida y por ser mi mejor amigo, te quiero mucho.

A la familia Castro por todo el apoyo y comprensión para la realización de este trabajo. A Alma por siempre estar al pendiente de mí y mis estudios le agradezco enormemente.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>I) INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1. <i>Nocardia brasiliensis</i>	15
1.1.1. Taxonomía	15
1.1.2. Características de <i>N. brasiliensis</i>	15
1.2. Infecciones causadas por <i>N. brasiliensis</i>	16
1.3. Hormonas	18
1.3.1. Hormonas esteroides	20
1.4. Técnicas moleculares para el estudio de la expresión diferencial	23
<b>II) ANTECEDENTES</b>	<b>24</b>
2.1. Influencia de las hormonas esteroides sobre el cambio fenotípico y genético en diversos organismos	24
2.2. Influencia de las hormonas esteroides en <i>N. brasiliensis</i>	28
<b>III) JUSTIFICACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>IV) HIPOTESIS</b>	<b>30</b>
<b>V) OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
<b>VI) MATERIAL Y METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
6.1. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular del aislado clínico FM825	31
6.2. Curva de crecimiento	34
6.3. Métodos de extracción de RNA total	35
6.4. Determinación de la concentración hormonal de 17 $\beta$ -estradiol y Testosterona y el tiempo de incubación óptimos para el estudio de expresión diferencial	36
6.4.1. Condiciones de cultivo	36
6.4.2. Cuantificación de RNA	39
6.4.3. Tratamiento con DNAsa	39
6.4.4. PCR para descartar la presencia de DNA contaminante	39
6.4.5. Síntesis de cDNA	39
6.4.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	40
6.5. Selección y purificación de genes de <i>N. brasiliensis</i> que son modificados en su expresión ante la presencia de hormonas esteroides.	41
6.5.1. Purificación de fragmentos diferenciales	41
6.5.2. Clonación de los fragmentos diferenciales	42
6.5.3. Secuenciación de fragmentos diferenciales	45
<b>VII) RESULTADOS</b>	<b>47</b>
7.1. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular del aislado clínico FM825	47
7.2. Curva de crecimiento	49

7.3. Selección del método de extracción de RNA utilizando TRIzol®	50
7.4. Concentración hormonal de 17 β-estradiol y Testosterona y el tiempo de incubación óptimos para el estudio de la expresión diferencial	51
7.4.1 Condiciones de cultivo, extracción y cuantificación de RNA.	51
7.5. Validación de la Técnica de RAP-RT-PCR.	52
7.6. RAP-RT-PCR	53
7.7. Selección y purificación de genes de <i>N. brasiliensis</i> que son modificados en su expresión ante la presencia de hormonas esteroides.	57
7.7.1 Purificación de fragmentos diferenciales	57
7.7.2 Clonación de fragmentos diferenciales	57
7.7.3 Análisis de las secuencias de los fragmentos diferencialmente expresados	60
<b>VIII) DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>XI) CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>X) PERSPECTIVAS</b>	<b>76</b>
<b>XI) REFERENCIAS</b>	<b>77</b>
<b>X) ANEXOS</b>	<b>83</b>

## RESUMEN

Las principales funciones de las hormonas esteroides son el control de la reproducción, el crecimiento y el desarrollo de órganos sexuales en los mamíferos. Sin embargo, se ha sugerido que éstas tienen un papel importante en la fisiopatogenia de diversas enfermedades, relacionando el estatus genérico de los individuos con la susceptibilidad a patologías infecciosas. *Nocardia brasiliensis* es el agente responsable de aproximadamente el 84% de los casos de actinomicetoma en México. Esta enfermedad es más frecuente en hombres que en mujeres en una relación de 3:1. Lo anterior sugiere que las hormonas esteroides pueden jugar un papel importante en el establecimiento de *N. brasiliensis* en el hospedero. Estudios previos han demostrado que las hormonas esteroides tienen un efecto en la morfología, el crecimiento y en la evolución clínica del micetoma en modelo murino. Sin embargo, se desconocen los efectos de estas hormonas en la expresión genética de *N. brasiliensis*. El presente trabajo tuvo como objetivo principal identificar los genes de *N. brasiliensis* que modifican su expresión genética ante la presencia de 17  $\beta$ -estradiol y testosterona mediante la técnica de RAP-RT-PCR. Para esto, se realizaron cultivos en Caldo BHI a los cuales se les adicionaron hormonas esteroides (estrógeno y testosterona) por separado a una concentración sérica humana normal (CSHN), 10 veces la CSHN y cultivos control que carecían de hormonas. De cada uno de los tratamientos, se extrajeron las masas bacterianas a las 2, 8 y 24 horas de estimulación con ambas hormonas de las que se extrajo el RNA total, el que se usó como template para sintetizar cDNA utilizando diversos primers aleatorios. Los fragmentos que presentaron una expresión diferencial fueron purificados y clonados en un vector de clonación plasmídico para su posterior secuenciación y análisis en el banco de datos con el programa BLAST (blastx). En total, 25 fragmentos mostraron una expresión diferencial. De éstos, 12 incrementaron su expresión (seis con estrógeno y seis con testosterona) y 13 la inhibieron (cuatro con estrógeno y nueve con testosterona). Del total de fragmentos con expresión diferencial, 10 fueron clonados exitosamente. El análisis mostró que la secuencia de los fragmentos tiene similitud con 10 proteínas, de las cuales 4 corresponden a proteínas hipotéticas y 6 corresponden a proteínas con función conocida: PBR (regulador de la biosíntesis de la fenazina), Subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa, rRNA (adenina-N (6)-)-metiltransferasa, hidrolasa de pared celular, anhidrasa carbónica y carboxilesterasa. Los fragmentos correspondientes a la estimulación con estradiol mostraron similitud con varias proteínas hipotéticas, la proteína PBR y una Piruvato deshidrogenasa. Por su parte, los fragmentos provenientes de la estimulación con testosterona mostraron similitud con proteínas hipotéticas, metiltransferasas, hidrolasas de pared celular, Anhidrasa carbónica, PBR y carboxilesterasa. Todas las proteínas de las que se conoce su función están implicadas en el metabolismo esencial de diversos organismos. Sin embargo, también pueden jugar un papel

importante en la virulencia de *N. brasiliensis*. El presente trabajo, representa el primer estudio en relación al efecto de las hormonas esteroides en la expresión genética de *N. brasiliensis*, el cual abre camino a diversas investigaciones para conocer la función y los mecanismos de acción de las proteínas aquí mencionadas.

## ABSTRACT

The main roles of steroid hormones are the control of reproduction, growth and the development of sexual organs in mammals. However, it has been suggested that they are also implicated in the physiopathogeny of certain diseases, relating the generic status of individuals with the susceptibility to infectious pathologies. *Nocardia brasiliensis* is responsible for approximately 84% of the cases of actinomycetoma in Mexico. This disease is more frequent in men than in women with a ratio of 3:1. This ratio suggests that steroid hormones may play a role in the establishment of *N. brasiliensis* within the host. Previous studies found a significant effect of steroid hormones in the growth, morphology, and clinical course of actinomycetoma caused by *N. brasiliensis* in the murine model. However, the effects of steroid hormones on *N. brasiliensis* gene expression are remain unknown. The main goal of this study was to identify the genes of *N. brasiliensis* that show a differential expression when treated with 17  $\beta$ -estradiol and testosterone using the technique RAP-RT-PCR. Cultures of *N. brasiliensis* were carried out in BHI broth, which were separately added with steroid hormones (estrogen and testosterone) at normal seric human concentration (NSHC), 10 times the NSHC and cultures where no hormone was added. Of each of these treatments, the bacterial mass was extracted after 2, 8, and 24 hours of hormonal stimulation. Then, the RNA was extracted and cDNA was synthesized through PCR with random primers. The DNA fragments that showed a differential expression were purified and cloned in a plasmid vector. After cloning, the fragments were sequenced and analyzed with the program BLAST (blastx). In total, 25 fragments showed a differential expression under the treatments of testosterone and estrogen. Of these, 12 increased their expression (six of testosterone, and six of estrogen) and 13 inhibited their expression (nine of testosterone and four of estrogen). Of the 25 differentially expressed fragments, 10 were successfully cloned. The sequence analysis of these fragments showed that they have a high similarity with four hypothetical proteins and six had a similarity with proteins of known function: PBR (phenazine biosynthesis regulator), Pyruvate dehydrogenase subunit E1, rRNA (adenine-N(6)-methyltransferase), cell wall hidrolase, Carbonic anhidrase, and Carboxilesterase. The fragments obtained with the stimulation with 17  $\beta$ -estradiol showed similarity with the proteins PBR, and a pyruvate dehydrogenase. In the other hand, the fragments obtained after stimulation with testosterone showed similarity with hypothetical proteins, methyltransferases, cell wall hydrolases, carbonic anhidrase, PBR, and carboxylesterase. All of the proteins with known function play an important role in the core metabolism; however, they also may play an important role in the virulence of *N. brasiliensis*. The present work is the first one that evaluates

the effect of steroid hormones on the genetic expression of *N. brasiliensis*. Further research should study the function and structure of the proteins aforementioned.

# I) INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Nocardia brasiliensis*

### 1.1.1. Taxonomía

El mundo de los organismos vivos está clasificado en tres grandes dominios: Archaea, Eukarya y Bacteria. Taxonómicamente *N. brasiliensis* pertenece al dominio Bacteria, orden Actinomycetales y familia Nocardiaceae <sup>(Holt. 2000)</sup>. La primera descripción del género *Nocardia* fue hecha por Edmon Nocard en 1888, a partir de un caso de linfadenitis bovina. Un año después, Trevisan caracterizó el mismo aislado y lo nombró *N. farcinica*, la cual fue considerada como la especie tipo del género. Años más tarde Gordon y Mihm encontraron que la cepa inicialmente descubierta por Nocard era idéntica fenotípicamente a *N. asteroides*, por lo que *N. farcinica* se consideró posteriormente como una sinonimia de *N. asteroides* <sup>(Brown-Elliot. 2006)</sup>. La especie *N. brasiliensis* fue descrita por Lindenberg en 1909 como *Discomyces brasiliensis*. En ese tiempo la literatura incluía varios sinónimos para esta especie, algunos de ellos fueron *Streptothrix brasiliensis*, *Oospora brasiliensis*, *Actinomyces brasiliensis* y *A. violaceus* subsp. *brasiliensis* <sup>(Brown-Elliot. 2006)</sup>. Actualmente los procedimientos moleculares han contribuido a la descripción de 54 especies de *Nocardia* y de ellas 33 se han descrito como patógenas para el humano <sup>(Brown-Elliot. 2006)</sup>.

### 1.1.2. Características de *N. brasiliensis*

El orden al cual pertenece *N. brasiliensis* es un grupo muy grande de bacterias que vive en múltiples hábitats naturales y en tierras de cultivo donde juegan un papel importante en el reciclaje de nutrientes <sup>(Goodfellow. 1983)</sup>. Muchos de estos organismos son saprófitos y algunos forman asociaciones parasitarias o mutualistas con algunas plantas y animales. Macroscópicamente *N. brasiliensis* forma colonias de aspecto céreo, superficie plegada, con tendencia a formar micelio aéreo conforme la colonia envejece. Presenta coloraciones que van desde los tonos blancos hasta los tonos anaranjados. Es una bacteria aerobia, parcialmente ácido alcohol resistente, Gram positiva, que se caracteriza por formar estructuras microscópicas bacilares, filamentos únicos o ramificados de alrededor de 1 µm de diámetro, además de estructuras cocoides irregulares <sup>(Sandoval. 1996)</sup>. Es una bacteria intracelular facultativa que puede vivir y multiplicarse dentro de los macrófagos del huésped infectado, pero de igual manera crece extracelularmente en medio de cultivo <sup>(Salinas Carmona. 2005)</sup>.

Para la identificación de la especie se realizan diversas pruebas fisiológicas. Entre las más comunes se encuentran el crecimiento en gelatina, hidrólisis de gelatina, descomposición de caseína,

tirosina e hipoxantina, en las que *N. brasiliensis* es positiva. Esta bacteria es negativa en la descomposición de xantina <sup>(Brown-Elliot. 2006)</sup> (**Cuadro 1**). Los intervalos de temperatura de crecimiento se encuentran entre los 10 y 45°C, con un pH entre 6.0 y 9.0, con crecimiento óptimo en cloruro de sodio al 5% <sup>(Sandoval. 1996)</sup>.

Actinomiceto	Crecimiento en gelatina	Hidrólisis de la gelatina	Descomposición de			
			Caseína	Xantina	Tirosina	Hipoxantina
<i>N. brasiliensis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>N. asteroides</i>	-	-	-	-	-	-
<i>N. caviae</i>	-	-	-	+	-	+
<i>Actinomadura madurae</i>	NU	+	+	-	+	+
<i>A. pelletieri</i>	NU	+	+	-	+	+
<i>Streptomyces somaliensis</i>	NU	+	+	-	+	-

**Cuadro 1.** Pruebas bioquímicas comúnmente utilizadas para la identificación de la cepa FM825. NU. No utilizado. Tomado y modificado de Brown-Elliot, 2006.

## 1.2. Infecciones causadas por *N. brasiliensis*

Los actinomicetos son microorganismos que causan enfermedades graves como la tuberculosis y la lepra por *Mycobacterium tuberculosis* y *M. leprae* respectivamente. En el caso particular de los actinomicetos del género *Nocardia*, la nocardiosis y el micetoma son las patologías de las que con mayor frecuencia son responsables <sup>(López. 2006)</sup>.

La Nocardiosis es causada principalmente por la especie *N. asteroides*; sin embargo, *N. brasiliensis* es otro de los agentes causales más importantes de este padecimiento <sup>(Lerner. 1996)</sup>. En la actualidad se conocen 3 formas clínicas que se asocian a la localización anatómica: pulmonar, cutánea y diseminada. Este padecimiento se presenta en edades variables que van de los 30 a los 50 años. En relación al género,

se presenta en una proporción hombre-mujer entre 3:1 y 2:1. La nocardiosis pulmonar es una infección oportunista que se adquiere por la inhalación de fragmentos filamentosos que se encuentran en el aire. (Lerner. 1996) Afecta el pulmón con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos secundario a la leucemia y el linfoma. El deterioro en las defensas pulmonares locales producidas por padecimientos como enfisema, bronquitis, asma y tuberculosis son otros de los factores predisponentes. La nocardiosis cutánea se adquiere por la inoculación traumática por medio de espinas, astillas etc., en miembros superiores e inferiores; se puede manifestar como celulitis, pústulas, piodermia, síndromes linfocutáneos o como abscesos localizados que imitan una infección asociada con otras bacterias. Este tipo de infección en la mayoría de los casos es una consecuencia de un cuadro primario pulmonar. *N. asteroides* se asocia a la mayoría de los casos de nocardiosis diseminada aunque existen pocos casos reportados de Nocardiosis diseminada; López y colaboradores reportaron a *N. brasiliensis* como agente causal de nocardiosis diseminada formando abscesos cerebrales y oculares (López. 2012). *N. brasiliensis* es responsable de producir principalmente el micetoma crónico localizado (Rojas-Marín. 2003).

La patología más importante causada por *N. brasiliensis* es sin duda, el micetoma. Este es una infección subcutánea que se adquiere por la inoculación traumática exógena de hongos (Eumicetoma) o actinomicetos aerobios (Actinomicetoma) cuyos agentes causales se establecen en el tejido del hospedero. La enfermedad se localiza principalmente en miembros inferiores aunque también puede presentarse en cualquier región del cuerpo (Arenas, 2008). Además del evento traumático con pérdida de continuidad de la piel existen otros factores que favorecen la enfermedad, como el estado nutricional deficiente, la incapacidad del hospedero para generar una respuesta inmune adecuada y la exposición continua al microorganismo (Hernández-Hernández. 2008).

Los estudios epidemiológicos sitúan geográficamente al micetoma en países localizados en el cinturón intertropical del planeta, que abarca regiones de clima templado (entre los paralelos 14 y 32), principalmente India, Sudán, Senegal, Somalia, México, Venezuela y Brasil (Sandoval. 1996). México es uno de los países en los que existe un mayor número de casos documentados de actinomicetoma (98%) (Fuentes. 2006; Sandoval. 1996). En todos los estados de la república se han descrito casos, predominando en Jalisco, Nuevo León, Morelos, San Luis Potosí, Guerrero (López. 2006). *N. brasiliensis* es el principal agente responsable del actinomicetoma en México (87%) (López. 2006).

Este padecimiento afecta a personas en edades que van desde los 3 hasta los 80 años; con mayor frecuencia se presenta en hombres que en mujeres con una relación de 3:1 respectivamente. Los

campesinos son el grupo ocupacional que está más expuesto a contraer la enfermedad ya que frecuentemente sufren heridas y se encuentran en contacto directo con el suelo, de donde los agentes causales pueden ser aislados con cierta facilidad <sup>(López. 2006)</sup>. Las infecciones en extremidades inferiores se presentan con mayor frecuencia, seguida de tronco, extremidades superiores cabeza y cuello <sup>(López. 2006)</sup>. Las lesiones se presentan en el área de inoculación, es decir, la mayoría de casos son localizados.

El actinomicetoma clínicamente se caracteriza por el aumento de volumen indoloro de la región afectada, acompañado de fístulas que drenan un material purulento o hemato-purulento, el cual contiene granos constituidos por micro-colonias del agente etiológico <sup>(Hernández-Hernández. 2008)</sup>. Existen algunos reportes en donde se ha evidenciado la diseminación de *N. brasiliensis* hacia otras regiones del cuerpo <sup>(Klein. 1991)</sup>. Por ejemplo, Muñoz y colaboradores observaron la diseminación de *N. brasiliensis* a partir de una infección localizada en un brazo hacia uno de los riñones del paciente <sup>(Muñoz-Hernández 2009)</sup>. Experimentalmente se ha demostrado la diseminación hematogena de *N. brasiliensis* a partir de una lesión en el cojinete plantar de ratones Balb/c. Estos ratones, presentaron lesiones renales granulomatosas además de evidenciar la presencia de bacilos en cerebro y riñón <sup>(Palma-Ramos. 2008)</sup>.

### **1.3. Hormonas**

La endocrinología es la rama de la medicina que estudia las glándulas de secreción interna, sus secreciones específicas (hormonas) y sus enfermedades. Esta disciplina también estudia la biosíntesis, almacenamiento y función de las hormonas así como de los tejidos que las secretan. Una hormona es un compuesto químico que es secretado por glándulas especializadas como la glándula pituitaria, hipotálamo, testículo, ovarios y las glándulas suprarrenales. Estas moléculas se dirigen a órganos blanco a través del torrente sanguíneo para inhibir o regular la actividad de otros órganos (regulación endocrina). También pueden actuar de manera directa en los órganos en los que se producen (regulación paracrina). Cuando estas moléculas son liberadas al torrente sanguíneo son llevadas por proteínas solubles especializadas que las transportan hasta las células diana o sin molécula transportadora. De manera general, se sabe que las hormonas se sintetizan en grandes cantidades para poder difundir en el organismo, sin embargo, se les encuentra en bajas concentraciones en el torrente sanguíneo. La gran mayoría de estas moléculas tienen una vida media corta, por lo que llegan rápidamente al órgano blanco en el que ejercen su efecto.

La síntesis y secreción de las hormonas, están reguladas por tres mecanismos: por retroalimentación (negativa o positiva), por control parácrino y autócrino y por ritmos hormonales. En la

regulación por retroalimentación, una hormona o un sustrato pueden estimular o disminuir la secreción de otra hormona o de otras sustancias. Se dice que es una retroalimentación positiva si el producto estimula a la hormona o directamente a la enzima para que siga generando el producto. Una retroalimentación negativa se da cuando el producto inhibe a la hormona o a la enzima para que deje de producirse. Por ejemplo, durante la ovulación se secretan cantidades pequeñas de estrógeno, que estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo y la hormona luteinizante (LH) en la glándula pituitaria. Adicionalmente la GnRH estimula la liberación de LH que a su vez provoca la liberación de estrógeno adicional en los ovarios causando una retroalimentación positiva, aumentando los niveles de GnRH y LH en el torrente sanguíneo. Por otro lado, después de la ovulación, en el ovario se forma el cuerpo lúteo provocando la liberación de progesterona en respuesta a la LH. La progesterona inhibe la liberación de GnRH y LH por lo que las concentraciones de estas dos últimas moléculas disminuyen en el torrente sanguíneo causando una retroalimentación negativa (Dorantes-Cuéllar. 2012; Flores-Lozano. 2005)

El control parácrino consiste en que la hormona actúa sobre células adyacentes a las células secretoras. En el control autócrino la hormona actúa en las mismas células que la producen. La producción de hormonas puede ser regulada por ritmos que incluye la adaptación al medio ambiente, los cambios de edad, las estaciones del año, la alimentación y el estrés. Los ejemplos más comunes son los relacionados con el inicio de la pubertad, la menopausia y el ciclo menstrual (Dorantes-Cuéllar. 2012)

### **Receptores hormonales humanos**

En los órganos blanco existen receptores a los cuales se unen las hormonas y activan diversas vías de señalización. Estos receptores pueden estar localizados en la membrana celular, en el núcleo o en el citoplasma. Las hormonas cuentan con una afinidad específica para su receptor. El número de receptores varía en los diferentes tejidos y órganos blanco. Algunas hormonas transportadas por péptidos y proteínas no difunden a través de la membrana por lo que se acoplan a receptores extracelulares provocando una respuesta intracelular. La mayoría de estos receptores se unen a proteínas G que activan ciertas enzimas que estimulan o inhiben a un segundo mensajero que a su vez activa a proteínas cinasas que finalmente regulan la expresión genética de ciertas regiones del DNA. Por otro lado, las hormonas tiroideas y esteroides por ser lipofílicas, atraviesan la membrana por difusión simple; así, la hormona se une a sus receptores nucleares o citoplasmáticos conformando una dimerización (hormona-receptor)

para posteriormente unirse a secuencias específicas en el DNA y silenciar o activar ciertos genes <sup>(Wierman. 2007; Kronenberg. 2009)</sup>.

El análisis de los genomas completos de múltiples organismos como bacterias, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el gusano *Caenorhabditis elegans*, la planta *Arabidopsis thaliana* y el humano, ha permitido una visión general de la maquinaria de señalización utilizada por diversas formas de vida. Se sabe que *S. cerevisiae* emplean receptores ligados a proteínas G, sin embargo, carece de receptores tirosin-cinasa y receptores nucleares parecidos a la familia del receptor de estrógeno, en el caso específico de *D. melanogaster* y *C. elegans* comparten con el humano algunas vías de señalización. En nuestro conocimiento, sólo existe un trabajo en donde se caracterizó un receptor hormonal citosólico en la bacteria *Streptomyces hydrogenans* <sup>(Kurt. 1975)</sup>.

### **1.3.1. Hormonas esteroides**

De manera clásica, a las hormonas esteroides se les ha atribuido el control de la reproducción, del crecimiento, del desarrollo de órganos sexuales y de la acentuación de los caracteres sexuales secundarios; sin embargo, estas moléculas cumplen otras funciones que van más allá de las ya mencionadas.

Las hormonas son un conjunto de moléculas ampliamente estudiado. Se les clasifica en tres grandes grupos de acuerdo a su composición química: I) Hormonas derivadas de aminoácidos (catecolaminas, hormona, luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica) II) hormonas de origen proteico (hormona del crecimiento humano) y III) hormonas lipídicas que incluyen las hormonas esteroides como la testosterona, estrógeno, estriol, estriona, progesterona <sup>(Flores-Lozano. 2005)</sup>.

Las hormonas esteroides forman parte del grupo III, por lo que difunden libremente a través de la membrana plasmática. Se sintetizan principalmente en las gónadas aunque también existen otros sitios de síntesis tales como la corteza suprarrenal, la placenta, hígado, piel y en el tejido adiposo <sup>(Amado. 2003)</sup>. Estas hormonas se sintetizan a partir del colesterol.

Los esteroides sexuales se clasifican de acuerdo a su estructura química y su actividad biológica en tres grandes grupos: I) estrógenos, II) progestágenos, y III) andrógenos <sup>(Flores-Lozano. 2005)</sup>.

- I) Los estrógenos son esteroides de 18 carbonos que se caracterizan por la presencia de un anillo aromático, un grupo hidroxilo fenólico en C-3 y un hidroxilo (estradiol) o cetona

(estrona) en el carbono 17. La enzima aromatasa es clave para la producción de estrógenos en el ovario. La producción de la aromatasa P450 (P450arom) en las células de la granulosa del ovario está regulada fundamentalmente por la hormona folículo-estimulante (FSH). El estrógeno más importante y abundante producido por el ovario del humano es el 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). La estrona ( $E_1$ ) también sintetizada en el ovario y tiene como fuente extraglandular la androstenediona. El estriol ( $E_3$ ) es un estrógeno débil, producto del metabolismo del estradiol y la estrona, es el más abundante en la orina y aumenta en la obesidad y en el hipertiroidismo. El sulfato de estrona, formado por la conversión periférica de estrógeno y estrona, circula en mayor cantidad en sangre, pero carece de actividad biológica. La secreción de estrógeno es de 90 a 150  $\mu\text{g}/\text{día}$  en la fase folicular y de 200 a 2500  $\mu\text{g}/\text{día}$  en la fase lútea. Se eleva bruscamente antes de la ovulación y constituye lo que se conoce como pico pre-ovulatorio. La biosíntesis de los estrógenos es similar en todas las glándulas que producen hormonas esteroideas. El ovario utiliza principalmente el colesterol proveniente del LDL-colesterol que se almacena en el citoplasma en forma de gotas; conforme se requiere, es hidrolizado por la enzima colesterol esterasa, activado por la LH. Como resultado se acumula AMPc como segundo mensajero, el cual estimula la producción de un RNA mensajero para el receptor del colesterol. El colesterol libre se transporta a la mitocondria para iniciar el proceso de esteroidogénesis. El colesterol es convertido a  $\Delta 5$ -pregnenolona, un compuesto de 21 carbonos, por ruptura de su cadena lateral por la acción de la enzima 20,22-desmolasa en las mitocondrias. Esta conversión es el paso limitante de la esteroidogénesis ovárica y está catalizado por un complejo de enzimático compuesto por una enzima citocromo P450 (producto del gen *CYP11A1*), adrenodoxina y flavoproteína A. La  $\Delta 5$ -pregnenolona se convierte en progesterona mediante la acción de 2 enzimas, la  $3\beta$ -ol-deshidrogenasa ( $3\beta$ -DSH) y la  $\Delta$ -isomerasa. La pregnenolona también forma andrógenos por la vía  $\Delta 5$ , dando lugar a la dehidroepiandosterona (DHEA), teniendo como paso intermedio a la  $17\alpha$ -OH-pregnenolona. Para la síntesis de andrógenos y estrógenos, el folículo utiliza la vía  $\Delta 5$  en la que es más eficiente; por el contrario el cuerpo lúteo emplea la  $\Delta 4$  por la misma razón. La enzima encargada del metabolismo de DHEA a androstenediona, es una  $3\beta$  hidroxio-esteroide isomerasa. La androstenediona es el principal andrógeno sintetizado en el ovario, aunque también se producen pequeñas cantidades de testosterona y dihidrotestosterona. Los andrógenos, precursores de los estrógenos; la transformación se logra mediante un proceso denominado aromatización, que lleva a la elaboración de un compuesto fenólico de 18

carbonos a partir de un esteroide neutro de 19 carbonos. La aromatización de la androstenediona produce estrona, y la testosterona da lugar a la formación de estradiol. A su vez, la testosterona se interconvierte con androstenediona y la estrona con estradiol mediante la enzima  $17\beta$ -oxidoreductasa. Los principales sitios de producción esteroide en el ovario son la granulosa, teca y cuerpo lúteo que poseen el complemento enzimático requerido para toda la esteroidogénesis. Sin embargo, la producción individual está determinada por el nivel de gonadotropinas y sus receptores, la expresión de las enzimas esteroidogénicas y la cantidad de colesterol disponible <sup>(Flores-Lozano. 2005; Kronenberg. 2009)</sup>.

II) Los principales progestágenos son esteroides de 21 carbonos e incluyen la pregnenolona, progesterona ( $P_4$ ) y 17-hidroxiprogesterona. La pregnenolona es de vital importancia en el ovario por su posición clave como precursora de todas las hormonas esteroides. Por otro lado, la progesterona es el producto principal del cuerpo lúteo, responsable de la inducción de la actividad secretoria endometrial del útero. La progesterona es necesaria para la implantación del óvulo fecundado y para el mantenimiento del embarazo. Induce también la decidualización del endometrio, inhibe las contracciones uterinas, aumenta la viscosidad del moco cervical, favorece el desarrollo lateral de las glándulas mamarias y aumenta la temperatura basal del cuerpo. El ovario secreta entre 3-6 mg/día en la mitad de la fase folicular y entre 20-40 mg/día a mediados de la lútea. La  $20\ \alpha$ -OH progesterona, aumenta 2 o 3 días antes de la ovulación. En un ciclo menstrual la cantidad sintetizada es de aproximadamente 200 mg <sup>(Flores-Lozano. 2005; Kronenberg. 2009)</sup>.

III) Los andrógenos son esteroides de 19 carbonos e incluyen a la testosterona (T), la dehidroepiandosterona (DHEA), la androstenediona (A) y la dihidrotestosterona (DHT). En los humanos, el testículo segrega diariamente de 3 a 10 mg de testosterona. La secreción directa de testosterona por la glándula suprarrenal y la conversión periférica de la androstenediona segregada por la glándula suprarrenal aportan en conjunto otros 500  $\mu$ g de testosterona diarios. En contraste el testículo humano segrega únicamente una cantidad pequeña de dihidrotestosterona que en su mayoría procede de la conversión periférica de la testosterona. La testosterona se produce en el testículo en las células de Leydig adultas. La secreción de testosterona está regulada por mecanismos de retroalimentación que actúan dentro del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La liberación de GnHR en el hipotálamo estimula la liberación

de LH en la hipófisis anterior lo que a su vez estimula a las células de Leydig del testículo para sintetizar testosterona. La secreción de testosterona tiene ritmos pulsátiles, diurno y circadiano. Las concentraciones más elevadas se observan en las horas siguientes al despertar y las concentraciones más bajas se encuentran dentro de las primeras horas de la tarde y al final del día. El colesterol necesario para la biosíntesis de testosterona puede llegar a la célula desde el colesterol circulante o puede sintetizarse dentro de las células *de novo* a partir del acetato o desde los ésteres de colesterol. El factor crucial en la biosíntesis de testosterona es el suministro de colesterol a la membrana mitocondrial interna, que es el punto del complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol en pregnenolona. La proteína reguladora de la esteroidogénesis (STAR) pone al colesterol a disposición del complejo de cadena lateral del colesterol y regula la tasa de biosíntesis de testosterona. La conversión del colesterol en testosterona puede producirse a través de dos vías biosintéticas la vía  $\Delta 5$  y la vía  $\Delta 4$ . En el testículo humano predomina la vía  $\Delta 5$  que conlleva a la escisión de la cadena lateral de la pregnenolona, reducción del grupo 17-ceto y oxidación del anillo A (Flores-Lozano. 2005; Kronenberg. 2009).

#### **1.4. Técnicas moleculares para el estudio de la expresión diferencial**

En la actualidad existen varios procedimientos moleculares que permiten evaluar la expresión diferencial en diversos organismos (Moody. 2001). Una de las primeras técnicas fue la hibridación sustractiva que se utilizó para comparar la expresión genética ante diversos estímulos y para generar bibliotecas genómicas de cDNA (Sargent. 1993). Los genes diferencialmente expresados se aíslan por la hibridación de cDNAs (que representan una muestra de prueba) con RNA mensajero proveniente de un organismo estimulado. Las secuencias tanto de doble cadena como de cadena sencilla se aíslan mediante cromatografía de hidroxapatita para comprobar los genes diferencialmente expresados. Una de las limitantes más importantes en esta técnica es que se necesitan grandes cantidades de RNA mensajero para llevar a cabo este tipo de ensayos. Posteriormente se implementaron otras técnicas mediante la utilización de RNA a bajas concentraciones. Williams y colaboradores (Williams. 1990) desarrollaron una técnica novedosa en la que comparaba la secuencia de DNA que provienen de un especie con otros DNAs de especies relacionadas Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPDs). En estos trabajos demostró la presencia de híbridos, así como la similitud de genomas provenientes de distintos sitios geográficos. Fue a partir de esta técnica que Liang y colaboradores (Liang. 1992) desarrollaron la técnica de despliegue diferencial. Esta técnica está basada en la síntesis de cDNA a partir de RNA total utilizando oligonucleótidos arbitrarios que poseen fragmentos repetidos de Timinas (poli T) las cuales se unen a los mRNAs que se caracterizan por la

presencia de colas de poli A al inicio de sus secuencias. Posteriormente se realiza una PCR con los mismos oligonucleótidos arbitrarios para finalmente comparar una o varias situaciones respecto a un control sin tratar. Una limitante importante en esta técnica para el presente estudio es que únicamente se puede utilizar en transcritos de eucariontes, ya que los transcritos de los procariontes carecen de estas colas de poli A. En años recientes, se implementó una variante de despliegue diferencial utilizando mRNA de origen procarionte. Esta técnica llamada "RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR (RAP-RT-PCR)"<sup>(Welsh. 1992; McClelland. 1995; Fislage. 1997; Mathieu. 1999; Benson. 2000; Sturtevant. 2000; Chia. 2001; Walters. 2001)</sup> utiliza oligonucleótidos arbitrarios de tamaño corto para iniciar la transcripción inversa a diferencia de los oligonucleótidos con secuencias de poli T utilizados en la técnica original<sup>(Liang. 1992)</sup>. A pesar de la gran ventaja que ofrece esta técnica, son pocos los reportes en donde se utiliza este tipo de procedimiento en comparación con los trabajos en que se utiliza la técnica de despliegue diferencial en eucariontes.

## **II) ANTECEDENTES**

### **2.1. Influencia de las hormonas esteroides sobre el cambio fenotípico y genético en diversos organismos**

Las hormonas esteroides controlan principalmente la reproducción, el crecimiento y el desarrollo de órganos sexuales en los mamíferos. Sin embargo, existen diversos campos de estudio de la microbiología que investigan el papel que desempeñan en la fisiopatogenia de diversas enfermedades. En diferentes reportes se ha demostrado que la susceptibilidad hacia algunas patologías infecciosas se encuentra relacionada con el estatus genérico del individuo, presentando los hombres una mayor incidencia de enfermedades infecciosas en comparación con las mujeres<sup>(Klein. 2000)</sup>.

En numerosos trabajos se ha puesto en evidencia que los machos de varias especies animales (p. ej. nemátodos, insectos, peces, reptiles, aves y mamíferos) presentan una mayor susceptibilidad a enfermedades causadas por diversos agentes infecciosos. Lo anterior provoca que los machos presenten una vida media más corta que las hembras<sup>(Klein. 2000)</sup>. Se ha sugerido que la susceptibilidad diferencial a enfermedades infecciosas en machos y hembras está relacionada con el sistema inmune y el sistema endócrino de cada uno de estos. Varios estudios explican que las hormonas esteroides regulan diferentes aspectos de la inmunidad del hospedero<sup>(Pung. 1984; Ansar. 1985; Yamamoto. 1991; Sonex. 1998; Klein. 2000; Tsuyuguchi. 2001; Bouman. 2005; McClelland. 2011)</sup>. Klein infiere que las hormonas esteroides se encuentran implicadas en la susceptibilidad y resistencia diferencial a infecciones entre hembras y machos. En particular, se ha sugerido que los andrógenos reducen la inmunocompetencia del individuo, afectando la expresión de genes involucrados

en la resistencia a enfermedades <sup>(Klein. 2000)</sup>. Lo anteriormente citado conduce a que los machos presenten una respuesta inmune deficiente asociada a una disminución en la producción de anticuerpos. Además se sabe que la respuesta inmune de los machos es principalmente anti-inflamatoria. Las hembras por otro lado, presentan una eficiente respuesta inmune, una alta producción de anticuerpos, una alta respuesta humoral y una respuesta pro-inflamatoria a diferencia de los machos <sup>(Klein. 2000)</sup>.

En diferentes revisiones se ha reportado que los machos son más susceptibles que las hembras a un gran número de enfermedades por *protozoarios, hongos, bacterias*, entre otros <sup>(Klein. 2000; McClelland. 2011)</sup>. Algunos ejemplos de parásitos que infectan al humano de forma diferencial de acuerdo a su estatus genérico son *Schistosoma, Leishmania, Plasmodium* y *Taenia* <sup>(Goble. 1973; Billingham, 1986; Zuk. 1996; Klein. 2000; Klein. 2004)</sup>. En un estudio realizado por Eidinger en 1972, en el cual utilizó a algunos protozoarios como agentes infecciosos, se demostró que en ratones machos gonadectomizados se monta una eficiente respuesta inmune similar a la de las hembras. Por su parte, los machos que no fueron gonadectomizados presentaron una alta susceptibilidad ante estos agentes infecciosos <sup>(Eidinger. 1972)</sup>. Lo anterior nos sugiere que las hormonas esteroides, en particular la testosterona estaría jugando un papel fundamental en el establecimiento de ciertas enfermedades parasitarias, lo cual en parte podría explicarse por la baja respuesta inmune asociada a la presencia de esa hormona <sup>(Klein. 2000; McClelland. 2011)</sup>.

A pesar de que en estos estudios se sugiere que los niveles de testosterona son el principal factor que favorece o no el establecimiento de una enfermedad, las concentraciones de estradiol son de igual importancia. Por ejemplo, la enfermedad causada por *Leishmania mexicana* afecta en mayor proporción a hombres que a mujeres, sin embargo las infecciones por este parásito se encuentran relacionadas en gran parte por la concentración elevada de estradiol. Se conoce que la resistencia contra *L. mexicana* está relacionada con los efectos del estradiol sobre el incremento de la transcripción del mRNA de Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) en el ratón. En este estudio se utilizaron ratas hembras en las que se inhibió la producción de IFN $\gamma$  por medio de anticuerpos monoclonales. Por su parte, las ratas macho fueron tratadas con una dosis de IFN $\gamma$  recombinante. Los resultados demostraron que las diferencias sexuales en cuanto a la progresión de la infección se invirtieron, es decir, las hembras que usualmente son resistentes a la infección por *L. mexicana* demostraron una mayor susceptibilidad que los machos <sup>(Roberts. 1992)</sup>, sugiriendo que las concentraciones de estradiol son determinantes en la susceptibilidad de la enfermedad por *L. mexicana*.

Al igual que las enfermedades causadas por protozoarios, las enfermedades causadas por hongos siguen el mismo patrón, presentando los machos una mayor susceptibilidad a éstas. Existen tres enfermedades causadas por hongos que presentan una marcada especificidad de género: criptococosis, candidiasis y paracoccidioidomicosis <sup>(McClelland. 2011)</sup>. En el caso de la criptococosis, causada por *Cryptococcus neoformans*, se ha observado una tendencia a presentarse con mayor frecuencia en los hombres <sup>(Dromer.1996; Hajjeh. 1999; Amorinkul. 2003)</sup>. Experimentos *in vitro* han demostrado que el estradiol inhibe el crecimiento de *C. neoformans* <sup>(Mohr. 1972)</sup>. La candidiasis por *Candida albicans* se encuentra íntimamente ligada a la concentración de hormonas esteroideas. *Candida albicans* es un hongo oportunista que forma parte de la microbiota de la mayoría de los humanos sanos <sup>(Calderone. 2001)</sup>. Bajo condiciones de inmunosupresión, *C. albicans* puede convertirse en patógeno e invadir el tejido de su hospedero <sup>(Ruiz Herrera et al 2006)</sup>. En mujeres con VIH y candidiasis oral se ha encontrado que existe una mayor carga fúngica con respecto a hombres con el mismo padecimiento <sup>(Nebavi. 2006)</sup>. En un estudio realizado por Mathur, se estudió la producción de anticuerpos contra *C. albicans*. En este trabajo se evaluó a mujeres normales, mujeres con una disfunción ovárica, mujeres que utilizaban un anticonceptivo hormonal y hombres normales. Los resultados demostraron que las mujeres normales infectadas en la fase lútea de su ciclo menstrual (cuando la concentración de estradiol es más baja) presentan una mayor cantidad de células fúngicas y una respuesta de anticuerpos baja en comparación con la fase folicular en la cual existe una alta concentración de estradiol. En las mujeres con deficiencia en la producción de estradiol y una producción normal de progesterona, se encontraron resultados similares a los encontrados en el grupo de hombres: una alta concentración de *C. albicans* y una alta producción de anticuerpos. Por último, las mujeres que consumían un anticonceptivo a base de progesterona contenían una alta carga fúngica en comparación con las mujeres en fase folicular. Los autores sugieren que el estradiol pueden aumentar la inmunidad y proteger al humano contra infecciones por *C. albicans* <sup>(Mathur. 1978)</sup>.

Por otro lado, la paracoccidioidomicosis, infección causada por *Paracoccidioides brasiliensis*, es más frecuente en hombres que en mujeres en una relación de 28:1 en México <sup>(Fernandez. 2005)</sup>. Estudios realizados por Restrepo y Salazar demostraron que *P. brasiliensis* posee una proteína que fija estradiol, inhibiendo la transformación de la fase infectiva (micelio) a la fase parasitaria (levadura). Lo anterior explica en parte la alta incidencia de la enfermedad en hombres con respecto a las mujeres <sup>(Restrepo. 1984; Salazar. 1988)</sup>.

En cuanto a las infecciones por bacterias, se ha observado en general que los machos suelen ser más vulnerables. Algunas especies de bacterias que afectan en forma diferencial a hombres y a mujeres

son: *Mycobacterium intracellulare*, *Treponema palladium*, *Borellia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli* y *N. brasiliensis* (Hlady. 1996; Kaushic. 2000; Merkel. 2001; Seo. 2003; Oliver. 2005; Jarefors. 2006, López. 2006). Por ejemplo, la septicemia causada por *Vibrio vulnificus* en Estados Unidos presenta una marcada especificidad de acuerdo al género. En un estudio realizado durante 13 años en Florida, se demostró que en las infecciones por *V. vulnificus*, el 11% de los individuos fallecieron, todos ellos de género masculino (Hlady. 1996; Oliver. 2005). En el año 2001, Merkel realizó un estudio con ratas hembras a las cuales se les practicó una ovariectomía y se les inoculó *V. vulnificus*. Los resultados demostraron que la mortalidad de estas ratas aumentaba significativamente, de manera similar a la mortalidad que se observó en los machos. La administración de estradiol en ratas gonadectomizadas de ambos géneros mejoró la gravedad de la infección (Merkel. 2001).

Existen algunos estudios donde se evalúa el efecto de la testosterona en el establecimiento de diversas enfermedades en el hospedero. Seo y colaboradores en el 2003 demostraron que la privación de la testosterona en ratas por medio de finasteride, un medicamento cuyo ingrediente activo es una enzima reductasa que convierte la testosterona en dihidrotestosterona, funciona como un tratamiento efectivo contra la prostatitis bacteriana crónica causada por *E. coli*, sin reducir los niveles de testosterona circulante en ratones (Seo. 2003).

Los diversos estudios clínicos y epidemiológicos que se presentan a manera de antecedentes en este trabajo manifiestan el predominio de los hombres a presentar diversas enfermedades. Sin embargo, son pocos los trabajos en donde se hace referencia al efecto de las hormonas esteroides sobre la expresión génica de los agentes infecciosos.

En el estudio realizado por Amirshahi se estudió el efecto del estradiol y la progesterona en la expresión génica de *Chlamydia trachomatis*. *Chlamydia trachomatis* es una bacteria intracelular obligada que infecta el tracto genital por contacto sexual en humanos. Estudios realizados con modelos animales infectados con este microorganismo en el epitelio del tracto genital sugieren que el estatus hormonal en el momento de la infección puede influir en el éxito de la infección (Amirshahi, 2011). Para evaluar el efecto de las hormonas sexuales en el transcriptoma de *C. trachomatis* se realizó un cultivo celular con una línea de células epiteliales humanas. A estas células se les adicionó por separado cada una de las hormonas a una concentración sérica humana normal. Posteriormente se inoculó *C. trachomatis* en cada una de las condiciones (estradiol, progesterona, estradiol + progesterona y sin hormona). Para cada uno de los tratamientos se extrajo el RNA y se realizaron hibridaciones en microarreglos que contenían el

transcriptoma de *C. trachomatis* para evaluar la sobre expresión o la inhibición de la expresión génica. Los resultados demostraron que aproximadamente el 25% del transcriptoma de *C. trachomatis* fue alterado en respuesta a ambas hormonas. Sesenta y tres genes que representan el 7% del transcriptoma se sobre expresaron, mientras que 151 genes (17% del transcriptoma) inhibieron su expresión génica bajo la influencia de estradiol. En el caso de la exposición a progesterona, 85 genes (10% del transcriptoma) se sobre expresaron y 135 genes inhibieron su expresión genética (15% del transcriptoma). De todos estos genes se seleccionaron aquellos que presentaban una tasa de cambio alta. La regulación de seis genes a partir de la estimulación por estradiol (*omcB*, *trpB*, *cydA*, *cydB*, *pyk* y *yggV*) sugiere una respuesta de estrés similar a la reportada previamente en otros modelos de persistencia por *Chlamydia*. Por su parte, la estimulación por progesterona dio lugar a una sobre expresión en general en cuanto a los genes requeridos para la utilización de energía (Amirshahi. 2011).

## 2.2. Influencia de las hormonas esteroides en *N. brasiliensis*

En cuanto a *N. brasiliensis*, existen varios estudios epidemiológicos en donde se hace referencia a la susceptibilidad que presentan los hombres ante el micetoma (González-Ochoa. 1962; Latapí. 1963; Mariat. 1963; Orio. 1963; Lavalle. 1966; Develoux. 1988; Hay. 1992; Hernández-Hernández. 1995; López. 2006; Fahal. 2004; Venkatswami. 2012). Orio y colaboradores plantearon la existencia de una resistencia natural de las mujeres al micetoma posiblemente debida a causas hormonales, lo que podría explicar en parte la diferente incidencia entre hombres y mujeres (Orio. 1963).

Lavalle en 1966 enfatizó el hecho de que la diferente incidencia del actinomicetoma entre mujeres y hombres es un factor de resistencia antimicetoma que está ligado al estatus genérico asumiendo que este fenómeno es debido a las hormonas sexuales. Este autor menciona el caso de una mujer de 21 años que durante tres años había presentado un micetoma de tamaño pequeño causado por *N. brasiliensis* que se exacerbó cuando tuvo su primer embarazo. Posterior al parto, la mujer fue tratada con griseofulvina. Tras este tratamiento la mujer presentó una notable mejoría. Sin embargo, un segundo embarazo provocó una recaída del micetoma. En otro caso clínico presentado por el mismo autor, un paciente de dos años de edad presentó un micetoma causado por *N. brasiliensis* el cual curó sin necesidad de medicamento. Tiempo después, cuando el niño entró a la pubertad, se desarrolló un nuevo micetoma que crecía con rapidez (Lavalle. 1966).

Hernández-Hernández y colaboradores realizaron un trabajo más profundo acerca del efecto de las hormonas esteroides en el micetoma experimental así como en el desarrollo de *N. brasiliensis in vitro*.

En los estudios *in vitro* se evaluó el crecimiento radial de la colonia bajo la estimulación con estradiol, progesterona y testosterona por separado en el medio de cultivo a 3 diferentes concentraciones. Por otro lado, evaluaron el crecimiento de la masa bacteriana a través del consumo de glucosa bajo la estimulación de una sola concentración de cada una de las tres hormonas por separado. Los resultados mostraron que la progesterona y la testosterona producen un efecto inhibitorio en el crecimiento de *N. brasiliensis*. Por otra parte, en presencia de estradiol observaron un ligero efecto estimulante en el crecimiento de la masa bacteriana (Hernández-Hernández, 1995).

En el estudio *in vivo* se evaluó la evolución del micetoma experimental en ratones hembras y machos con la aplicación periódica de estradiol o progesterona en las hembras y testosterona para los machos. Previo a la infección con *N. brasiliensis*, se midió el diámetro del cojinete plantar izquierdo para evaluar el aumento de volumen de la inflamación de la región afectada a causa de *N. brasiliensis* posterior a la infección. Al término del periodo de observación (49 días), los ratones fueron sacrificados y de la zona infectada se realizaron cortes histológicos para determinar el índice de invasividad y el número de retrocultivos. Los resultados demostraron que el grupo de ratones hembra tratadas con estradiol fue menos afectado, debido a que no presentó aumento de volumen al término del estudio; a la sexta semana, prácticamente todos los ratones habían recuperado el diámetro plantar que presentaban al inicio del tratamiento. El grupo de ratones hembra tratado con progesterona presentó una evolución del micetoma muy irregular; la tendencia a la recuperación del diámetro normal del cojinete plantar en este tratamiento fue menor respecto al grupo de ratones tratados con estradiol. Por último, los grupos de ratones machos tratados con testosterona presentaron los mayores diámetros manteniendo el máximo diámetro durante todo el periodo (49 días).

En el estudio histopatológico se observó que los cortes del cojinete plantar de ratones tratados con testosterona presentaron el mayor número de granos con un índice de invasividad de 0.5 en la escala de 1. En los cortes histológicos de ratones tratados con progesterona se observó un índice de invasividad de 0.27. El menor número de granos se observó en los cortes correspondientes a los ratones tratados con estradiol en donde reportaron un índice de invasividad del 0.23.

Por último el retrocultivo de los ratones con testosterona presentó el mayor porcentaje presentándose en el 59%. En el caso de la progesterona se presentó un porcentaje de recuperación del 30% y con estradiol un porcentaje de recuperación del 4.7% del total de los ratones.

En los estudios *in vitro* la tendencia general del estradiol fue producir una estimulación del crecimiento de *N. brasiliensis*, contrario al efecto de la progesterona y la testosterona que indujeron un efecto inhibitor. Estos datos no concuerdan con los resultados de estudios anteriores. Sin embargo, los efectos *in vivo* demostraron resultados opuestos en donde el estradiol indujo un efecto inhibitor debido a un menor diámetro de la almohadilla plantar en los ratones inoculados con *N. brasiliensis* así como un menor índice de invasividad y un menor número de retrocultivos contrario a lo sucedido con testosterona y progesterona. Los resultados anteriores se acercan de manera similar a lo reportado en estudios epidemiológicos en donde las mujeres parecen presentar un efecto protector ante la infección por *N. brasiliensis* (Hernández-Hernández, 1995).

### III) JUSTIFICACIÓN

En el actinomicetoma experimental murino causado por *N. brasiliensis* se ha demostrado que las hormonas esteroides modifican su evolución. En esta instancia, se desconoce el efecto de estas hormonas en la expresión de los genes que pudieran estar relacionados con el crecimiento bacteriano y/o con la fisiopatogenia de la enfermedad.

### IV) HIPOTESIS

Si las hormonas esteroides son capaces de modificar el crecimiento de *Nocardia brasiliensis in vitro* y modificar la fisiopatogenia del actinomicetoma experimental, es probable que estos compuestos influyan en la expresión genética de esa bacteria.

### V) OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

- Identificar los genes de *N. brasiliensis* que son modificados en su expresión ante la presencia de  $17\beta$ -estradiol y testosterona.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el aislado clínico FM825 de *N. brasiliensis*
- Determinar la curva de crecimiento de *N. brasiliensis*
- Estandarización de la técnica RAP-RT-PCR

- Determinar la concentración de 17  $\beta$ -estradiol y testosterona óptimas y tiempo de incubación para estudiar la expresión genética.
- Determinar los genes de *N. brasiliensis* que son modificados en su expresión ante la presencia de 17  $\beta$ -estradiol y testosterona, tomando como referencia los genes provenientes de *N. brasiliensis* tratada con el vehículo hormonal.
- Caracterizar en tamaño y secuencia por lo menos un gen que se considere crucial en el metabolismo vital y/o virulencia de *N. brasiliensis*
- Comparar este gen con la información disponible en la base de datos correspondiente para inferir su función.

## VI) MATERIAL Y METODOLOGÍA

En este trabajo se utilizó el aislado clínico de *N. brasiliensis* FM825, obtenido en Octubre del 2007 a partir de una fístula de micetoma localizada en extremidad inferior de un paciente masculino de 54 años, originario de la ciudad de Puebla, México.

### 6.1. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular del aislado clínico FM825

Se realizó un pre-cultivo del aislado clínico FM825 por estría de aislamiento en agar Brain Heart Infusion (BHI) durante 5 días a 28°C, a partir del cual se seleccionó una sola colonia con la que se inició un cultivo para los estudios subsecuentes.

#### Caracterización morfológica

**Morfología macroscópica.** Se realizó un cultivo en BHI por estría de aislamiento a una temperatura de 28°C por 7 días para determinar las características morfológicas de las colonias (coloración y aspecto).

**Morfología microscópica.** Para este estudio, se realizaron microcultivos a partir de una colonia de 7 días; se hizo una suspensión en agua destilada estéril y se sembró en una placa de agar BHI por estría masiva y sobre ella se insertaron diagonalmente cubreobjetos estériles. Este cultivo fue incubado por 7 días a una temperatura de 28°C y después de ese tiempo se recuperaron los cubreobjetos a los cuales se realizó una tinción de Gram y una de Kinyoun (tinción de ácido alcohol resistencia), previa fijación con calor.

#### Caracterización bioquímica

**Hidrólisis de caseína, tirosina, xantina e hipoxantina.** Para caracterizar bioquímicamente el aislado FM825 se prepararon medios de agar caseína, agar tirosina, agar xantina y agar hipoxantina <sup>(López. 2004)</sup> en placa, a los cuales se les inoculó en el centro un fragmento de un cultivo previo de 7 días para observar el halo de hidrólisis. El crecimiento fue evaluado en medio de gelatina al 0.4% <sup>(López. 2004)</sup> al cual se le inoculó un fragmento del aislado FM825. El aislado clínico FM556 de *N. asteroides* se utilizó como control negativo de esta prueba. Los resultados de las pruebas anteriores fueron comparados con los parámetros reportados como estándares para la identificación del aislado clínico FM825.

### **Caracterización molecular**

Se realizó la extracción y purificación de DNA. Se inoculó 500 µl de un cultivo previo de *N. brasiliensis* a un matraz con caldo BHI. Este cultivo fue incubado a 28°C en agitación a 120 rpm durante 5 días; se separó la masa bacteriana por medio de filtración en papel y posteriormente se secó con papel filtro estéril.

Para extraer el material nucleico, se rompió la pared celular por maceración de la masa bacteriana con nitrógeno líquido. El macerado se transfirió a dos tubos de 1.5 ml conteniendo buffer de lisis y proteinasa K (Proteinase K de Invitrogen), con la finalidad de digerir los componentes proteicos. Los tubos fueron incubados a 65°C durante 1 hora, se les adicionó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25-24-1), se agitaron vigorosamente hasta obtener una mezcla con aspecto lechoso y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a sendos tubos nuevos donde se le añadió 0.1 volúmenes de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol al 100%; se agitaron por inversión suave hasta observar el material nucleico. Después de observar la precipitación del DNA se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente en condiciones estériles. Una vez que el material nucleico se secó, se agregaron 30 µl de agua estéril milliQ. El DNA obtenido fue tratado con 10 µl de una solución de 10 mg/ml de RNasa a cada tubo, los cuales fueron incubados por una hora a 37°C.

Para cuantificar el DNA, se realizaron diluciones 1:500 de cada una de las muestras, y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro (Jenway Genova) a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros; se hicieron los cálculos para determinar la concentración en µg/µl, de acuerdo a la fórmula: densidad óptica a 260nm X 50 X Factor de dilución/ 1000.

Para verificar la pureza y cantidad del DNA, se tomaron 5 µl de DNA de cada uno de los tubos y se mezclaron con 1.6 µl de buffer de carga y 3.4 µl de agua milliQ. Esta mezcla se depositó en los pozos de un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio al que se le aplicaron 80 volts durante 1 hora. En uno de los pozos se incluyó el marcador de peso molecular ( $\lambda$  DNA/Hind III Fragments) para corroborar el peso del DNA extraído. Una vez concluida la migración se visualizó la calidad del material extraído en un transiluminador de luz ultravioleta UVP.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa

Una vez verificada la integridad del DNA, se procedió a realizar un PCR utilizando primers que permiten la amplificación de un fragmento del gen de la subunidad 16S del RNA ribosomal de 600 pb <sup>(Rodríguez-Nava. 2006)</sup>.

### Secuenciación

El fragmento amplificado fue purificado y enviado a secuenciar. El análisis de la secuencia por comparación con la base de datos del gen bank confirmó la identidad del aislado como *N. brasiliensis* con un 99%.

Para la PCR se utilizaron los siguientes reactivos y condiciones:

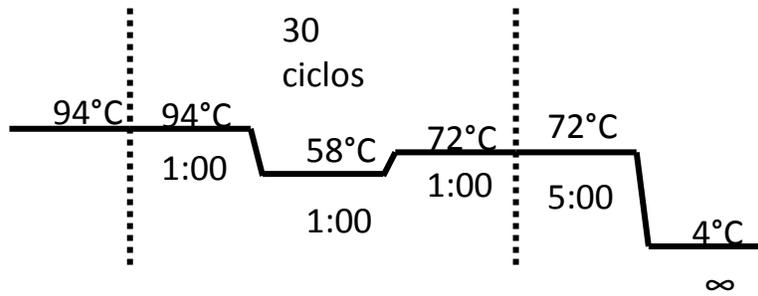
Primers

NOC 1            5'-GCT TAA CAC ATG CAA GTCG-3'

NOC2            5'-GAA TTC CAG TCT CCC CTG-3'

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> (30 mM)	1.2 mM
dNTP's (10 mM)	0.2 mM
NOC1 (5 µM)	0.4 mM
NOC2 (5 µM)	0.4 mM
DNA	20 ng
Taq polimerasa (Amplificasa BioTecMol)	2 U
H <sub>2</sub> O MQ	c.b.p. 50 µl

**Cuadro. 2** Concentraciones de los componentes de la PCR para amplificar la región del 16 S ribosomal.



**Figura 1.** Programa de temperaturas utilizado en el termociclador para la amplificación de la región del 16S ribosomal.

La purificación del producto de PCR se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante del QIAquick PCR purification kit (Qiagen).

## 6.2. Curva de crecimiento

Curva estándar de consumo de glucosa. Se realizó una curva de crecimiento por asimilación de glucosa a partir del medio de cultivo, de acuerdo al procedimiento descrito por Dubois y colaboradores con algunas adecuaciones volumétricas <sup>(Dubois, 1956)</sup>.

Para la cuantificación de azúcares en el medio se realizó una curva estándar para la cual se preparó una solución stock de 1mg/ml de glucosa. A partir de ésta se prepararon diferentes soluciones con concentraciones que oscilaron de 0 (blanco) hasta 250 µg/ml. A cada una de estas soluciones se les adicionó 25 µl de fenol al 80% y 2.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las soluciones fueron mantenidas a temperatura ambiente por 15 min y en agitación constante. Finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 480 nm.

Para la determinación del consumo de glucosa en el medio de cultivo, la cepa de *N. brasiliensis* FM825 fue inoculada en agar BHI e incubada a 28°C durante 1 semana. Se cosechó por filtración y con un fragmento de la masa bacteriana se preparó una suspensión a una concentración de 1.5x10<sup>9</sup> UFC/MI, de la cual se tomaron 500 µl para inocular cada uno de 5 matraces con 25 ml de caldo BHI; estos cultivos fueron incubados a 28°C a 120 rpm. De cada cultivo se tomó una muestra de 1 ml de medio cada tercer día por un periodo de 30 días. El medio fue filtrado a través de una membrana de un poro de 0.22 µm. En

este filtrado se determinó la concentración de glucosa. Con el inverso de la absorbancia ( $1/\text{Absorbancia}$ ) se determinó la dinámica del crecimiento bacteriano.

### **6.3. Métodos de extracción de RNA total**

Se realizaron ensayos preliminares para determinar el mejor método de extracción de RNA. Se probaron 3 métodos: extracción con fenol-cloroformo (Blin et al, 1976), la técnica fenólica con TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) y la extracción con un Kit comercial (Pure Link RNA mini kit de Invitrogen).

#### **Extracción de RNA total por medio de la técnica Fenol-cloroformo.**

A partir de un cultivo previo del aislado clínico de *N. brasiliensis*, se preparó una suspensión a una concentración de  $1.5 \times 10^9$  UFC/MI, de la cual se tomaron 500  $\mu\text{l}$  para inocular 25 ml de caldo BHI; este cultivo fue incubado a 28°C a 120 rpm por un periodo de 5 días. A este tiempo, se filtró el cultivo en papel filtro con poro de 0.2 $\mu\text{m}$ . Posteriormente, la masa bacteriana fue lavada con agua destilada estéril para eliminar los residuos de medio. La masa obtenida fue perfectamente secada con un papel filtro estéril.

En un tubo de 2 ml, se colocaron 0.75 ml de Buffer de lisis (NaCl 0.6 M, EDTA 10mM, Tris HCl 100mM pH 8.0, SDS 4%) y 0.75 ml de fenol (saturado con Tris HCl 0.1 M, pH 8.0).

Se pulverizó la masa bacteriana en un mortero que contenía nitrógeno líquido. El polvo fue transferido al tubo que contenía el buffer de lisis y posteriormente se agitó vigorosamente por un periodo de 15 a 20 minutos. La mezcla fue centrifugada por 10 minutos a 10 000 rpm; la fase superior fue transferida a un tubo limpio y se le adicionó 1 volumen de fenol (saturado con Tris HCl 0.1M pH 8.0); esta mezcla se agitó en el vórtex hasta homogenizar.

Posteriormente, se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se le agregó 0.75 volúmenes de LiCl 8M y se dejó toda la noche a una temperatura de 4°C. Al día siguiente, el tubo se agitó brevemente en el vórtex, se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm y se eliminó el sobrenadante por decantación. El pellet obtenido se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril y se mezcló con 30  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 750  $\mu\text{l}$  de etanol al 100%. Se dejó en reposo a -20°C por 2 horas y se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70%.

Se centrifugó 5 minutos a 10 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente para posteriormente resuspenderlo en agua tratada con DEPC. El RNA se almacenó a -20°C hasta su utilización.

#### **Extracción de RNA total por medio de la técnica fenólica con TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)**

La masa bacteriana fue recolectada por filtración en papel filtro. El material bacteriano fue macerado en presencia de nitrógeno líquido y transferido a 2 tubos conteniendo 1 ml de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). Se dejó 20 minutos en hielo y se le agregaron 200µl de cloroformo. Se agitó en vórtex por 40 segundos y se dejó 10 minutos en hielo para posteriormente centrifugar a 12 000 rpm durante 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa y se agregó 1 volumen de isopropanol. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante con cuidado de no desechar la pastilla y a esta fue lavada con 1 ml de etanol frío al 80% preparado con agua tratada con DEPC. Después de centrifugar por 8 minutos a 12 000 rpm y de decantar el sobrenadante, se dejó secar el sedimento; por último éste fue resuspendido en agua tratada con DEPC.

#### **Extracción de RNA total con el Pure Link RNA mini kit de Invitrogen.**

Este procedimiento fue realizado de acuerdo al fabricante.

La estandarización de la técnica RAP-RT-PCR se encuentra explicada en este trabajo en la parte de ANEXOS.

### **6.4. Determinación de la concentración hormonal de 17 β-estradiol y Testosterona y el tiempo de incubación óptimos para el estudio de expresión diferencial**

#### **6.4.1. Condiciones de cultivo**

Se estimuló a *N. brasiliensis* con diferentes concentraciones hormonales utilizando además un cultivo que contenía únicamente el vehículo hormonal.

Se prepararon 18 matraces que contenían 100 ml de caldo BHI y fueron etiquetados como se describe en el **Cuadro 3**.

Se preparó un precultivo de *N. brasiliensis* FM825 incubado en caldo BHI incubado a 28°C durante 5 días. La masa bacteriana fue cosechada por filtración (papel de 0.22µm) y lavada repetidas ocasiones con agua destilada estéril para eliminar la mayor cantidad posible de medio de cultivo. Con la masa

bacteriana se preparó una suspensión con solución salina a una concentración de  $1.5 \times 10^9$  UFC/MI, de la cual se tomaron 50  $\mu$ l para inocular a cada uno de los 18 matraces los cuales fueron incubados a 28°C y a 120 rpm.

Matraz	Leyenda
1	[E <sub>2</sub> ] 2 horas Vehículo CONTROL
2	[E <sub>2</sub> ] 2 horas [E <sub>2</sub> ] Normal
3	[E <sub>2</sub> ] 2 horas [E <sub>2</sub> ] 10x mayor
4	[T] 2 horas Vehículo CONTROL
5	[T] 2 horas [T] Normal
6	[T] 2 horas [T] 10x mayor
7	[E <sub>2</sub> ] 8 horas Vehículo CONTROL
8	[E <sub>2</sub> ] 8 horas [E <sub>2</sub> ] Normal
9	[E <sub>2</sub> ] 8 horas [E <sub>2</sub> ] 10x mayor
10	[T] 8 horas Vehículo CONTROL
11	[T] 8 horas [T] Normal
12	[T] 8 horas [T] 10x mayor
13	[E <sub>2</sub> ] 24 horas Vehículo CONTROL
14	[E <sub>2</sub> ] 24 horas [E <sub>2</sub> ] Normal
15	[E <sub>2</sub> ] 24 horas [E <sub>2</sub> ] 10x mayor
16	[T] 24 horas Vehículo CONTROL
17	[T] 24 horas [T] Normal
18	[T] 2 horas [T] 10x mayor

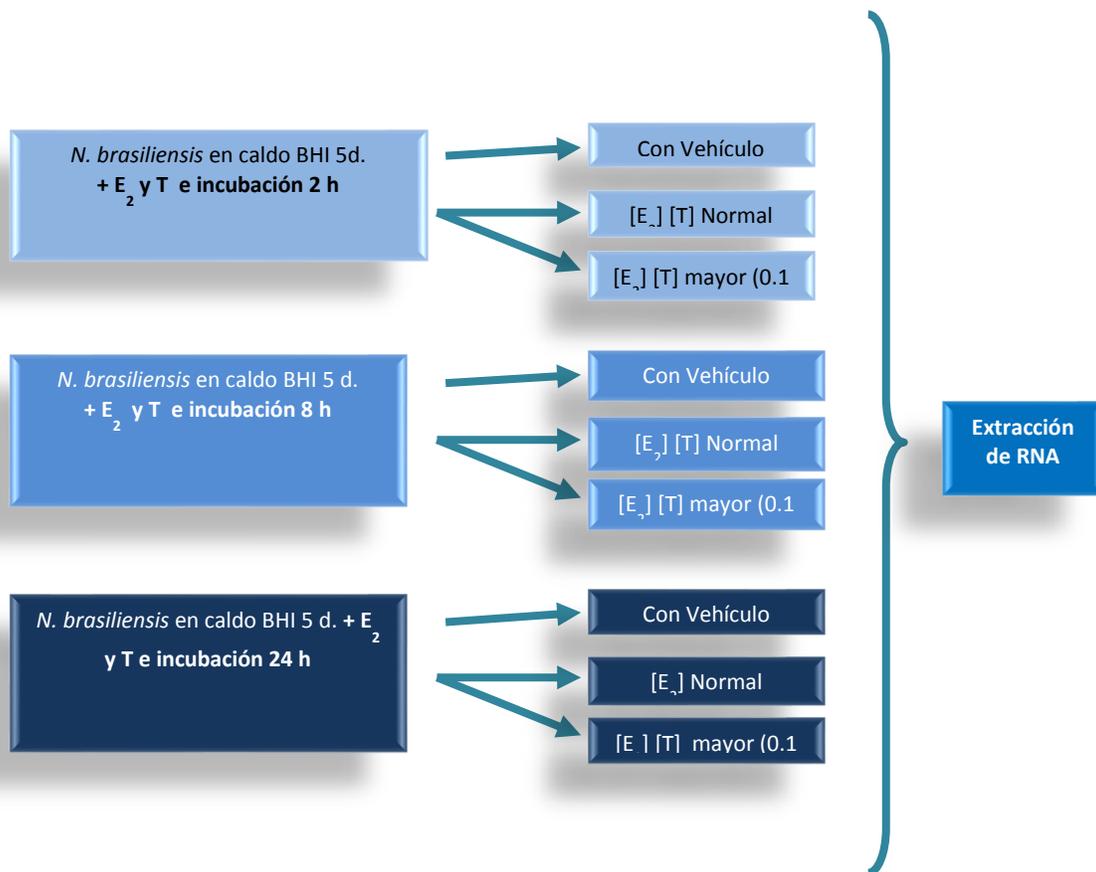
**Cuadro 3.** Condiciones de cultivo de *N. brasiliensis* estimulada con estradiol y testosterona.

Al quinto día de crecimiento bacteriano, se preparó una solución stock de las dos hormonas a utilizar. En el caso de  $17 \beta$ -estradiol se utilizó la hormona comercial de la marca SIGMA<sup>®</sup>. Se preparó una solución conteniendo 300 pg/ml que corresponden a la concentración sérica humana normal (CSHN) de una mujer adulta (fase lútea). Se determinó que esta cantidad corresponde a una concentración de 1nM y por lo tanto se realizaron los siguientes cálculos.

De la solución stock se hizo una dilución 1:1000 y se tomaron 27.2  $\mu$ l para adicionar a los matraces, 2, 8 y 14 (**Cuadro 3**). Para los matraces marcados con una concentración 10 veces la CSHN (10 nM) (**Cuadro 3**. Matraces 3, 9 y 15), se inocularon 272.6  $\mu$ l. Los matraces marcados únicamente con el vehículo hormonal para estradiol fueron inoculados con 27.2  $\mu$ l de etanol al 100% y fueron considerados

como control. Un procedimiento equivalente fue realizado con testosterona (SIGMA<sup>®</sup>) considerando como CSHN de un hombre adulto 3000 pg/ml (1040.22 nM).

Una vez adicionada la hormona correspondiente a cada uno de los cultivos, se mantuvieron en crecimiento por 2, 8 y 24 horas como se indica en el **Cuadro 3**. Pasados los tiempos de incubación se realizó la extracción de RNA por el método de TRIzol como se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Condiciones de cultivo y estimulación con 17  $\beta$ -estradiol o testosterona para la extracción de RNA y el estudio de la expresión genética diferencial. Para la PCR se utilizaron 5 juegos de primers aleatorios.

Con los procedimientos anteriores, se determinó la mejor técnica de extracción de RNA bacteriano, la cantidad de RNA total, cantidad de cDNA, la concentración de MgCl<sub>2</sub>, la combinación de primers, la temperatura de alineamiento y la enzima Taq polimerasa. Las concentraciones hormonales y los tiempos de exposición se mantuvieron como originalmente fueron planteados. Una vez definidas estas condiciones se llevó a cabo los experimentos definitivos de acuerdo a la Figura 2.

#### **6.4.2. Cuantificación de RNA**

A partir del RNA obtenido en las diferentes etapas experimentales, éste se cuantificó y se realizaron diluciones 1:500 de cada una de las muestras, por duplicado, se realizaron lecturas en un espectrofotómetro (Jenway Genova) a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros para determinar la concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de acuerdo a la siguiente fórmula: densidad óptica a 260nm X 40 X Factor de dilución/ 1000.

Para verificar la pureza y cantidad del RNA, se preparó un gel de agarosa al 1% que contenía 6% de formaldehído y MOPS 1X. Se colocaron 3  $\mu\text{l}$  de RNA de cada una de las muestras y se mezclaron con 1  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O+DEPC, 1.5  $\mu\text{l}$  de MOPS 10X (1X), 2.4  $\mu\text{l}$  de formaldehído (6%) y 7.5  $\mu\text{l}$  de formamida (50%). Cada uno de los tubos se calentó a 75°C por 5 minutos y después se colocó en hielo por 5 minutos. A cada uno de los tubos se agregaron 2.5  $\mu\text{l}$  de buffer de carga para RNA y 1  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio, se mezcló, se dio un pulso de centrifugación y se depositó en cada uno de los pozos del gel de agarosa al que se le aplicó un voltaje de 80 volts durante 1 hora. Una vez concluida la migración se visualizó el material nucleico en un transiluminador de luz ultravioleta UVP.

#### **6.4.3. Tratamiento con DNAsa**

Cada una de las muestras de RNA de *N. brasiliensis* fueron tratadas con la enzima DNAsa I (marca Invitrogen) para eliminar los residuos de DNA contaminante al extraer el RNA. En un tubo de 0.5  $\mu\text{l}$  se depositó 1  $\mu\text{g}$  de RNA seguido de 1 $\mu\text{l}$  de Buffer 10X y 1  $\mu\text{l}$  de DNAsa (1 U/ $\mu\text{l}$ ); finalmente se adicionaron 6 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O+DEPC. Esta mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se le adicionó 1 $\mu\text{l}$  de EDTA (25mM) y se calentó 10 minutos a 65°C para inactivar la reacción.

#### **6.4.4. PCR para descartar la presencia de DNA contaminante**

Una vez que los RNAs fueron tratados con la enzima DNAsa se corroboró que la expresión diferencial se debía únicamente a la conversión de RNA a cDNA y no DNA contaminante presente en las muestras de RNA. Para esto, se realizaron PCRs utilizando la enzima Taq Polimerasa de la marca Fermentas, enzima que tiene afinidad únicamente por el DNA.

#### **6.4.5. Síntesis de cDNA**

Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase de la marca Invitrogen. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

- En tubos de 0.2 µl se depositó:

Reactivo	Cantidad
Oligonucleótido aleatorio onceámero Ea (250ng)	1 µl
RNA tratado con DNAsa (0.5 µg/µl)	6 µl
dNTPs (10mM)	1 µl de cada uno
H <sub>2</sub> O Milli Q	1 µl

- Incubar a 65°C por 5 minutos y pasar los tubos rápidamente a hielo.

- Centrifugar brevemente y añadir:

Reactivo	Cantidad
Buffer (5X)	4 µl
DTT 0.1 M	2 µl

Posteriormente se mezcló suavemente y se incubó a 25°C por 2 minutos. Se añadió 1 µl de enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U). Se mezcló por pipeteo suave y se le añadió 1 µl de H<sub>2</sub>O Milli Q. Esta mezcla se incubó a 25°C por 10 minutos y a 42 °C por un tiempo de 50 minutos. Finalmente la reacción se incubó a 70°C por 15 minutos para inactivar la reacción.

#### 6.4.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el cDNA de cada una de las condiciones anteriores, se realizaron PCRs utilizando la enzima Taq Polimerasa de la Marca Fermentas y 5 juegos de primers aleatorios previamente probados (Cuadro 4) para cada una de las condiciones. Las condiciones y el programa para PCR se ilustran en el Cuadro 5 y la Figura 3.

Primers utilizados en RT	Primers utilizados en PCR
Ea3	Ea3+Es5
Ea4	Ea4+Es5
Ea4	Ea4+Es8
Ea8	Ea8+Es5
Ea8	Ea8+Es7

**Cuadro 4.** Juegos de Primers utilizados RT-PCR.

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> (10 mM)	1.5mM
dNTP's (2 mM)	200 µM

Ea3 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ M
Es5 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ M
cDNA	5 $\mu$ l
Taq polimerasa Fermentas®	3.75 U
H <sub>2</sub> O MQ	c.b.p. 30 $\mu$ l

Cuadro 5. Concentraciones de los reactivos para PCR.

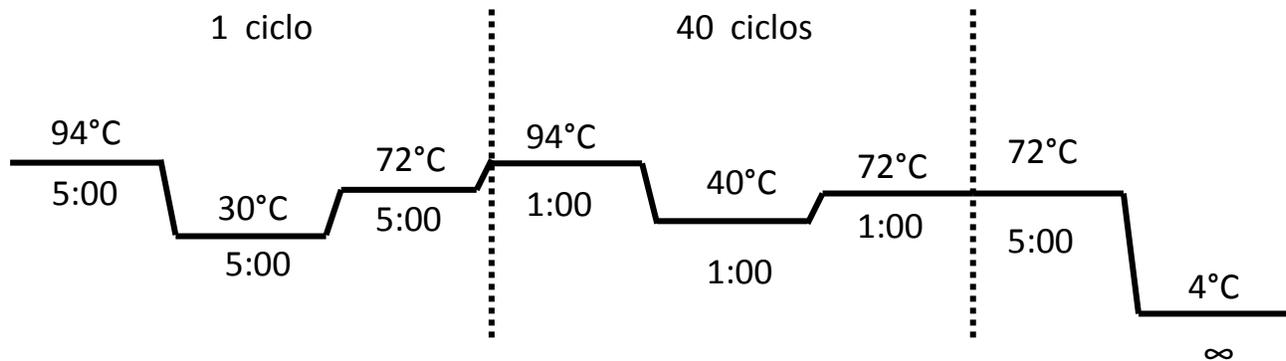


Figura 3. Programa de temperaturas para PCR modificada de Welsh, 1992.

## 6.5. Selección y purificación de genes de *N. brasiliensis* que son modificados en su expresión ante la presencia de hormonas esteroides.

### 6.5.1. Purificación de fragmentos diferenciales

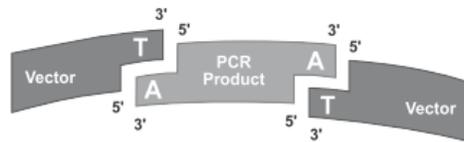
Para visualizar la expresión diferencial inducida por la presencia de hormonas esteroides, se tomaron 15  $\mu$ l de cada uno de los productos de PCR y fueron mezclados con 2.5  $\mu$ l de buffer de carga (Naranja G) para ser depositarlos en cada uno de los pozos de un gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio, el corrimiento se hizo con un voltaje de 80 volts durante 1 hora. En cada uno de los pozos de los extremos del gel de agarosa se incluyó el marcador de 100 pares de bases (Fermentas®). Una vez concluida la migración los productos fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta UVP.

Una vez identificadas las bandas expresadas diferencialmente, se procedió a cortarlas con ayuda de una hoja de bisturí estéril cortando únicamente donde se encontraba la banda de interés. Una vez pesados los fragmentos extraídos, se purificaron mediante el procedimiento sugerido por el fabricante del kit Purelink Gel Extraction de Invitrogen.

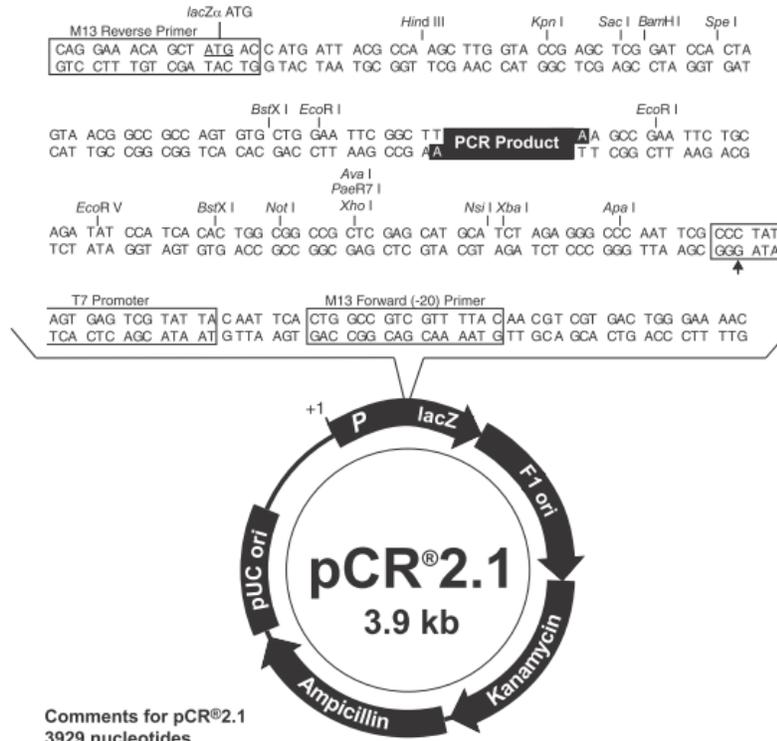
## 6.5.2 Clonación de los fragmentos diferenciales

### 6.5.2.1. Reacción de ligación

Para clonar los fragmentos diferencialmente expresados se utilizó el TOPO® TA Cloning® (with pCR® 2.1-TOPO® Vector). Una vez obtenidos los fragmentos diferenciales purificados previamente mencionados, se procedió a ligarlos a un vector plasmídico de clonación. Aquí es oportuno mencionar que la enzima Taq Polimerasa Fermentas® forma productos de PCR con extremos cohesivos, ideales para la ligación en este tipo de vector (**Figura 6**). En sendos tubos de 1.5 ml se colocaron 4 µl de cada uno de los productos de PCR purificados, 1 µl de solución salina y 1 µl del vector TOPO, obteniendo un volumen final de 6µl. Esta solución se mezcló suavemente y se dejó a temperatura ambiente por un tiempo de 30 minutos. En la **Figura 5** se muestra el mapa del vector de clonación y los sitios de inserción de los productos de PCR de interés.



**Figura. 4.** Extremos cohesivos de los productos de PCR formados por la Taq DNA Polymerase (recombinant) de Fermentas.



**Figura 5.** Mapa del Vector plasmídico de clonación 2.1 de Invitrogen <sup>®</sup>. Nótese el sitio de inserción del producto de PCR. Para corroborar la clonación. Se utilizaron los primer M13 Forward y Reverse para amplificar el fragmento de interés.

### 6.5.2.2. Preparación de células competentes

La cepa *E. coli* TG1 fue sembrada en agar Luria Bertani (LB) por estría masiva e incubada a 37°C de 24 a 48 horas. Se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de caldo LB y se incubó a 37°C por 2 horas a 300 r.p.m. Posteriormente se vació el cultivo en 100 ml de LB líquido y se incubó a 37°C en agitación a 300 r.p.m. Se realizaron mediciones del cultivo bacteriano en un espectrofotómetro hasta que se obtuvo una densidad óptica de 550. Una vez obtenida esta densidad, los 100 ml de cultivo fueron repartidos en dos tubos de 50 ml los cuales fueron centrifugados a 2.5 Krmp por 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 30 ml de solución Tfb1 con ayuda de un vórtex. Las células resuspendidas en la solución se incubaron en hielo por un periodo de 60 minutos. Pasado este periodo, los tubos fueron centrifugados a 2Krmp por 5 minutos a 4°C.

Las pastillas se resuspendieron con cuidado en 3 ml de solución TfbII (1 ml de TfbII por cada 10 ml de TfbI). Alícuotas de 100 µl fueron colocadas en tubos de 1.5 ml e inmediatamente fueron introducidas en nitrógeno líquido para después conservarlas a -70°C.

### 6.5.2.3. Transformación de Células competentes

Para la transformación de células competentes se prepararon placas de agar LB con ampicilina a una concentración de 50 µg/ml, e impregnadas con 40 µl de X-gal a una concentración de 40mg/ml. En tubos de 1.5 µl se colocaron 2 µl de cada una de las reacciones de ligación por separado y se mezcló con 20 µl de células competentes de *E. coli* TG1. Esta mezcla se incubó en hielo por un periodo de 30 minutos para posteriormente someterlas a un choque térmico de 42°C por 30 segundos y colocarlas en hielo inmediatamente. Posteriormente, se añadieron 150 µl de medio S.O.C. a temperatura ambiente. Se cerraron los tubos herméticamente y se incubaron en agitación horizontal a 37°C (220 rpm) por 1 hora.

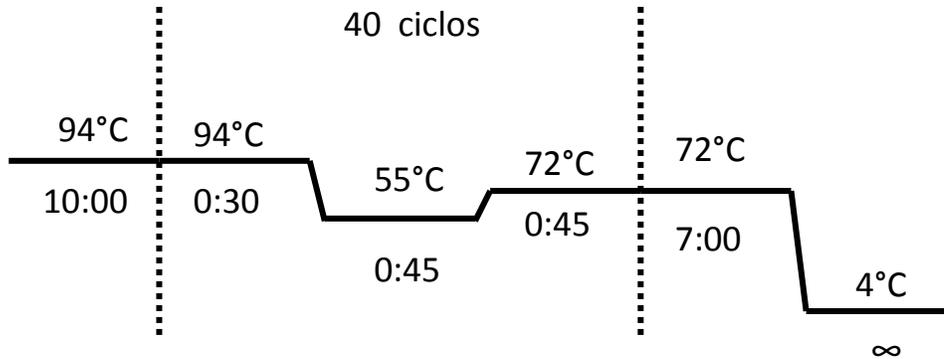
Una vez transcurrido el tiempo de incubación se inoculó toda la solución en las placas de agar LB con ampicilina y X-gal previamente incubadas a 37°C por 30 minutos. Finalmente se incubaron las placas a 37°C durante toda la noche.

### 6.5.2.3. Selección de clonas positivas

Después de 16 horas de incubación, las placas fueron revisadas y las colonias que presentaban una coloración blanca (consideradas clonas positivas) fueron resembradas en tubos con 3 ml de medio líquido LB con ampicilina e incubadas a 37°C por toda la noche. Después se utilizó un método rápido de extracción de plásmido (Nonidet P40) en donde una porción de las colonias blancas se picaron y se incubaron por separado en un tubo de 200µl que contenía 50µl del detergente Nonidet P40 al 1%. Cada uno de los tubos fue incubado 10 minutos en el termociclador a una temperatura de 95°C, se centrifugaron y se tomaron 4µl del sobrenadante para realizar un PCR con las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.2mM
dNTP's (10 mM)	400 µM
M13 F (25 µM)	340µM
M13 R (25 µM)	340µM
DNA plasmídico	4µl
Taq polimerasa Fermentas®	3.75 U
H <sub>2</sub> O MQ	c.b.p. 25 µl
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>30µl</b>

**Cuadro 6.** Concentraciones de los componentes de la PCR.



**Figura 6.** Programa de temperaturas utilizado en el termociclador para corroborar la clonación.

Para verificar la clonación, 5 µl del producto de PCR mezclados con 1.6 µl de buffer de carga y 3.4 µl de agua milliQ fueron depositados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio al cual se le aplicó un voltaje de 80 volts durante 1 hora. Una vez concluida la migración se visualizó el fragmento en un transiluminador de luz ultravioleta UVP. El peso molecular en pares de bases esperado correspondió al peso molecular del fragmento amplificado del gel M13 (202 pares de bases) más el tamaño en pares de bases del fragmento de interés.

Una vez identificadas las clonas positivas se procedió a purificar el plásmido mediante el crecimiento de las colonias en LB líquido con antibiótico incubado a 37°C durante toda la noche. Para ello se utilizó un kit de purificación de plásmidos (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit de Invitrogen®).

### **6.5.3. Secuenciación de fragmentos diferenciales**

Los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciar al Instituto de Biología en donde se utiliza un secuenciador automático que analiza DNA marcado con fluorescencia por medio de una electroforesis capilar. Los resultados obtenidos son codificados por medio de un software que los presenta como una secuencia escrita y como electroferograma. Cada una de las secuencias se ingresó al programa DNA Sequence Analysis Software - Sequencher 5.1 para obtener la calidad de las secuencias. Por medio de este programa se pudo visualizar la calidad de las secuencias para posteriormente editarlas a fin de retirar los

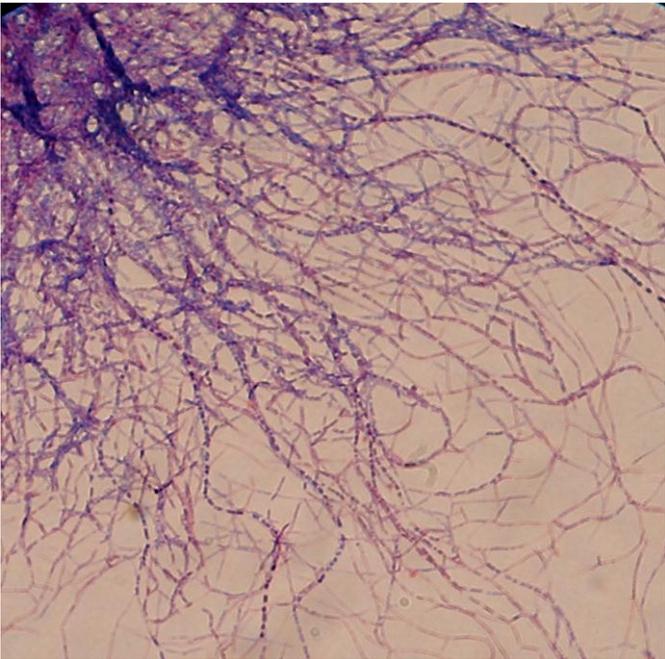
extremos de estas para finalmente introducirlas al programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) opción (blastx). Este programa busca secuencias de proteínas mediante el ingreso de una secuencia de nucleótidos que traduce en sus seis posibles marcos de lectura y así poder obtener las posibles vías metabólicas en que participan estos genes y hacer inferencias sobre su función

## VII) RESULTADOS

### 7.1. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular del aislado clínico FM825

Los resultados de todas las pruebas bioquímicas realizadas al aislado clínico FM825 coincidieron con la literatura, <sup>(Brown-Elliot. 2006; Berd. 1973)</sup> por lo que se confirmó la especie *N. brasiliensis*.

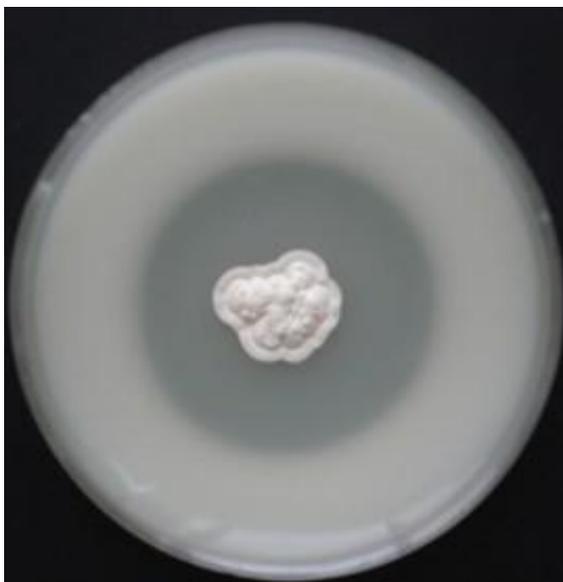
En las **Figuras 7 y 8** se muestran imágenes del aspecto microscópico y macroscópico. En las **Figuras 9, 10, 11, 12 y 13** se muestran las pruebas bioquímicas realizadas en el aislado clínico tipificado.



**Figura 7.** Morfología microscópica con tinción de Gram. Observación de filamentos largos ramificados, con estructuras bacilares (aislado clínico FM825).



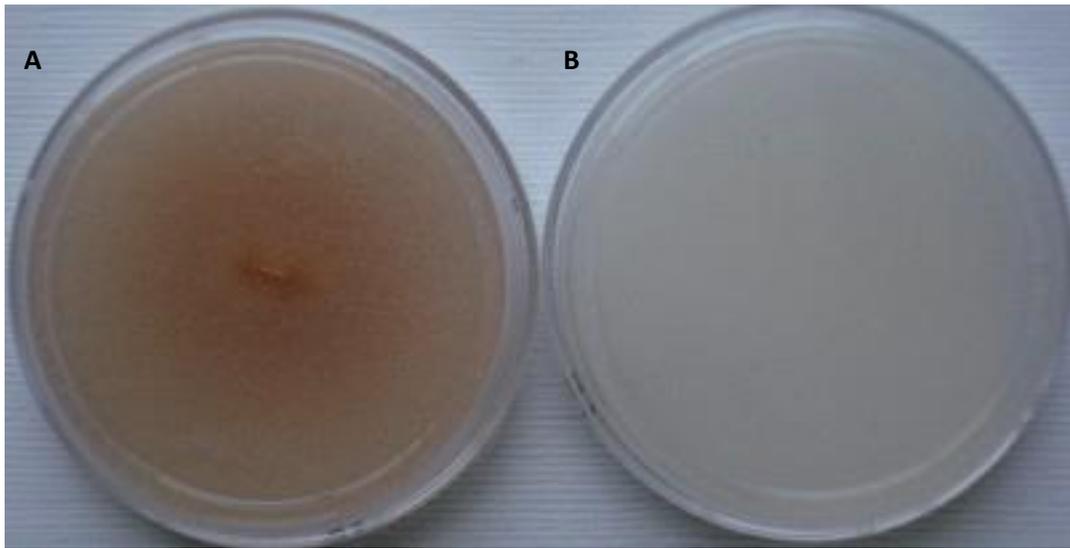
**Figura 8.** Morfología macroscópica. Colonia de color naranja, de aspecto céreo y veloso, de superficie rugosa (aislado clínico FM825).



**Figura 9.** Caseína: Halo alrededor del aislado clínico FM825.



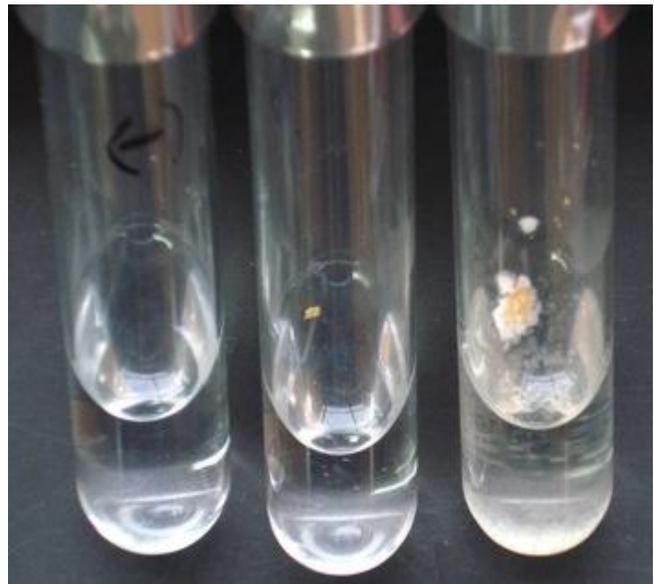
**Figura 10.** Hidrólisis de Xantina: *N. brasiliensis* (aislado clínico FM825) no asimila la xantina.



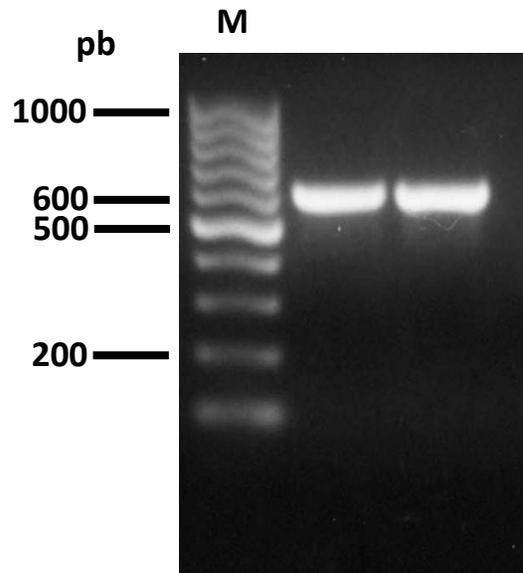
**Figura 11.** A. Hidrólisis de Tirosina (aislado clínico FM825). *N. brasiliensis* utiliza este compuesto. B. control sin inoculo.



**Figura 12.** Hidrólisis de Hipoxantina. *N. brasiliensis* (aislado clínico FM825) forma un halo transparente alrededor del inoculo.



**Figura 13.** Crecimiento en gelatina (0.4%). De izquierda a derecha: control sin inoculo; *N. asteroides* no crece; *N. brasiliensis* (aislado clínico FM825) es positiva a esta prueba.



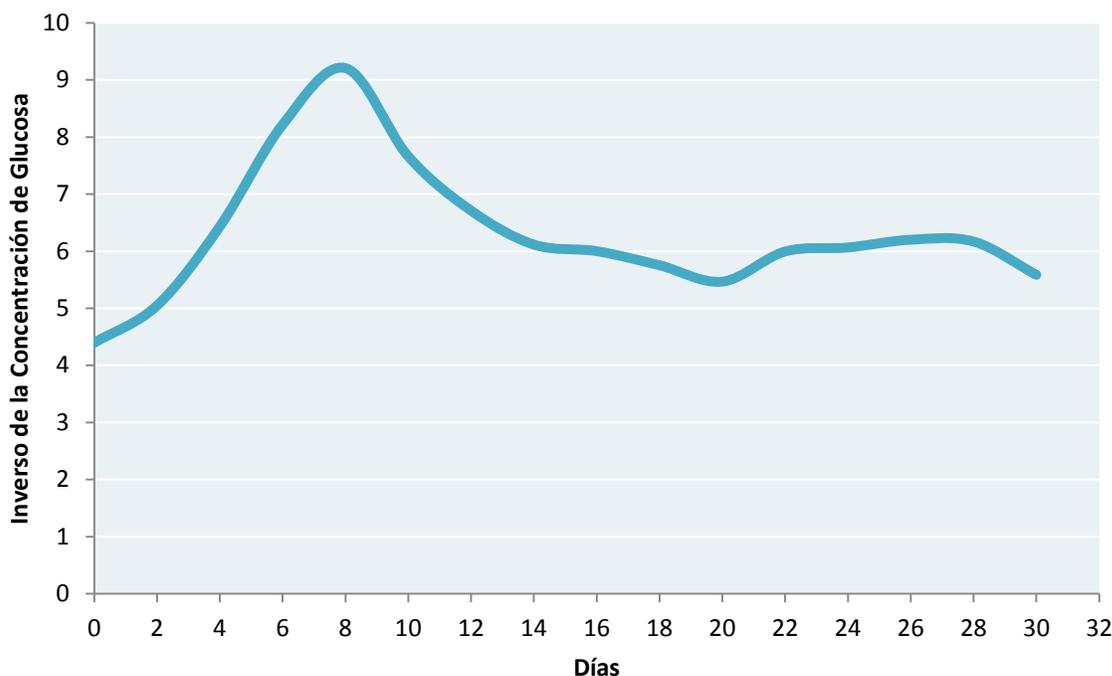
**Figura 14.** Amplificación de un fragmento de la subunidad mayor del gen 16S del RNA ribosomal utilizando los primers NOC1 y NOC2. El fragmento amplificado (por duplicado) es de 600 pb.

El producto de PCR obtenido de la PCR utilizando primers específicos (Noc1 y Noc2) que amplifican un fragmento de la subunidad pequeña del ribosoma 16S (**Figura 14**) fue purificado y enviado a secuenciar. Los resultados se compararon con la base de datos donde finalmente se confirmó que el aislado clínico FM825 pertenece a la especie *Nocardia brasiliensis* con una identidad del 99%.

## 7.2. Curva de crecimiento

Una vez confirmado el aislado clínico como *N. brasiliensis*, se realizó una curva de crecimiento por asimilación de glucosa, utilizando un método colorimétrico como se describió en metodología. Con el valor de la absorbancia se determinó el inverso el cual fue utilizado para construir una curva. Con ésta se evaluó el consumo de glucosa y así se estimó el crecimiento de la masa bacteriana. La falta de consistencia en los resultados condujo a realizar este procedimiento 5 veces y con el promedio de valores fue construida la curva mostrada en la Figura 15. Así se estableció el día 5 como el tiempo de crecimiento ideal para estimular a *N. brasiliensis* con las hormonas esteroides.

### Curva de Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* FM825



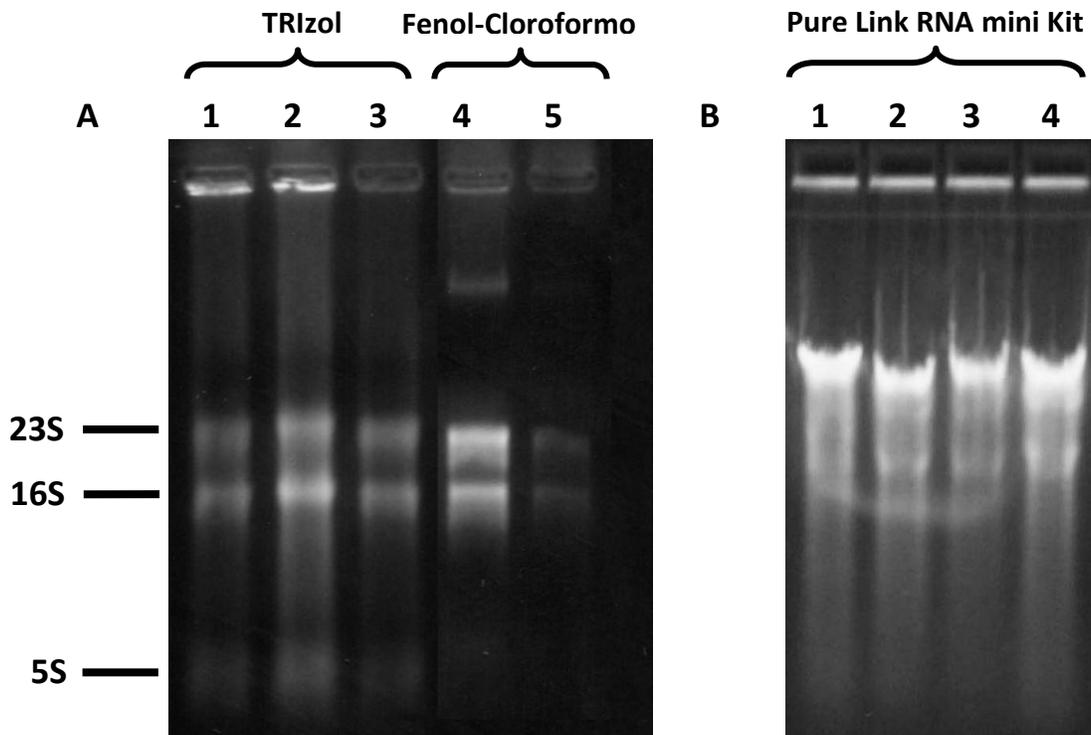
**Figura 15.** Curva de crecimiento por asimilación de glucosa en caldo BHI del aislado clínico de *N. brasiliensis* FM825. Nótese las distintas fases de crecimiento. Fase lag, alrededor de los 2 días, fase log a los 5 días y fase estacionaria a los 21 días.

Para los experimentos posteriores, se tomó en cuenta el día 5 como fase de crecimiento logarítmico para la incubación de hormonas esteroides.

#### 7.3. Selección del método de extracción de RNA utilizando TRIzol®

El proceso de extracción con TRIzol® dio como resultado un RNA de buena calidad, aunque con residuos de DNA; fueron perfectamente visibles las subunidades 23S, 16S y 5S.

Las dos muestras procesadas con fenol-cloroformo dieron como resultado una cantidad de RNA no uniforme a pesar de que se procesó una misma cantidad de masa bacteriana. No se observó la subunidad 5S. A pesar de que este procedimiento fue diseñado para extracción de DNA, puede ser una alternativa para la extracción de RNA. El producto de extracción con el kit comercial consistió solamente en un material compatible con DNA. **Figura 16.**



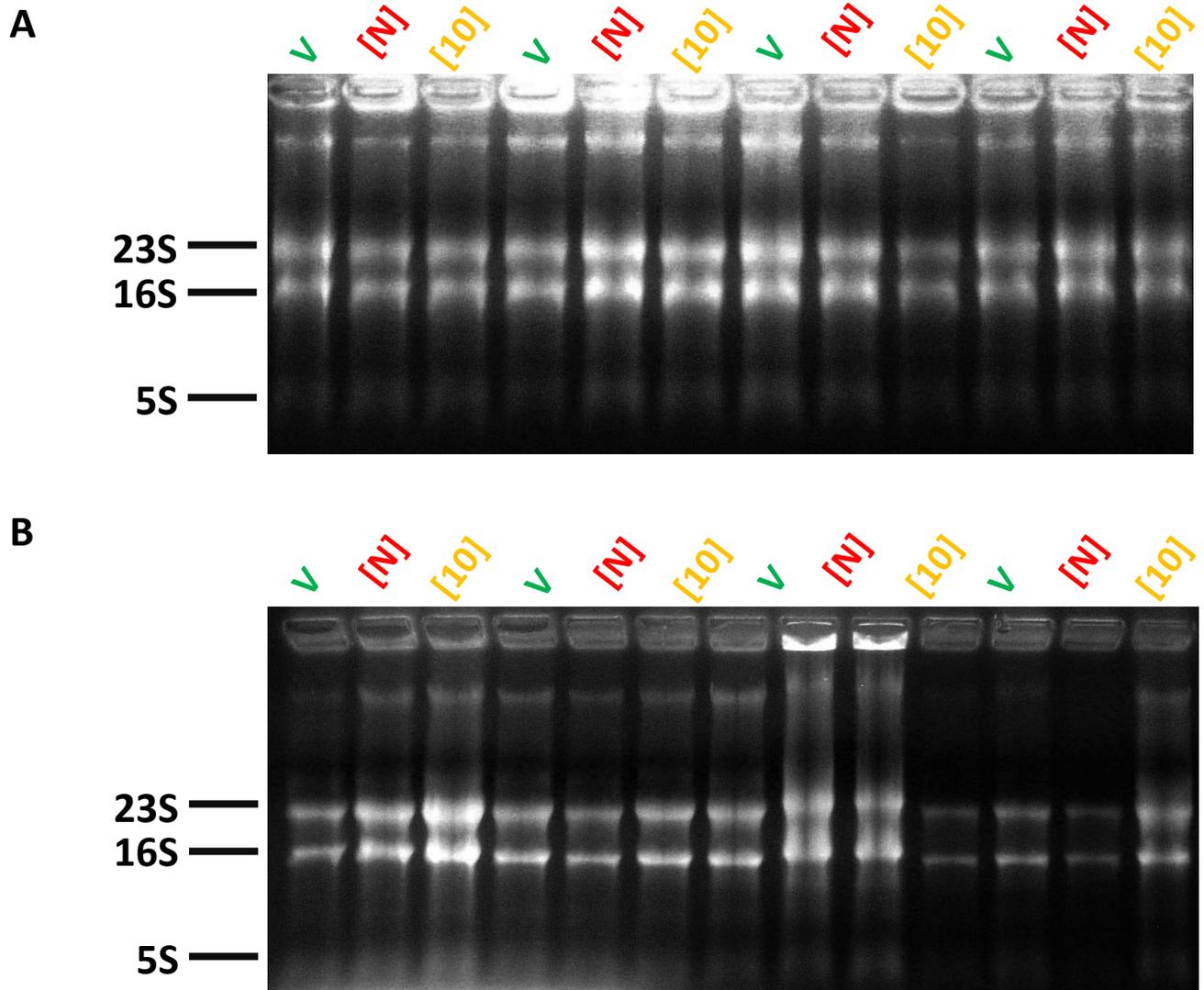
**Figura 16.** Gel desnaturante de RNA al 1 % de agarosa. RNA extraído por diferentes métodos: **A.** Carriles 1,2 y 3 RNA con la TRIZOL® Reagent; carriles 4 y 5 RNA con Fenol-Cloroformo. **B.** RNA con Pure Link RNA mini kit (Invitrogen).

Con estos resultados se eligió el procedimiento de extracción con Trizol para obtener el RNA que sería utilizado en las siguientes etapas experimentales.

#### **7.4. Concentración hormonal de 17 $\beta$ -estradiol y Testosterona y el tiempo de incubación óptimos para el estudio de la expresión diferencial**

##### **7.4.1 Condiciones de cultivo, extracción y cuantificación de RNA.**

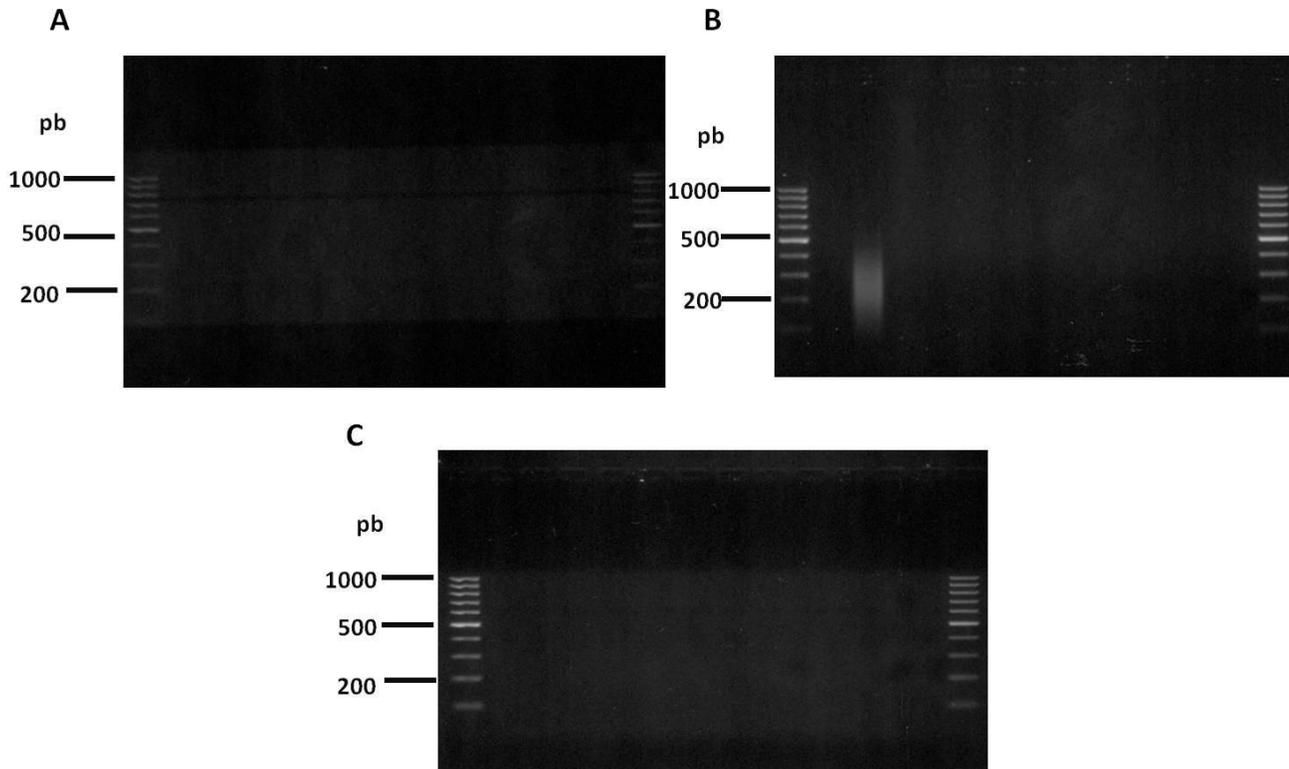
De acuerdo a la metodología propuesta, *N. brasiliensis* fue cultivada en presencia de  $E_2$  y T a dos concentraciones (CSHN y 10x CSHN) hormonales y tres tiempos diferentes (2, 8 y 24 horas), incluyendo cultivos en presencia de vehículo hormonal (control). De todas las condiciones se obtuvo el RNA en buena cantidad y calidad. En la **Figura 17** se muestra un gel desnaturante donde se observan algunos de los RNAs obtenidos a partir de *N. brasiliensis* bajo estimulación hormonal y donde se aprecian las tres subunidades del RNA ribosomal: 23S, 16S y 5S.



**Figura 17.** Gel desnaturalizante de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. RNAs de *N. brasiliensis* bajo el estímulo de E<sub>2</sub> (A) y Testosterona (B). V: RNA de *N. brasiliensis* tratada únicamente con el vehículo hormonal. [N]: RNA de *N. brasiliensis* tratado con la CSHN. [10]: RNA de *N. brasiliensis* tratado con una concentración 10 veces mayor a la CSHN.

### 7.5. Validación de la Técnica de RAP-RT-PCR.

Los RNAs de *N. brasiliensis* fueron tratados con DNAsa y con ellos se realizaron ensayos de PCRs para descartar la presencia de DNA contaminante. Los resultados mostraron productos de amplificación. En la **Figura 17** se muestra un gel representativo de todos los RNAs obtenidos.



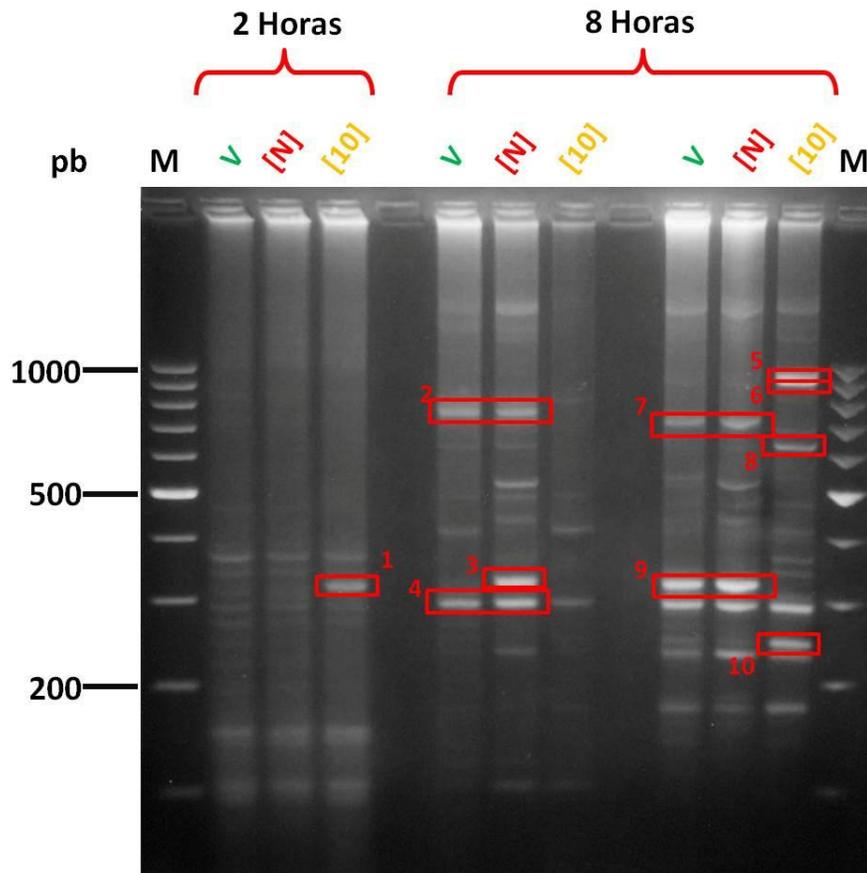
**Figura 18.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio en el cual fueron corridos los productos de PCRs hechos a partir de RNA tratado con DNAasa (sin pasar por RT). Condiciones de crecimiento de *N. brasiliensis* indicadas en la **Figura 6**. **A:** matraces 1, 2 y 3. **B.** Matraces 4, 5 y 6; **C.** Matraces 7, 8 y 9.

### 7.6. RAP-RT-PCR

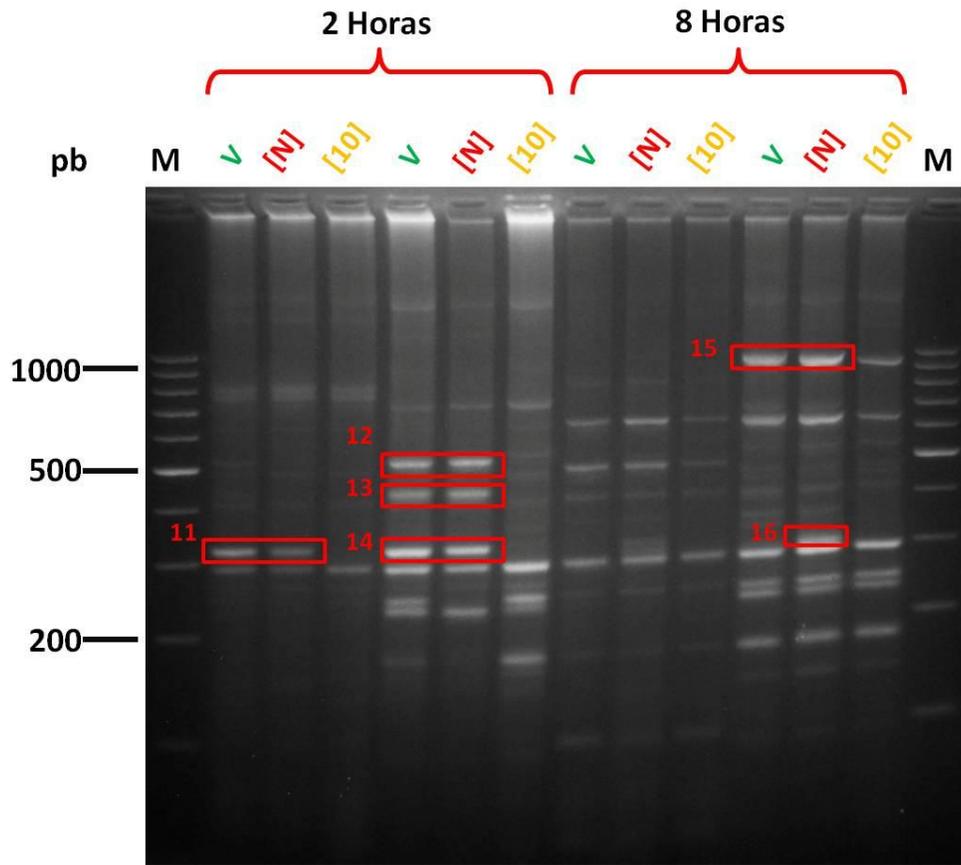
Se utilizaron las 5 combinaciones de primers planteadas previamente: sin embargo se eligieron solamente aquellas que mostraron un mejor perfil de bandeo. A continuación se muestran las figuras correspondientes a los productos de RAP-RT-PCR indicando con un cuadro rojo los fragmentos que fueron aislados y purificados (**Figuras 19, 20 y 21**).

El estímulo con estradiol indujo un mayor número de bandas diferenciales a las 2 horas de estimulación **Figura 19** y la testosterona indujo una mayor respuesta a las 8 y 24 horas de estimulación **Figura 20**. El estímulo con estradiol a las 24 horas no indujo un patrón de bandeo satisfactorio.

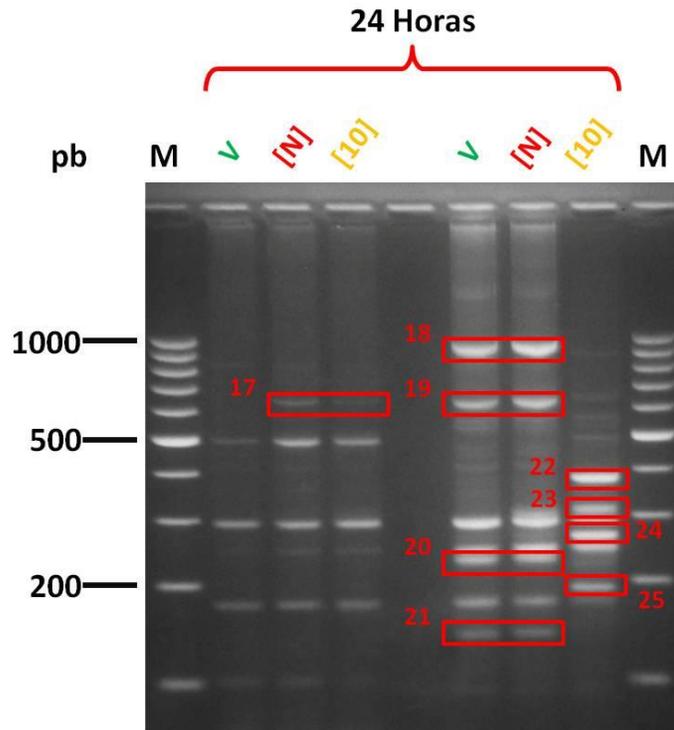
Con las dos concentraciones hormonales utilizadas y los tres tiempo de incubación para ambas hormonas se obtuvieron resultados satisfactorios.



**Figura 19.** Gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio. Expresión genética diferencial de *N. brasiliensis* bajo el estímulo de  $E_2$  a las 2 y 8 horas de incubación. **M:** Marcador de 100 pb. **V:** Tratamiento con vehículo hormonal. **[N]:** Tratamiento con 1 nM. **[10]:** Tratamiento con 10 nM



**Figura 20.** Gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio. Expresión genética diferencial de *N. brasiliensis* bajo el estímulo de T a las 2 y 8 horas de incubación. M: Marcador de 100 pb. V: Tratamiento con vehículo hormonal. [N]: Tratamiento con 1040.22 nM. [10]: Tratamiento con 10 402.2 nM



**Figura 21.** Gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio. Expresión genética diferencial de *N. brasiliensis* bajo el estímulo de T a las 24 horas de incubación. M: Marcador de 100 pb. V: Tratamiento con vehículo hormonal. [N]: Tratamiento con 1040.22 nM. [10]: Tratamiento con 10 402.2 nM

En total, 25 fragmentos mostraron una expresión diferencial de los cuales 12 incrementaron su expresión y 13 la inhibieron. De los 12 fragmentos sobre-expresados 6 correspondieron a estradiol y 6 a testosterona. De los 13 fragmentos sub-expresados, 4 correspondieron a estradiol y 9 a testosterona,

**Cuadro 7.**

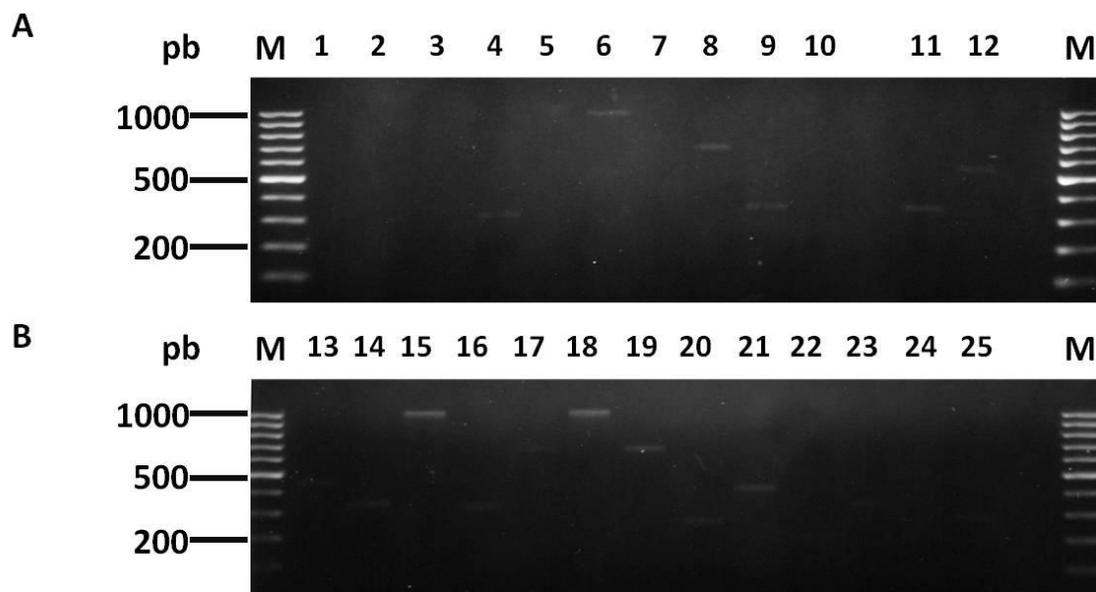
Hormona	Fragmento	Tamaño aproximado en pb	Tiempo de incubación y concentración hormonal	Primer utilizados	Expresión [concentración hormonal]
Estradiol	1	325	2 horas, 10x	Ea8 + Es5	↑ [10x]
	2	790	8 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea3 + Es5	↓ [10x]
	3	340	8 horas, Normal	Ea3 + Es5	↑ [N]
	4	300	8 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea3 + Es5	↓ [10x]
	5	910	8 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ [10x]
	6	905	8 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ [10x]
	7	700	8 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	8	620	8 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ [10x]
	9	320	8 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	10	250	8 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ [10x]
Testosterona	11	315	2 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea3 + Es5	↓ [10x]
	12	500	2 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	13	410	2 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	14	315	2 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	15	915	8 horas, Vehículo CONTROL	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	16	305	8 horas, Vehículo CONTROL	Ea4 + Es5	↑ [N]
	17	615	24 horas, Normal y 10x	Ea3 + Es5	↑ [N] y [10x]
	18	900	24 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	19	600	24 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	20	250	24 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	21	150	24 horas, Vehículo CONTROL y Normal	Ea4 + Es5	↓ [10x]
	22	390	2 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ [10x]
	23	310	2 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ 10x
	24	270	2 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ [10x]
	25	190	2 horas, 10x	Ea4 + Es5	↑ [10x]

**Cuadro 7.** Tamaño aproximado de los fragmentos diferencialmente expresados, condiciones de cultivo, primers utilizados y tipo de expresión observada. En rojo se muestran aquellos fragmentos en los que se logró una clonación positiva.

## 7.7. Selección y purificación de genes de *N. brasiliensis* que son modificados en su expresión ante la presencia de hormonas esteroides.

### 7.7.1 Purificación de fragmentos diferenciales

A partir de los geles mostrados en las figuras anteriores, se obtuvieron los fragmentos purificados para posteriormente ligarlos al vector plasmídico de clonación TOPO® TA Cloning® (with pCR® 2.1-TOPO®Vector).



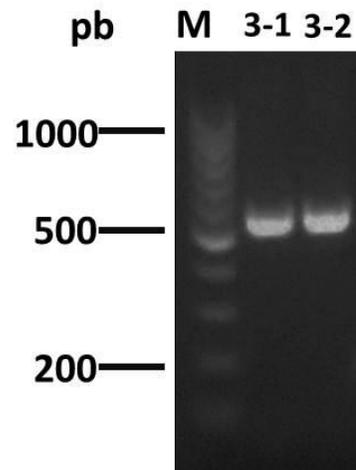
**Figura 22.** Purificación de fragmentos diferencialmente expresados a partir de un gel de agarosa al 3.5%. Los números en la parte superior del gel de agarosa corresponden a los fragmentos purificados a partir de las Figuras 33, 34 y 35.

### 7.7.2 Clonación de fragmentos diferenciales

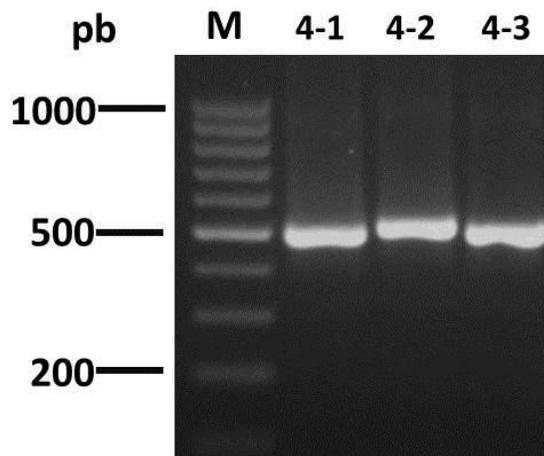
#### 7.7.2.1 Reacción de ligación, transformación de células competentes y selección de clonas positivas

Una vez realizada la reacción de ligación de los fragmentos mostrados en la **Figura 22** cada una de las reacciones de ligación fueron incubadas con las células competentes de *E. coli* TG1 para su transformación. Después de la incubación de las células transformadas con el vector plasmídico de clonación en medio sólido LB+ampicilina e impregnadas con X-gal, se seleccionaron aquellas colonias que presentaron una coloración blanca. Posteriormente se purificaron los plásmidos para cada uno de los fragmentos y a partir de este material se realizaron PCR's para comprobar la clonación utilizando los

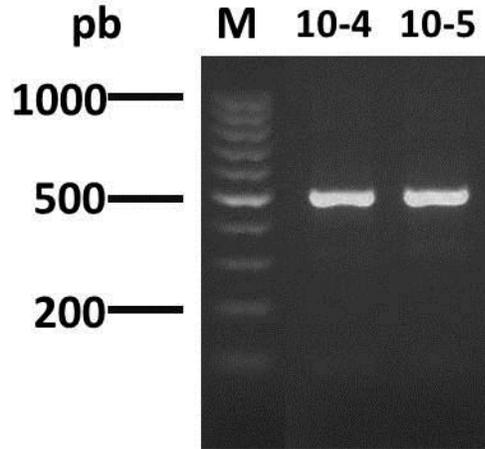
primers para el gen M13. En las **Figuras 23-27** se muestran ejemplos de geles en los que se obtuvo una clonación positiva. Cabe señalar que aunque a todos los fragmentos purificados se les realizó el procedimiento de clonación solo los fragmentos 3, 4 y 10 correspondientes al tratamiento con estradiol y los fragmentos 16, 17, 19, 20 y 23 correspondientes al tratamiento con testosterona fueron clonados exitosamente.



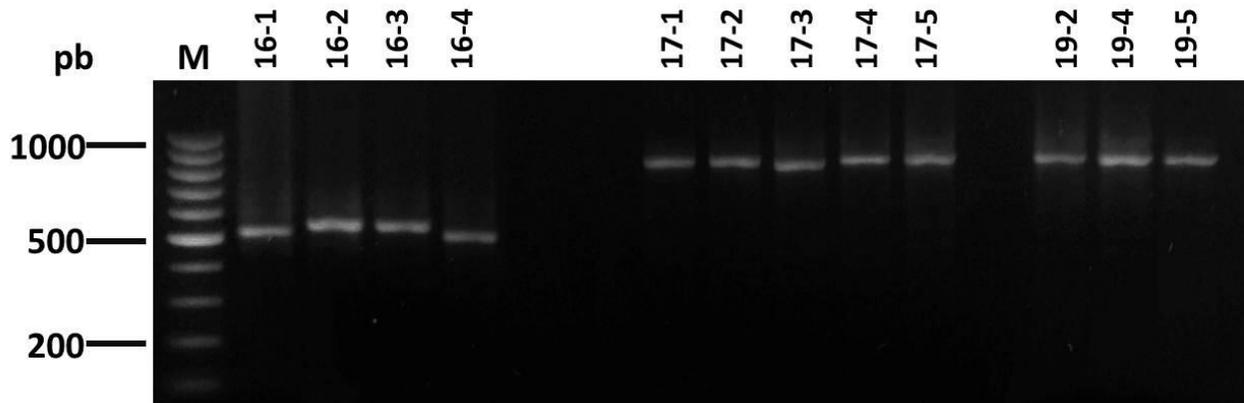
**Figura 23.** PCR a partir de plásmidos purificados para comprobar clonación del **fragmento 3** utilizando los primers M13 Forward y M13 Reverse. Pozos de 3-1 y 3-2 fragmentos clonados positivamente. Tamaño de amplificación del gen M13: 202 pb. Tamaño del fragmento 3: 340pb Tamaño esperado para comprobar la clonación: 542 pb.



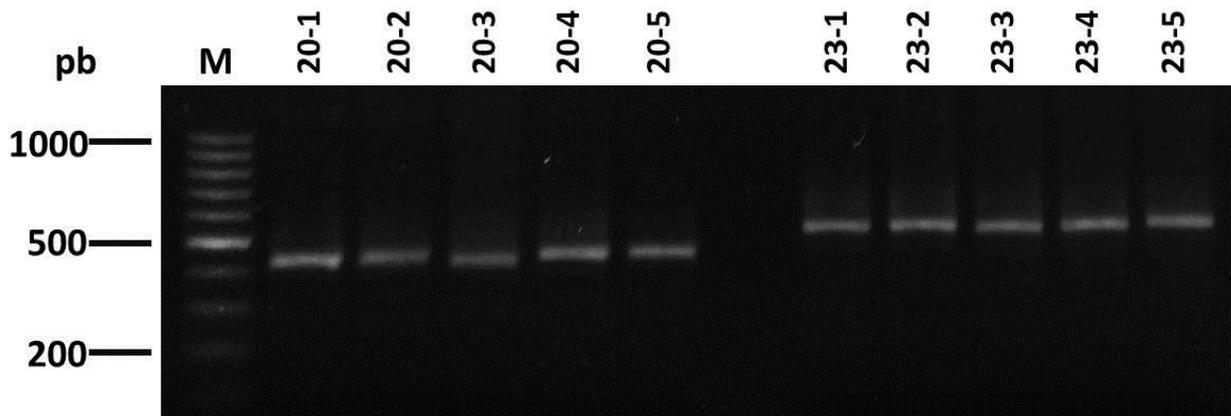
**Figura 24.** PCR a partir de plásmidos purificados para comprobar clonación del **fragmento 4** utilizando los primers M13 Forward y M13 Reverse. Pozos de 4-1, 4-2 y 4-3 fragmentos clonados positivamente. Tamaño de amplificación del gen M13: 202 pb. Tamaño del fragmento 4: 300pb Tamaño esperado para comprobar la clonación: 502 pb.



**Figura 25.** PCR a partir de plásmidos purificados para comprobar clonación del **fragmento 10** utilizando los primers M13 Forward y M13 Reverse. Pozos de 10-4 y 10-5 fragmentos clonados positivamente. Tamaño de amplificación del gen M13: 202 pb. Tamaño del fragmento 10: 250pb Tamaño esperado para comprobar la clonación: 452 pb.



**Figura 26.** PCR a partir de plásmidos purificados para comprobar clonación del **fragmento 16, 17 Y 19** utilizando los primers M13 Forward y M13 Reverse. **Fragmento 16.** Pozos de 16-1 a 16-4. Tamaño del fragmento **16**: 305 pb Tamaño esperado para comprobar la clonación: 507 pb. **Fragmento 17.** Pozos 17-1 a 17-5. Tamaño del fragmento **17**: 615 pb. Tamaño esperado para comprobar la clonación: 817 pb. **Fragmento 19.** Pozos 19-2, 19-4 y 19-5. Tamaño del fragmento **19**: 600 pb. Tamaño esperado para comprobar la clonación: 802 pb. Tamaño de amplificación del gen M13: 202 pb.



**Figura 27.** PCR a partir de plásmidos purificados para comprobar clonación del **fragmento 20 y 23** utilizando los primers M13 Forward y M13 Reverse. **Fragmento 20.** Pozos de 20-1 a 20-5. Tamaño del fragmento **20**: 250 pb Tamaño esperado para comprobar la clonación: 452 pb. **Fragmento 23.** Pozos 23-1 a 23-5. Tamaño del fragmento **23**: 310 pb. Tamaño esperado para comprobar la clonación: 512 pb. Tamaño de amplificación del gen M13: 202 pb.

### 7.7.3 Análisis de las secuencias de los fragmentos diferencialmente expresados

Las secuencias obtenidas fueron editadas con ayuda del programa DNA Sequence Analysis Software - Sequencher 5.1. Posteriormente se realizaron búsquedas por alineamiento en la base de datos Gen Bank utilizando el programa BLAST (blastx). El resultado de los alineamientos correspondientes a los fragmentos obtenidos por estimulación con estradiol y testosterona son mostrados en el **Cuadro 8** y **Cuadro 9** respectivamente.

En el **Cuadro 10** se muestran algunas características generales y la posible función de las proteínas correspondientes a los fragmentos de genes diferencialmente expresados bajo el estímulo con estradiol y testosterona. De los 25 fragmentos detectados con modificación en su expresión, 10 fragmentos de *N. brasiliensis* que presentaron una expresión diferencial bajo el estímulo hormonal fueron exitosamente clonados. Posterior al alineamiento, se encontró que estos fragmentos tienen una alta homología con diversas proteínas. De estas proteínas, cuatro correspondieron a proteínas hipotéticas; a partir de su secuencia se realizó una alineación con el programa Keeg (Clustalw) para conocer su similitud con otras proteínas. Los resultados mostraron similitud con proteínas hipotéticas de especies filogenéticamente relacionadas. En el caso de la proteína hipotética O3I\_005060 de *N. brasiliensis*, se encontró una similitud con una proteína de membrana de *Rhodococcus equi*. La proteína hipotética O3I\_020245 de *N. brasiliensis*, mostró ser similar a una chaperona DnaJ de *Coralloccoccus coralloides* y a una proteína de la banda 7 de *Paracoccus denitrificans*. Finalmente, la proteína hipotética O3I\_03054 de *N. brasiliensis*,

presentó similitud con una proteína de unión a ácidos nucleicos implicada en la terminación de la transcripción de *Mycobacterium gilvum*. **Cuadro 10.**

Expresión [hormonal]	Fragmento	Alineamiento	Max Score	Total Score	Query cover	E-Value	Max Ident	Dominios conservados
↑ [N]	3-1	<b>Proteína hipotética O3I_005060 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	113	113	28%	9E-27	95%	No detectados
		PBR [ <i>Burkholderia cenocepacia</i> ]	93.2	93.2	24%	2E-21	98%	
	3-2	Proteína hipotética O3I_005060 [N. brasiliensis ATCC 700358]	112	112	30%	8E-26	96%	No detectados
		PBR [ <i>B. cenocepacia</i> ]	95.5	95.5	18%	1E-21	100%	
↓ [10x]	4-1	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	152	152	44%	5.00E-43	96%	PHA03307 Regulador transcripcional, provisional
		Proteína hipotética nfa36660 [N. farcinica]	125	125	44%	1.00E-32	78%	
		PBR [ <i>B. cenocepacia</i> ]	96.3	96.3	28%	1.00E-22	96%	
	4-1	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	133	133	96%	2.00E-37	97%	No detectados
		Proteína hipotética NOCYR_3556 [N. cyriacigeorgica GUH-2]	111	111	96%	1.00E-28	78%	
	4-2	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	157	157	54%	1.00E-45	99%	No detectados
		Proteína hipotética nfa36660 [N. farcinica IFM 10152]	125	125	52%	4.00E-33	79%	
		PBR [ <i>B. cenocepacia</i> ]	45.8	73.2	25%	2.00E-05	100%	
	4-3	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	150	150	39%	4.00E-42	95%	No detectados
		Proteína hipotética nfa36660 [N. farcinica IFM 10152]	119	119	38%	5.00E-30	75%	
		PBR [ <i>Burkholderia cenocepacia</i> ]	95.9	95.9	25%	3.00E-22	96%	
	4-3	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	155	155	29%	5.00E-43	98%	PHA03307 Regulador transcripcional, provisional
		Proteína hipotética nfa36660 [N. farcinica IFM 10152]	123	123	28%	7.00E-31	78%	
		PBR [ <i>Burkholderia cenocepacia</i> ]	92	92	18%	2.00E-20	92%	
4-3	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	154	154	37%	1.00E-43	98%	No detectados	
↑ [10x]	10-4 F	<b>Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa [N. farcinica IFM 10152]</b>	98.2	154	37%	2.00E-29	100%	Thiamine pyrophosphate (TPP) family
		Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa [N. brasiliensis ATCC 700358]	98.2	154	37%	2.00E-29	100%	
		Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa de unión a tiamina [N. cyriacigeorgica GUH-2]	98.2	154	37%	2.00E-29	100%	
	10-4 R	<b>Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	43.5	43.5	30%	0.002	100%	No detectados
		Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa [N. farcinica IFM 10152]	43.1	43.1	30%	0.003	100%	
		Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa de unión a tiamina [N. cyriacigeorgica GUH-2]	43.1	43.1	30%	0.004	100%	
	10-5	<b>PBR [B. cenocepacia]</b>	96.7	96.7	22%	2.00E-22	100%	No detectados
		Proteína hipotética O3I_030545 [N. brasiliensis ATCC 700358]	86.3	86.3	22%	3.00E-18	88%	
	10-6	<b>Proteína hipotética O3I_020245 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	51.6	80.5	31%	9.00E-08	100%	No detectados

Cuadro 8. Alineamiento de secuencias, resultado de la estimulación con estradiol

Expresión [hormonal]	Fragmento	Alineamiento	Max Score	Total Score	Query cover	E-Value	Max Ident	Dominios conservados
↑ [N]	16-2	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	159	159	70%	9.00E-47	98%	PHA03307 Regulador transcripcional, provisional
		Proteína hipotética nfa36660 [N. farcinica IFM 10152]	127	127	72%	3.00E-34	74%	
	16-3	<b>Proteína hipotética O3I_005060 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	110	110	36%	2.00E-25	95%	No detectados
		PBR [B. cenocepacia]	72.4	72.4	20%	1.00E-13	82%	
	16-4	<b>Proteína hipotética O3I_028560 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	154	154	61%	9.00E-45	95%	No detectados
Proteína hipotética nfa36660 [N. farcinica IFM 10152]		127	127	58%	3.00E-34	79%		
↑ [N] y [10x]	17-1	<b>rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	343	343	74%	1.00E-115	83%	Superfamilia Ado Met_Mtases
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [Streptosporangium roseum DSM 43021]	179	179	69%	6.00E-51	49%	
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [Thermobispora bispora DSM 43833]	161	161	74%	2.00E-44	45%	
	17-2	<b>rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	346	346	70%	8.00E-117	84%	Superfamilia Ado Met_Mtases
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [S. roseum DSM 43021]	178	178	66%	1.00E-50	49%	
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [T. bispora DSM 43833]	165	165	70%	2.00E-45	46%	
	17-3	<b>rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	262	262	87%	2.00E-85	82%	Superfamilia Ado Met_Mtases
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [S. roseum DSM 43021]	124	124	79%	2.00E-31	46%	
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [T. bispora DSM 43833]	123	123	79%	3.00E-31	45%	
↓ [10x]	19-4	<b>rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	311	311	73%	1.00E-103	83%	Superfamilia Ado Met_Mtases
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [S. roseum DSM 43021]	174	174	62%	2.00E-49	55%	
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [T. bispora DSM 43833]	159	159	73%	1.00E-43	47%	
	19-5	<b>rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	231	231	85%	1.00E-73	85%	Superfamilia Ado Met_Mtases
		rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [S. roseum DSM 43021]	152	152	87%	3.00E-42	55%	
rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa [T. bispora DSM 43833]	134	134	92%	2.00E-35	50%			
↓ [10x]	20-1	<b>Hidrolasa asociada a pared celular [Streptomyces sp. e14]</b>	144	144	38%	3.00E-40	91%	No detectados
		Hidrolasa asociada a pared celular [S. lividans TK24]	143	143	38%	4.00E-40	91%	
	20-3	<b>Anhidrasa carbónica [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	108	108	33%	3.00E-26	100%	No detectados
		Proteína hipotética nfa4300 [N. farcinica IFM 10152]	92.8	92.8	32%	2.00E-20	83%	
	20-4	<b>Proteína hipotética O3I_030545 [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	87.4	87.4	43%	5.00E-20	98%	No detectados
↑ [10x]	23-1	<b>Carboxilesterasa [N. brasiliensis ATCC 700358]</b>	167	167	45%	7.00E-46	86%	Colesterasa
	23-2	Carboxilesterasa [N. brasiliensis ATCC 700358]	187	187	43%	3.00E-52	82%	

Cuadro 9. Alineamiento de secuencias, resultado de la estimulación con **testosterona**

Proteína	Ruta metabólica	Posición en el genoma nt	Total de aa	Similitud con otras proteínas (Clustalw) Secuencias ortólogas	Posible función
Anhidrasa carbónica [ <i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358]	Metabolismo del nitrógeno	555945..556568	207	Proteína hipotética de <i>N. farcinica</i> y Anhidrasa carbónica de las especies: <i>N. farcinica</i> , <i>N. cyriacigeorgica</i> , <i>Rhodococcus josti</i> , <i>R. opacus</i> , <i>R. equi</i> , <i>R. erythropolis</i> , <i>Amycolicococcus subflavus</i> , <i>Gordonia sp.</i>	Cataliza la conversión de CO <sub>2</sub> a bicarbonato y protones.
Carboxilesterasa [ <i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358]	Metabolismo de Xenobióticos	2542617..2544035	472	Carboxilesterasa de las especies: <i>Thermobifida fusca</i> , <i>Blastococcus saxobsidens</i> , <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> , <i>S. griseus</i> , <i>Streptosporangium roseum</i> .	Hidroliza una amplia variedad de ésteres de ácidos carboxílicos.
Hidrolasa asociada a pared celular [ <i>Streptomyces</i> sp. e14]	Metabolismo de lípidos	2157674..2158042	122	Hidrolasa de <i>Streptomyces lividans</i> , proteína hipotética de <i>S. ghanaensis</i> , proteína hipotética de <i>Caenorabditis remanei</i> , hidrolasa de <i>Rothia dentocariosa</i> .	División y crecimiento celular. Formación de nuevas células. Factor de virulencia en diversos organismos.
PBR [ <i>B. cenocepacia</i> ]	Biosíntesis de Fenazina	818..1060	80	Péptido alfa-LacOPZ de pUCP9 vector de clonación, Regulador transcripcional dependiente de sigma-54 de <i>B. cenocepacia</i> MCO-3, Regulador transcripcional dependiente de sigma-54 de <i>B. cenocepacia</i> HI2424, Regulador transcripcional dependiente de sigma-54 de <i>B. cenocepacia</i> AU1054, Regulador transcripcional dependiente de sigma-54 de <i>B. cenocepacia</i> J2315, Regulador transcripcional de la familia Fis de <i>Burkholderia sp.</i>	Regulador de la transcripción de la fenazina, involucrado en la transcripción de genes implicados en la virulencia, formación de biofilms, respuesta al estrés osmótico, intermediarios centrales del metabolismo y la biosíntesis de aminoácidos.
Proteína hipotética O3I_005060 [ <i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358]	Desconocida	1185804..1186868	354	Proteínas hipotéticas de: <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> , <i>N. farcinica</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> , <i>R. jostii</i> RHA1. Proteína de membrana de <i>R. equi</i> .	Desconocida
Proteína hipotética O3I_020245 [ <i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358]	Desconocida	4537367..4582978	15203	Proteínas hipotéticas de: <i>Streptomyces</i> sp. SirexAA-E, <i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1, <i>Nocardiosis dasonvillei</i> , <i>Myxococcus stipitatus</i> , <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> .	Desconocida
Proteína hipotética O3I_028560	Desconocida	6503521..6504069	182	Proteínas hipotéticas de <i>Nocardia</i>	Desconocida

[ <i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358]				<i>farcinica</i> , <i>N. cyriacigeorgica</i> y <i>Arthrobacter arilaitensis</i> , chaperona DnaJ de <i>Corallocooccus coralloides</i> , proteína de la banda 7 de <i>Paracoccus denitrificans</i> .	
Proteína hipotética O3I_030545 [ <i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358]	Desconocida	6933884..6934243	119	Proteínas hipotéticas de <i>Nocardia farcinica</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> , <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> , proteína de unión a ácidos nucleicos implicada en la terminación de la transcripción de <i>Mycobacterium gilvum</i> Spyr1.	Desconocida
rRNA (adenina-N(6)-)-metiltransferasa [ <i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358]	Desconocida	6558643..6559344	233	rRNA (adenina-N(6)-)-metiltransferasa de <i>Streptosporangium roseum</i> , <i>Nocardioopsis alba</i> , <i>Thermobispora bispora</i> , <i>N. dassonvillei</i> y <i>T. curvata</i> .	Catalizan la transferencia de un grupo metilo del cofactor S-adenosil L-metionina (SAM) al nucleótido blanco. Regulación post-transcripcional y resistencia aminoglucósidos.
Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa [ <i>N. farcinica</i> IFM 10152]	Glucolisis, gluconeogénesis, ciclo Krebs.	2467328..2470105	925	Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa de <i>N. farcinica</i> , <i>N. cyriacigeorgica</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 y <i>R. erythropolis</i> .	Cataliza la descarboxilación del piruvato y su unión a la lipoamida de la subunidad E2.

**Cuadro 10.** Características de las proteínas que mostraron similitud con los fragmentos diferencialmente expresados bajo estímulo hormonal

## VIII) DISCUSIÓN

Las hormonas esteroides juegan un papel importante en el establecimiento y/o desarrollo de diversas enfermedades infecciosas <sup>(Klein. 2000)</sup>. Estas moléculas participan en la regulación de la respuesta inmune del hospedero, propiciando o inhibiendo la invasión de un gran número de agentes infecciosos <sup>(Bouman. 2005)</sup>. Existe una amplia variedad de reportes en los que se hace referencia a la susceptibilidad a algunas patologías infecciosas relacionada con el estatus genérico, dando como resultado que principalmente los hombres presenten una mayor incidencia en comparación con las mujeres <sup>(Klein. 2000; McClelland. 2011)</sup>. Al igual que una gran cantidad de patologías infecciosas, el micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*, se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres (3:1) <sup>(López. 2006)</sup>. Sin embargo, los trabajos que muestran evidencias moleculares sobre el posible mecanismo de interacción entre el hospedero y el agente infeccioso son escasos.

En la búsqueda de receptores hormonales citosólicos bacterianos que nos ayuden a comprender este mecanismo, solo un trabajo ha sido publicado hasta la fecha. Kurth y colaboradores demostraron la existencia de un receptor citosólico en la bacteria *Streptomyces hydrogenans* con una alta afinidad a la 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona. Éste contiene sitios competitivos tanto para progesterona como para la dihidrotestosterona <sup>(Kurth. 1975)</sup>. Aunque en la actualidad no existan trabajos con receptores hormonales en *N. brasiliensis*, se sugiere su existencia.

En un estudio previo a este trabajo se demostró que las hormonas esteroides modifican el curso clínico del micetoma experimental, así como el crecimiento *in vitro* de *N. brasiliensis* <sup>(Hernández-Hernández. 1995)</sup>. En el presente trabajo mediante la técnica RAP-RT PCR se demostró que el estradiol y la testosterona modifican la expresión genética de *N. brasiliensis*, siendo la combinación de primers Ea4+Ea5 la más útil para detectar dichos cambios. El mayor cambio en la expresión génica se observó a las 2 y 8 horas de estimulación con ambas hormonas; a las 24 horas el cambio se observó solamente con testosterona. Estos cambios podrían indicar que *N. brasiliensis* tiene una respuesta transcripcional más rápida ante 17  $\beta$ -estradiol que ante la testosterona. A pesar de que en el humano la vida media del estradiol es menor que la de la testosterona (aproximadamente 5 minutos y de 10 a 100 minutos), difícilmente se podría atribuir a este hecho la diferencia temporal de expresión entre estas dos hormonas, ya que el microambiente en el humano es muy diferente al microambiente experimental.

Recientemente el genoma completo de *N. brasiliensis* ATCC 700358 fue secuenciado. Este consta de un cromosoma circular que contiene 9 489 024 pb, 8 414 genes que codifican para proteínas y 57 genes que codifican para RNA. El 68% del contenido del genoma son regiones ricas en G+C y contiene tres copias de los genes del rRNA ribosomal 5S, 16S y 23S. Presenta una gran homología con el genoma de *N. farcinica* y *M. tuberculosis*. Hasta la fecha, se han identificado genes implicados en diferentes funciones; sin embargo la mayoría de los genes codifican para proteínas hipotéticas <sup>(Vera-Cabrera. 2012)</sup>.

De acuerdo a los datos obtenidos por el alineamiento de secuencias de proteínas, se propone que los fragmentos clonados correspondientes a proteínas hipotéticas, corresponden a moléculas participantes en la fisiopatogenia de la infección o en la transcripción de moléculas específicas. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para corroborar la existencia y función de dichas proteínas hipotéticas. Los 6 fragmentos restantes que presentaron una expresión diferencial bajo la estimulación con hormonas esteroides presentaron una alta similitud con proteínas de las que se conoce su función. A continuación se hace una breve descripción de cada una de estas proteínas, así como de su posible implicación en la virulencia de *N. brasiliensis*.

#### **rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa de *Nocardia brasiliensis* ATCC 700358**

La modificación post transcripcional es un proceso ampliamente estudiado en diversos organismos. La maquinaria celular de cualquier organismo necesita de este tipo de regulación para sobrevivir. En procariontes, la modificación transcripcional más común es la metilación de bases realizada por una familia de enzimas conocidas como metiltransferasas <sup>(Abad-Zapatero. 1999)</sup>.

Las metiltransferasas catalizan la transferencia de un grupo metilo del cofactor S-adenosil L-metionina (SAM) al nucleótido blanco de una manera muy específica <sup>(Chow. 2007)</sup>. Estudios recientes han demostrado que la metilación en sitios específicos del ribosoma es un mecanismo que confiere resistencia a los antibióticos de la familia de los aminoglucósidos, con excepción de la estreptomina <sup>(Liou. 2006; Doi. 2007; Wachino. 2010; Wachino. 2012)</sup>. Actualmente se conocen siete metiltransferasas producidas por diversos microorganismos: RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RpmA y ArmA <sup>(Wachino. 2010)</sup>. El proceso de metilación ha sido mejor estudiado en las bacterias Gram negativas. En un estudio realizado por Liou y colaboradores, se demostró que ArmA metila el nucleótido G1405 en la posición N7 en el rRNA ribosomal 16S, inhibiendo la unión del antibiótico al ribosoma; este proceso favorece la resistencia bacteriana a antibióticos aminoglucósidos <sup>(Liou. 2006)</sup>.

Los actinomicetos son productores de aminoglucósidos, sustancias que tienen un efecto antibiótico particularmente contra bacterias gram negativas. Aunque no se han descrito metiltransferasas en todos los actinomicetos, se sugiere que éstos son intrínsecamente resistentes a los aminoglucósidos que ellos mismos producen. Es posible que un gran número de actinomicetos produzcan metiltransferasa. En algunas especies de *Streptomyces* y *Micromonospora* se ha descrito que la resistencia está asociada a la metilación específica de nucleótidos dentro de sitio A del rRNA 16S lo cual dificulta la unión de los aminoglucósidos a las subunidades ribosomales 30S, actuando como un mecanismo de auto protección (Doi. 2007).

En este trabajo se puso evidencia la inhibición de la expresión de un fragmento con alta similitud a metiltransferasas en presencia de una alta concentración de testosterona. Esto implicaría que esta hormona potencialmente podría eliminar la “auto-protección” de *N. brasiliensis* a la acción de los aminoglucósidos.

En el fragmento 17 (24 horas de estimulación con testosterona, primers Ea3 + Es5) se expresó esta enzima en condiciones de concentración normal y 10 veces la concentración normal, no así en el condición sin hormona. Por otro lado, en el fragmento 19 (24 horas de estimulación con testosterona, primers Ea4 + Es5) se aprecia una expresión de esta enzima sin hormona y en la concentración normal; sin embargo, en presencia de una alta concentración de testosterona, es notable una marcada inhibición. La expresión del fragmento 17 es muy tenue comparada con la expresión del fragmento 19; la diferencia experimental entre ambos fragmentos, fueron los primers utilizados, lo cual valida la expresión de este último fragmento y justifica el haber utilizado diversos juegos de primers.

### **Anhidrasa carbónica**

La anhidrasa carbónica es una metaloenzima que lleva a cabo la conversión de CO<sub>2</sub> a bicarbonato y protones (Supuran. 2008). En las bacterias y otros organismos, esta enzima está involucrada en muchos procesos fisiológicos como la fotosíntesis, respiración, transporte de CO<sub>2</sub> y el metabolismo de xenobióticos. Existen cinco familias de metaloenzimas que utilizan zinc, cadmio y fierro dentro de su centro activo (Del Prete. 2012). Se ha demostrado que este tipo de enzimas es esencial para el ciclo de vida de varias bacterias como *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus* spp., *Helicobacter pylori*, *Salmonella entérica* y *Sulfurihydrogenibium* spp, por lo que han sido motivo de búsqueda de nuevos antibióticos (Supuran. 2008; Supuran. 2011).

En muchos organismos se ha demostrado que la producción de bicarbonato está ligada a su virulencia <sup>(Del Prete. 2012)</sup>. En un estudio realizado por Supuran con *Vibrio cholerae*, se demostró que la etoxzolamida (una sulfonamida) inhibe la anhidrasa carbónica de mamíferos y bacterias. En *Vibrio cholerae* la etoxzolamida inhibe una o varias anhidrasas carbónicas que juegan un papel fundamental en la transformación de CO<sub>2</sub> en bicarbonato, reduciendo su virulencia <sup>(Supuran. 2011)</sup>.

El fragmento 20 correspondió a la secuencia de una anhidrasa carbónica en el genoma de *N. brasiliensis*. Su expresión fue evidente solo con el juego de primers Ea4 + Es5. Se expresa en ausencia de estímulo hormonal y a la concentración hormonal normal; en presencia de un exceso de la misma la expresión de esta enzima desaparece. La interpretación a esta observación es que *N. brasiliensis* en condiciones normales produce esta enzima y solo tendría algún significado en el humano cuando se produjeran cantidades excesivas de testosterona.

### **Hidrolasa asociada a pared celular**

Las hidrolasas de pared celular han sido conocidas como enzimas de vital importancia para la separación celular y la formación de una nueva célula. Existe un amplio repertorio de estas moléculas que cumplen funciones específicas de acuerdo a las necesidades de los organismos <sup>(Wyckoff. 2012)</sup>. En la actualidad se han descubierto nuevas hidrolasas de pared celular que actúan de forma autónoma o en las células vecinas para modular la invasión a las células del hospedero, la forma celular, la detección inmune innata, la comunicación intercelular y la lisis contra sus competidores. Más allá del papel de estas moléculas en la división y crecimiento celular, se han abierto nuevos campos de estudio en donde las hidrolasas juegan un papel importante en distintos comportamientos como la depredación, la movilidad, la evasión inmunológica, la estructura de la comunidad bacteriana y la latencia <sup>(Wyckoff. 2012)</sup>.

Algunos ejemplos de las nuevas funciones que llevan a cabo las hidrolasas de pared celular se mencionan a continuación:

Se ha observado que *Bdellovibrio bacteriovorus* expresa amidasas requeridas para modificar la forma de las células del hospedero y facilitar la entrada a ellas <sup>(Lerner. 2012)</sup>. Las amidasas producidas por *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* modulan la forma de las células del hospedero y promueven la colonización a través de la activación del sistema inmune <sup>(Bonis. 2010; Frirdich. 2012)</sup>.

*Mycobacterium tuberculosis* requiere una combinación de hidrolasas para “resucitar” de su estado de latencia. Esta bacteria utiliza múltiples clases de hidrolasas simultáneamente para romper las uniones del

peptidoglucano. Además, la liberación de estos fragmentos de pared celular se cree son un mecanismo de señalización en la interacción con el sistema inmune del hospedero <sup>(Hett. 2008)</sup>.

Las enzimas lipolíticas son uno de los factores de virulencia conocidos en muchas bacterias como *Pseudomonas cepacia*, *Staphylococcus aureus* <sup>(Lonon. 1988; Rollof. 1988)</sup>, y en algunas especies de hongos como *Alternaria brassicicola*, *Candida albicans*, y *Fusarium graminearum* <sup>(Tsuboi. 1996; Berto. 1999; Voigt. 2005)</sup>. Muchas especies de bacterias producen lipasas que pueden contribuir a la invasión y proliferación, causando la destrucción del tejido del hospedero <sup>(Singh. 2010)</sup>.

Las lipasas de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* pueden estar involucrados en la colonización y persistencia de bacterias en la piel humana <sup>(Gribbon. 1993; Farrell. 1993)</sup>. Las lipasas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* son producidas durante el proceso de infección bacteriana. *In vitro*, estas enzimas han sido asociadas a la disfunción de diferentes tipos de células de la respuesta inmune como macrófagos o plaquetas <sup>(Jaeger. 1994)</sup>. *Burkholderia cepacia* segrega una lipasa que aumenta la invasión en las células epiteliales sin afectar a su propia membrana plasmática <sup>(Mullen. 2007)</sup>. Las fosfolipasas de las bacterias, hongos y parásitos actúan como factores de virulencia mediante la modificación de los lípidos de la célula huésped <sup>(Ghannoum 2000; Heffernan. 2006; Mummy. 2008.)</sup>.

La carboxilesterasa es una enzima que hidroliza los enlaces éster de sustratos con longitud de cadena intermedia. En un estudio realizado por Lun y Bishai con *M. tuberculosis* se caracterizó el gen MT2282 que codifica para una carboxilesterasa de la pared celular asociada a la virulencia. Para evaluar el papel de este gen en la patogenia, fue eliminado del genoma de *M. tuberculosis*. Las mutantes fueron inoculadas en ratones BALB/c, los cuales mostraron una reducción en las unidades formadoras de colonias en pulmones y bazo y menor daño pulmonar <sup>(Lun. 2007)</sup>.

En el presente estudio, se observó la expresión de un fragmento de *N. brasiliensis* (fragmento 20) a las 24 horas de estímulo con la concentración normal de testosterona, así como en ausencia de hormona. A alta concentración de testosterona la expresión de este fragmento fue inhibida. El análisis de este fragmento mostró una alta similitud con proteínas hipotéticas de *N. farcinica* y *N. brasiliensis*, además de una similitud con proteínas con función conocida. La secuencia de este fragmento mostró similitud con hidrolasas asociadas a pared celular de *Streptomyces* sp. y de *S. lividans*. El hecho de que este fragmento con similitud con una hidrolasa se exprese tras la exposición a una concentración normal de testosterona así como en el control sin hormona sugiere que puede tratarse de una hidrolasa implicada en el crecimiento celular. Si está hipótesis es cierta, se esperaría que la inhibición de la

expresión de esta proteína a altas concentraciones de testosterona afectaría significativamente el crecimiento y/o división de las células de *N. brasiliensis*, como reportó Hernández-Hernandez (1995) en estudios *in vitro* <sup>(Hernández-Hernandez. 1995)</sup>.

En este estudio se observó que la testosterona a altas concentraciones estimula la expresión del fragmento 23 correspondiente a la proteína carboxilesterasa de *N. brasiliensis*. Como se mencionó anteriormente, la carboxilesterasa se encuentra directamente relacionada con la virulencia de *M. tuberculosis* <sup>(Lun, 2007)</sup>. Dado lo anterior posiblemente esta enzima juega un papel importante en la virulencia de *N. brasiliensis* ante altas concentraciones de testosterona.

### **PBR (Phenazine biosynthesis regulator)**

En *Burkholderia cenocepacia*, el gen PBR (regulador de la biosíntesis de fenazina) codifica para una proteína de 80 aminoácidos, que contiene un motivo hélice-alfa-hélice característico de los reguladores transcripcionales en procariontes <sup>(Ramos. 2010)</sup>. Se encuentra localizado en el segmento de 3526 pb de su cromosoma río abajo de dos genes que codifican para las proteínas homólogas a la PhzD y PhzF de *Pseudomonas chlororaphis* <sup>(Ramos. 2010)</sup>. Estas proteínas están implicadas en la biosíntesis de la fenazina, las cuales son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno y tienen una actividad antibiótica de amplio espectro <sup>(Mavrodi. 2006)</sup>. Debido a su actividad redox y la capacidad de difundir a través de la membrana, el mecanismo de acción de la fenazina está implicado en la interrupción de la respiración celular al interferir en el proceso normal de transporte de electrones <sup>(Delaney. 2001)</sup>.

En el estudio realizado por Ramos y colaboradores se describieron las diversas funciones del gen PBR en donde utilizaron una cepa de *B. cenocepacia* K56-2, en la que el gen PBR fue modificado mediante una mutagénesis insercional con un transposón. Se demostró que el gen de PBR es requerido para la transcripción de *phzD* y *phzF* y por lo tanto para la biosíntesis de fenazina. Además, los resultados muestran que la cepa mutante es incapaz de crecer en medios mínimos, debido a que PBR está implicado en la regulación de la síntesis de aminoácidos aromáticos. Demostraron además que la cepa mutante presenta una baja virulencia en *Caenorhabditis elegans*. Una explicación es que la cepa mutante PBR es incapaz de producir fenazinas, las cuales pueden actuar como compuestos redox, disminuyendo las defensas del hospedero ante el estrés oxidativo <sup>(Ramos. 2010)</sup>.

Asimismo, Ramos y colaboradores demostraron que dicha cepa mutante de *B. cenocepacia* fue más susceptible que el fenotipo salvaje a los oxidantes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NaOCl, y un pH ácido o básico. También

demonstraron que esta proteína se une a la región promotora del operon *phzF-D*, regulando la transcripción de la fenazina <sup>(Ramos. 2010)</sup>.

La proteína PBR muestra una homología significativa a los 32 residuos de aminoácidos N-terminales de un factor transcripcional putativo  $\sigma$ -54 BCAL de una cepa de *B. cenocepacia*. La RNA polimerasa  $\sigma$ -54 transcribe genes cuyos productos tienen una amplia gama de funciones, incluyendo algunos con implicaciones médicas, sin embargo, este factor de transcripción no está caracterizado funcionalmente <sup>(Ramos. 2010)</sup>.

En este trabajo se realizó un alineamiento con la proteína PBR resultante de la estimulación con hormonas esteroideas con proteínas parecidas (clustalw), observamos que ésta tiene una gran homología con varios factores de transcripción asociados  $\sigma$ -54, como reportó Ramos y colaboradores. En primer lugar, observamos una homología con el péptido alfa del operon LACZ del vector de clonación pUCP9. Lo anterior nos sugiere que, la secuencia que se obtuvo podría formar parte del vector de clonación o una proteína parecida a PBR encontrada en *B. cenocepacia*.

En nuestro trabajo observamos que la producción de esta proteína es sobre expresada cuando *N. brasiliensis* es sometida a una concentración normal de estradiol tras 8 horas de incubación (Fragmento 3, Figura 33). En el caso del fragmento 4, observamos una mayor expresión en la condición de 8 horas de incubación sin hormona y a la concentración normal de estradiol, no así en la concentración más alta de estradiol en donde la expresión disminuyó. Cabe señalar, que al realizar la alineación del fragmento 4 en primer lugar obtuvimos similitud con la proteína hipotética O3I\_028560 de *N. brasiliensis*; en menor grado, se observó una similitud con la proteína PBR. Por otro lado, el fragmento 16 (estimulación con testosterona a las 8 horas de incubación) presentó el mismo patrón que el fragmento 3, es decir, una sobreexpresión única a una concentración normal de testosterona. Debido a la repetición de esta expresión y a que el alineamiento del fragmento 4 es más parecido a una proteína hipotética, podemos sugerir que la expresión de los fragmentos 3 y 16 es la más válida. De ser así, tanto el estradiol (fragmento 3) como la testosterona (fragmento 16) a concentraciones normales estarían aumentando la expresión de dicha proteína.

En este trabajo sugerimos que la producción de esta proteína podría actuar de manera similar ante un tipo de estrés (estimulación hormonal), sin embargo se necesitan estudios que evalúen las funciones antes mencionadas de esta proteína.

## Subunidad E1 de la Piruvato deshidrogenasa

En la mayor parte de las células eucariontes y muchas bacterias que viven en condiciones aerobias y oxidan sus nutrientes a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , la glucólisis es la primera etapa de la oxidación completa de la glucosa. El Piruvato formado en la glucólisis en condiciones anaerobias puede ser reducido a lactato, etanol o algún producto de la fermentación. Por otro lado, en condiciones aerobias el piruvato puede sufrir una oxidación por medio del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa localizado en las mitocondrias de las células eucariontes y en el citoplasma de las células procariontes. Esta oxidación es un proceso irreversible en el que el piruvato pierde un grupo carboxilo en forma de  $\text{CO}_2$  mientras que los dos carbonos restantes se transforman en el grupo acetilo del acetil-CoA <sup>(de Kok. 1998)</sup>.

Esta fase aerobia del catabolismo es llamada respiración celular y consta de tres fases principales: I) la oxidación de la glucosa, ácidos grasos y algunos aminoácidos para dar lugar acetil-CoA, II) la incorporación de los grupos acetilo al ciclo de Krebs, donde son oxidados enzimáticamente hasta  $\text{CO}_2$  en donde se libera energía en forma de NADH y FADH y III) la reducción y oxidación de las coenzimas liberando protones y electrones que son transferidos a la cadena transportadora de electrones en donde se genera ATP debido al proceso de fosforilación oxidativa <sup>(de Kok. 1998)</sup>.

El complejo multienzimático de la Piruvato deshidrogenasa está formado principalmente por 3 enzimas que catalizan diferentes pasos de la reacción. La subunidad E1 está formada por 2 subunidades alfa y 2 subunidades beta. Esta subunidad cataliza la descarboxilación del piruvato y su unión a la lipoamida de la subunidad E2 la dihidrolipoil transacetilasa. La subunidad E2 transfiere el grupo acetil que se encuentra unido a la lipoamida a la coenzima A para dar el acetil-CoA producto de la reacción y la lipoamida en su forma reducida. La subunidad E3 dihidrolipoil deshidrogenasa recupera la forma oxidada de la lipoamida rindiendo un NADH, en donde se requiere de FAD como coenzima <sup>(de Kok. 1998)</sup>. El complejo multienzimático de la Piruvato deshidrogenasa es de vital importancia para la generación de energía. Sin embargo, en algunos estudios se ha demostrado que esta juega un papel muy importante en la patogenia de varios microorganismos <sup>(Thomas. 2013)</sup>.

Las interacciones entre los microorganismos y los componentes de la matriz extracelular del hospedero pueden influir en la iniciación y el establecimiento de las infecciones. Los microorganismos poseen un amplio repertorio de estrategias que les permite tener una interacción con el hospedero <sup>(Shatha. 2002)</sup>. En este sentido, se ha estudiado el papel de la subunidad  $\beta$  E1 de la Piruvato deshidrogenasa. Por medio de la purificación de proteínas de superficie celular de *Mycoplasma pneumoniae*, del análisis de las

secuencias de aminoácidos así como de la microscopía con el marcaje con inmunogold con anticuerpos policlonales reactivos contra la subunidad  $\beta$ E1 de la Piruvato deshidrogenasa, se demostró que ésta forma parte de la superficie celular y que además propicia la adherencia a la fibronectina del hospedero. Lo anterior se corroboró con la utilización de un atisuerdo anti-subunidad  $\beta$  E1 en donde la adherencia a la fibronectina por *M. pneumoniae* fue inhibida <sup>(Shatha. 2002)</sup>.

En otro estudio realizado por Thomas y colaboradores se corroboró este fenómeno al hacer un análisis de fraccionamiento de la superficie celular de *M. pneumoniae* en donde encontró la presencia de la subunidad  $\beta$  E1. Estos autores indican que la unión de enzimas a plasminógenos humanos y particularmente la asociación de la subunidad  $\beta$  E1 de la Piruvato deshidrogenasa puede contribuir a la patogénesis de la infección causada por *M. pneumoniae*, ya que es un factor importante en la adherencia y en la interacción parásito-hospedero <sup>(Thomas. 2013)</sup>.

El doble papel de estas enzimas ha sido poco estudiado, sin embargo en este trabajo podemos sugerir la posible doble función de esta enzima debido a que en este trabajo observamos que la expresión genética de ésta se presentó en la concentración más alta de estradiol. Lo anterior podría explicar el papel que juega en la virulencia y en el establecimiento en el hospedero.

De acuerdo a los resultados que obtuvimos en este trabajo, observamos que cinco (proteínas hipotéticas, PBR, metiltransferasas, hidrolasas de pared y Anhidrasa carbónica) de las siete proteínas que modificaron su expresión genética, podrían ser producidas de manera natural por *N. brasiliensis* ya que se expresaron en ausencia de estímulo hormonal, aunque es interesante el hecho de que estas inhibieran su expresión a altas concentraciones hormonales. Por otro lado, dos proteínas (Piruvato deshidrogenasa y carboxilesterasa), se expresaron en presencia de una concentración excesiva de estradiol y testosterona respectivamente. Los resultados obtenidos tendrán que ser sustentados con estudios más específicos para evaluar su implicación en la fisiopatogenia del micetoma.

El presente trabajo, representa el primer estudio en relación al efecto que tienen las hormonas esteroides en la expresión genética de *N. brasiliensis*, el cual abre camino a diversas investigaciones que involucren el hallazgo de las funciones de las proteínas aquí mencionadas.

## XI) CONCLUSIONES

Se estandarizó la técnica RAP-RT-PC para el estudio de expresión diferencial en *N. brasiliensis*

Se caracterizó el aislado clínico FM825 como *Nocardia brasiliensis*

Se detectaron 7 posibles proteínas que modificaron su expresión en presencia de 17  $\beta$ -estradiol y/o testosterona:

- Proteínas hipotéticas
- PBR (Phenazine biosynthesis regulator)
- Subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa
- rRNA (adenina-N (6) -)-metiltransferasa
- Hidrolasa de pared celular
- Anhidrasa carbónica
- Carboxilesterasa

Cinco de estas proteínas (proteínas hipotéticas, PBR, metiltransferasas, hidrolasas de pared y Anhidrasa carbónica) son producidas naturalmente por *N. brasiliensis* ya que se expresaron en ausencia de estímulo hormonal.

Dos proteínas (Piruvato deshidrogenasa y carboxilesterasa), se expresaron en presencia de una concentración alta de estradiol y testosterona respectivamente.

El papel de estas proteínas en la fisiología o virulencia de *N. brasiliensis* solo podrá determinarse con estudios adicionales.

## X) PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se plantean las siguientes líneas de investigación a abordar:

- Validar los resultados obtenidos en el presente trabajo por Northern blot o qPCR.
- Determinar el efecto que tiene el 17  $\beta$ -estradiol y la testosterona en la expresión de los genes obtenidos en el presente trabajo, diseñando primers específicos que permitan amplificar un fragmento mayor o el gen completo con lo cual se permitirá la caracterización completa del gen.
- Investigar el efecto de las deleciones o la interrupción de los genes para evaluar la sobrevivencia, virulencia u otra función en *N. brasiliensis*.
- Determinar si los genes regulados por el 17  $\beta$ -estradiol y la testosterona en *N. brasiliensis* son factores de virulencia potencialmente manipulables de tal forma que se pueda contribuir a establecer medidas preventivas y terapéuticas en el micetoma causado por *N. brasiliensis*.

## XI) REFERENCIAS

1. Abad-Zapatero, C., P. Zhong, D.E. Bussiere, K. Stewart, S.W. Muchmore. 1999. rRNA Methyltransferases (ErmC and ErmAM) and antibiotic resistance. En: Cheng, X., R.M. Blumenthal. 1999. S-Adenosylmethionine-Dependent Methylra: Structure and Functions. World Scientific Publishing. 199-225.
2. Amado, J.A., J. Flores. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. En: Farmacología Humana. Flores, J. 3ª Edición. 2003. 3.
3. Amirshahi, A., C. Wan, K. Beagley, J. Latter, I. Symonds, P. Timms. 2011. Modulation of the *Chlamydia trachomatis* in vitro transcriptome response by the sex hormones estradiol and progesterone. BMC Microbiol. 11:150:1-9.
4. Amornkul, P.N., J.D. Hu, S. Tansuphasawadikul, S. Lee, B. Eampokalap, S. Likanonsakul, R. Nelson, N.L. Young, R.A. Hajjeh, K. Limpakarnjanarat, T.D. Mastro. 2003. Human immunodeficiency virus type I subtype and other factors associated with extrapulmonary Cryptococcosis among patients in Thailand with AIDS. AIDS Res Hum Retroviruses. 19:85-90.
5. Ansar, S.A., W.J. Penhale, N. Talal. 1985. Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. Am J Pathol. 121:3:531-551.
6. Arenas, R.G. 2008. Micología Médica Ilustrada. 3ª Ed. Mc Graw Hill.
7. Benson, N. R., R.M. Wong, M. McClelland. 2000. Analysis of SOS response in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium using RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. J Bacteriol. 182:3490-3497.
8. Berd, D. 1973. Laboratory Identification of Clinically important aerobic *Actinomycetes*. Appl Microbiol. 25:4:665-681.
9. Berto, P., P. Commenil, L. Belingheri, B. Dehorter. 1999. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. FEMS Microbiol Lett. 180:183-189.
10. Billingham, R.E. 1986. Immunologic advantages and disadvantages of being a female. In: Clarke, D.A. Croy, B.A. editors. Reproductive Immunology. New York. Elsevier. 1-9.
11. Bonis, M., C. Ecobichon, S. Guadagnini, M.C. Prévost, I.G. Boneca. 2010. A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence. Mol Microbiol. 78:809-819.
12. Bouman, A., M.J. Heineman, M.M. Faas. 2005. Sex hormones and the immune response in humans. Hum Reprod Update. 4:411-23.
13. Brown-Elliot, B.A., J.M. Brown, P.S. Conville, R.J. Wallace. 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia spp.* based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev. 19:2:259-282.
14. Calderone, R.A., W. A. Fonzi. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 9:7:327-335.
15. Chia, J.S., Y.Y. Lee, P.T. Huang, J.Y. Chen. 2001. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. Infection And Immunity. 2493-2501.
16. Chow, C., T. Lamichhane, S. Mahto. 2007. Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. ACS Chem Biol. 21:610-619.
17. De Kok, A., A.F. Hangeveld, A. Martin, A.H. Westphal. 1998. The puruvate dehydrogenase multi-enzyme complex. Annu Rev Nutr. 13:497-520
18. Del Prete, S., S. Isik, D. Vullo, V. De Luca, V. Carginale, A. Scozzafava, C.T. Supuran, C. Capasso. 2012. DNA cloning, characterization, and inhibition studies of an  $\alpha$ -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. J Med Chem. 55:23:10742-10748.
19. Delaney, S.M., D.V. Mavrodi, R.F. Bonsall, L.S. Thomashow. 2001. phzO, a Gene for biosynthesis of 2-Hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens*. J Bacteriol. 183:318-327.

20. Develoux, M., J. Audoin, J. Treguer, J.M. Vetter, A. Water, A. Cenac. 1988. Mycetoma in the Republic of Niger: clinical features and epidemiology. *Am J Trop Med Hyg.* 38:386-390.
21. Doi, Y., Y. Arakawa. 2007. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 45:1:88-94.
22. Dorantes-Cuéllar, A., Martínez-Sibaja C, Guzmán-Blanno A. 2012. *Endocrinología clínica. 4ª Edición Manual Moderno.* México. ISBN 9707290633, 97897072906312012. *Endocrinología clínica.* Ed. Manual Moderno. Pp 941.
23. Dromer, F., S. Mathoulin, B. Dupont, L. Letenneur, O. Ronin. 1996. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. *Clin Infect Dis.* 23:91-96
24. Dubois, M., K. Giles, J. Hamilton, P. Rebers, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28:3:350-356.
25. Eiding, D., T.J. Garrett. 1972. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J Exp Med.*136:1098-1116.
26. Fahal, A.H. 2004. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98:1:3-11.
27. Farrell, A.M., T.J. Foster, K.T. Holland. 1993. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *J Gen Microbiol.* 139:267-277.
28. Fernández, F.R.M., Molina de Sochin, R. Arenas. 2005. Paracoccidiodomicosis. Programa de actualización continua en dermatología. PAC. *Dermatología-2. Libro 4. Micología Médica.* 272-277.
29. Fislage, R., M. Berceanu, Y. Humboldt, M. Wendt, H. Oberender. 1997. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1:25:9:1830-1835.
30. Flores-Lozano, F., A. Cabeza de Flores, E. Calarco Zaccari. 2005. *Endocrinología. 5ª Edición.* Méndez Editores, S.A. de C.V. México, D.F.
31. Firdich, E., J. Biboy, C. Adams, J. Lee, J. Ellermeier, D.L. Gelda, V.J. Dirita, S.E. Girardin, W. Vollmer, E.C. Gaynor. 2012. Peptidoglycan-modifying enzyme Pgp1 is required for helical cell shape and pathogenicity traits in *Campylobacter*.8:3.
32. Fuentes, A., R. Arenas, M. Reyes, R.F. Fernández y R. Zacarías. 2006. Actinomycetoma por *Nocardia sp.* Informe de cinco casos tratados con imipemem solo o combinado con amikacina. *Gac Méd Méx, México.* 142:3:247-252.
33. Ghannoum, M.A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 13:122-143.
34. Goble, F.C., E.A. Konopka. 1973. Sex as factor in infectious disease. *Trans N Y Acad Sci.* 35:325-346.
35. González-Ochoa, A. 1962. Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*, isolation of the agent from soils. *Rev Inst Salubr Enferm Trop Mex.* 22:15-24.
36. Goodfellow, M. 1983. Ecology of *Actinomycetes*. *Annual Review of Microbiology, England, United Kindom.* 37:189-216.
37. Gribbon, E.M., W.J. Cunliffe, K.T. Holland. 1993. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *J Gen Microbiol.* 139:1745-1751.
38. Hay, R.J., E.S. Mahgoub, G. Leon, S. Al-sogair, O. Welsh. 1992. Mycetoma. *J Med Vet Mycol.* 30:1:41-49.
39. Hajjeh, R.A., L.A. Conn, D.S. Stephens, W. Baughman, R. Hamill, E. Graviss, P.G. Pappas, C. Thomas, A. Reingold, G. Rothrock, L.C. Hutwagner, A. Schuchat, M.E. Brandt, R.W. Pinner. 1999. Cryptococcosis population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected person. *J Infect Dis.* 179:2:449-454.

40. Hett, E.C., M.C. Chao, L.L. Deng, E.J. Rubin. 2008. A mycobacterial enzymes essential for cell división synergizes with resuscitation-promoting factors. 4:2.
41. Heffernan, B.J., B. Thomason, A.H. Palmer, P. Hanna. 2006. *Bacillus anthracis* anthrolysin O and three phospholipases C are functionally redundant in a murine model of inhalation anthrax. FEMS Microbiol Lett. 271:98-105.
42. Hernández-Hernández, F. 1994. Efecto de las hormonas sexuales humanas en el micetoma experimental y sobre el desarrollo "in vitro" de *Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Micología Médica. Facultad de Medicina, UNAM.
43. Hernández-Hernández, F., R.A. López-Martínez, L.J. Méndez-Tovar, P. Manzano-Gayosso. 1995. *Nocardia brasiliensis*: in vitro and in vivo growth response to steroid sex hormones. Mycopathol. 132:79-85.
44. Hernández-Hernández, F. 2008. Epidemiología del micetoma, etiología del eumicetoma. En: Actualidades en Micología Médica 4a ed. VII Diplomado de Micología Médica. 155-162.
45. Hlady, W.G., K.C. Klontz. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. J Infect Dis 173:1176-1183.
46. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. T. A. Sneath, J.T. Staley, S. T. Williams. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9a ed. Lippincott Williams and Wilkins. U. S. A. pp 787.
47. Kaushic, C., F. Zhou, A.D. Murrin, C.R. Wira. 2000. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. Infect Immun. 68:7:4207-4216.
48. Klein-Gitelman, M.S., Szer I.S. 1991. Disseminated *Nocardia brasiliensis* infection: an unusual complication of immunosuppressive treatment for childhood dermatomyositis. J Rheumatol. 18:8:1243-6.
49. Klein, S.L. 2000. The effects of hormone on sex differences in infection: from genes to behavior. Neurosci Biobehav Rev. 24:627-638.
50. Klein, S.L. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. Parasite Immunol. 26:247-264.
51. Kronenberg, H.M., S. Melmed, K. Polonsky, S. Keneth and P.R. Larsen. 2009. Williams Tratado de Endocrinología. 11 a ed. Elsevier, España.
52. Kurth, J., L. Träger. 1975. Steroid receptors in *Streptomyces hydrogenans*: isolation and characterization of a high affinity receptor for 5alpha-dihydrotestosterone. Acta Microbiol Acad Sci Hung. 22:4:497-502.
53. Jaeger, K.E., S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M.V. Heuvel, O. Misset. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev. 15:29-63.
54. Jarefors, S., L. Bennet, E. You. 2006. Lyme borreliosis reinfection: might it be explained by a gender difference in immune response?. Immunology. 118:224-232.
55. Latapí, F., Y. Ortiz. 1963. Los micetomas en México: Algunos datos epidemiológicos relativos a 197 casos. Mem 1er Cong Mex Derma. 126-144.
56. Lavalle, P. 1966. Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia. Gac Med Mex. 96:545-569.
57. Lerner, P.I. 1996. Nocardiosis. Clin Infect Diseases. 22:891-905
58. Lerner, R.T., A.L. Lovering, N.K. Bui, K. Uchida, S. Aizawa, W. Vollmer, R.E. Sockett. 2012. Specialized peptidoglycan hydrolases sculpt the intra-bacterial niche of predatory *Bdellovibrio* and increase population fitness. PLoS Pathog. 8:2.

59. Liang, P., A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 257:967-971.
60. Liou, G.F., S. Yoshizawa, P. Courvalin, M. Galimand. 2006. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16 S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol*. 359:2:358-364.
61. López, G., O.H. Torres, I. Vela y V. Pomar. 2012. Ocular disease as a presentation form of disseminated nocardiosis by *Nocardia brasiliensis*. *Med Clin (Barc)*. 7.
62. López, Martínez, A.R., L.J. Méndez-Tovar, F. Hernández-Hernández, R. Castañón-Olivares. 2004. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 2a Ed. Trillas.
63. López-Martínez, A.R., L.J. Méndez-Tovar. 2006. Datos epidemiológicos del micetoma en México. *Monografías de Dermatología*. 19:1:5-12.
64. Lonon, M.K., D.E. Woods, D.C. Straus. 1988. Production of lipase by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *J Clin Microbiol*. 26, 979-984.
65. Lun, S., W.R. Bishai. 2007. Characterization of a novel cell wall-anchored protein with carboxylesterase activity required for virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 282:25:18348-18356.
66. Mariat, F. 1963. Sur la distribution géographique et la répartition des agents de mycetômes. *Bull Soc Path Exot*. 56:33-55.
67. Mathieu-Daude, F., T. Trenkle, J. Welsh, B. Jung, T. Vogt, M. McClellans. 1999. Identification of differentially expressed genes using RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*. 303:309-324.
68. Mathur, S., R.S. Mathur, H. Dowda, H.O. Williamson, W.P. Faulk, H.H. Fudenberg. 1978. Sex steroid hormones and antibodies to *Candida albicans*. *Clin Exp Immunol*. 33:79-87.
69. Mavrodi, D.V., W. Blankenfeldt, L.S. Thomashow. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp.: Biosynthesis and regulation. *Ann Rev Phytopathol*. 44:471-485.
70. McClelland, E.E., J.M. Smith. 2011. Gender specific differences in the immune response to infection. *Arch Immunol*. 59:203-213
71. McClelland, M., F. Mathieu-Daude, J. Welsh. 1995. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *TIG*, 11:6:242-246.
72. Merkel, S.M., S. Alexander, E. Zufall. 2001. Essential role for estrogen in protection against *Vibrio vulnificus*-induced endotoxic shock. *Infect Immun*. 69:6119-6122.
73. Mullen, T., K. Markey, P. Murphy, S. McClean, M. Callaghan. 2007. Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 26:869-877.
74. Mummy, K.L., J.D. Bien, M.A. Pazos, K. Gronert, B.P. Hurley, B.A. McCormick. 2008. Distinct Isoforms of Phospholipase A2 Mediate the Ability of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and *Shigella flexneri* To Induce the Transepithelial Migration of Neutrophils. *Infect Immun*. 76:3614-3627.
75. Muñoz-Hernández, B., M.C. Noyola, G. Palma-Cortés, D.P. Rosete, M.A. Galván, M.E. Manjarrez. 2009. Actinomycetoma in arm disseminated to lung with grains of *Nocardia brasiliensis* with peripheral filaments. *Mycopathol*. 168:1:37-40.
76. Mohr, J.A., H. Long, B.A. McKown, H.G. Muchmore. 1972. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to steroids. *Sabouraudia*. 10:171-172.
77. Moody, D.E. 2001. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *J Anim Sci*. 79:E128-E135.

78. Nébavi, F., F.J. Ayala, F. Renaud, S. Bertout, S. Eholié, K. Moussa, M. Mallié, T. de Meeûs. 2006. Clonal population structure and genetic diversity of *Candida albicans* in AIDS patients from Abidjan (Côte d'Ivoire). *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:383-391.
79. Oliver, J.D. 2005. Wound infection caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol Infect*. 133:383-391.
80. Orio, J., P. Destombes, F. Mariat, G. Segretain. 1963. Les mycétomes en côtes française des Somalis. *Revue de 50 cas observés entre 1956 et 1962*. *Bull Soc Path Exot*. 56:161-173.
81. Palma-Ramos, A., M.V. Cuevas-Moreno, R. Arenas-Guzmán, M.E. Vega-Memije, L.E. Castrillón Rivera. 2008. Diseminación hematogena por *Nocardia brasiliensis* en tres ratones Balb/c a partir de un micetoma en el cojinete plantar. *Dermatología Rev Mex*. 52:2:70-76.
82. Pung, O.J., M.I Luster, H.T. Hayes, J. Rader. 1984. Influence of steroidal and nonsteroidal sex hormones on host resistance in mice: Increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* after exposure to estrogenic hormones. 46:2:301-307
83. Restrepo, A., M. E. Salazar, L.E. Cano, E.P. Stover, D. Feldman, D.A. Stevens. 1984. Estrogens inhibit Mycelium-to-Yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to Paracoccidioidomycoses. *Infect Immun*. 46:346-353.
84. Roberts, C.W., A. Satoskar, J. Alexander. 1992. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitology*. 12:382-388.
85. Rodriguez-Nava, V., A. Couble, G. Devulder, J.P. Flandrois, P. Boiron, F. Laurent. 2006. Use of PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis and Sequencing database for hsp65 gene-Based Identification of *Nocardia* Species. *J of Clin Microbiol*. 44:2:536-546. 81.
86. Ramos, C.G., S.A. Sousa, A.M. Grilo, L. Eberl, H. Leitão. 2012. The *Burkholderia cenocepacia* K56-2 pleiotropic regulator Pbr, is required for stress resistance and virulence. *Microb Pathog*. 48:5:168-177.
87. Rollof, J., J.H. Braconier, C. Soderstrom , P.N. Ehle. 1988. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Euro J Clin Microbiol Infect Dis*.7:505-510.
88. Rojas-Marin, C.E., L.F. Alva-López, V. Falcón-Solis, R. Sotelo-Robledo y A. Corrales-Baeza. 2003. Nocardiosis pulmonar: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 16:2:86-91.
89. Salazar, M.E., A. Restrepo, D.A. Stevens. 1988. Inhibition by estrogens of Conidium-to-Yeast conversión in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*. 56:711-713.
90. Salinas-Carmona, M.C. 2005. Capítulo V. La respuesta del huésped a la infección por *Nocardia brasiliensis*. En: ACTINOMICETOMA. Serrano, J.A., A.H. Sandoval, B.L. Beaman. Venezuela.
91. Sandoval, H. y J.A. Serrano. 1996. Identificación y diagnóstico de actinomicetos patógenos. Universidad Autónoma Metropolitana.
92. Sargent, T. D., and I. B. Dawid. 1983. Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science (Wash DC)* 222:135–139
93. Seo, S.I., S.J. Lee, J.C. Kim, Y.J. Choi, Sw Sw, T.K. Hwang, Y.H. Cho. 2003. Effects of androgen deprivation on chronic bacterial prostatitis in a rat model. *Int J Urol*. 10:9:485-491.
94. Singh, G., G. Singh, D. Jadeja, J. Kaur. 2010. Lipid hydrolizing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system. *Crit Rev Microbiol*. 36:3:259-69.
95. Sonex, C. 1998. Influence of ovarian hormones on urogenital infection. *Sex Transm Infect*. 74:1:11-19.
96. Sturtevant, J. 2000. Applications of Differential-Display reverse Transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin Microbiol Rev*. 13:3:408-427.

97. Supuran, C.T. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discovery*. 7:168-181.
98. Supuran, C.T. 2011. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Front Pharmacol*.2:34:1-6.
99. Thomas, C., E. Jacobs, R. Dumke. 2013. Characterization of pyruvate dehydrogenase subunit B and enolase as plasminogen-binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology*. 159:2:352-365.
100. Tsuboi, R., H. Komatsuzaki, H. Ogawa. 1996. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun*. 64:2936-2940.
101. Tsuyuguchi, K., K. Suzuki, H. Matsumoto, E. Tanaka, R. Amitani, F. Kuze. 2001. Effect of oestrogen on *Mycobacterium avium* complex pulmonary infection in mice. *Clin Exp Immunol*. 123:428-434.
102. Venkatswami, S., A. Sankarasubramanian, S. Subramanyam. 2012. The madura foot: looking deep. *Int J Low Extrem Wounds*. 1:31-42.
103. Walters, D.M., R. Russ, H.J. Knackmuss, P.E. Rouviere. 2001. High-density sampling of a bacterial operon using mRNA differential display. *Gene*, 273:305-315.
104. Vera-Cabrera, L., R. Ortiz-Lopez, R. Elizondo-Gonzalez, A.A. Perez-Maya y J. Ocampo-Candiani. 2012. Complete Genome Sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. *J Bacteriol*. 194:10:2761.
105. Voigt, C.A., W. Schafer, S. Salomon. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J*. 42:364-375.
106. Wachino, J., K. Shibayama, K. Kimura, K. Yamane, S. Suzuki, Y. Arakawa. 2010. RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 311:1:56-60.
107. Wachino, J., Y. Arakawa. 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat*. 15:3:133-148.
108. Welsh, J., K. Chada, S.S. Dalal, R. Cheng, D. Ralph, M. McClelland. 1992. Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Research*, 20:19:4965-4970.
109. Wierman, M.E. 2007. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv Physiol Educ* 31:26-33
110. Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res*. 18:6531-6535.
111. Wyckoff, T.J., J.A. Taylor, N.R. Salama. Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases. *Trends Microbiol*. 20:11:540-547.
112. Yamamoto, Y., H. Saito, T. Setogawa, H. Tomioka. 1991. Sex differences in host resistance to *Mycobacterium marinum* infection in mice. *Infect Immun*. 59:11:4089-4096.
113. Zuk, M., K.A. McKean. 1996. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int J Parasitol*. 26:1009-1024.

## X) ANEXOS

### Estandarización de la técnica RAP-RT-PCR

En el Despliegue Diferencial <sup>(Liang. 1992)</sup> diseñado para eucariontes, se utiliza un oligo dT que se unen a las colas de Poli A, presentes en el mRNA. Los procariontes carecen de esta secuencia en el mRNA, por lo que se han reportado estudios con modificaciones a la técnica original. La técnica de RAP-RT-PCR (RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR) fue diseñada para secuencias que carecen de colas de poli A. En esta técnica, tanto en la reacción de transcripción inversa (RT) como en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizan primers de pocos pares de bases que permiten detectar un alto porcentaje de las secuencias del mRNA de bacterias. Así, de acuerdo al trabajo publicado por Fislage se eligieron 10 juegos de primers (**Cuadro 1**) para lo cual se extrajo DNA de una cepa de *Escherichia coli* (TG1) y de la cepa de *N. brasiliensis* para evaluar la funcionalidad de los primers. No se realizaron RT's en este paso.

Primer	Secuencia
Ea3	5'-TTT ATC CAG CG-3'
Ea4	5'-TCA GCG TTT TA-3'
Ea5	5'-TTT CAG CGC CT-3'
Ea8	5'-ATC ATC CAG CA-3'
Ea10	5'-TTC AGC CAG CG-3'
Es2	5'-GCT GCT GGC G-3'
Es3	5'-GAA GTG CTG G-3'
Es5	5'-TGG CGG CGG C-3'
Es7	5'-ATG CGC TGG C-3'
Es8	5'-TGC CGA TGA A-3'

**Cuadro 1.** Primers utilizados para la evaluación de la técnica RAP-RT-PCR

Para la reacción de Reversa Transcripatasa, se utilizó la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase de la marca Invitrogen. Para fines de la estandarización, se realizó una extracción de RNA de *N. brasiliensis* sin tratar con ninguna hormona por el método de TRIzol, posteriormente se cuantificó y se realizó una síntesis de cDNA para utilizarlo para la PCR.

Posteriormente, se realizaron diferentes procedimientos que incluían modificaciones en las condiciones para la PCR descritas por diversos autores <sup>(Williams. 1990; Welsh 1992; Fislage. 1997)</sup>. Se realizaron curvas de concentración de cloruro de Magnesio en concentraciones que fueron de 1mM hasta 3 mM; curva de concentración de nucleótidos (dNTP's) que fueron de 100 µM hasta 300 µM, curva de concentración de

primers que oscilaron entre 500 pM y 4 μM, curva de concentración de cDNA desde 2 μl hasta 10 μl y una curva de temperatura de alineación con temperaturas que fueron desde 30 °C hasta 50 °C. Finalmente se evaluaron varias enzimas polimerasas (SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de Invitrogen, Amplificasa BioTecMol, polimerasa “casera” y la Taq DNA Polymerase (recombinant) de Fermentas.

### Ensayos de diversas condiciones para estandarizar la técnica de RAP-RT-PCR

Para evaluar la funcionalidad de los primers previamente utilizados por Fislage<sup>(Fislage. 1997)</sup> para estudios de expresión diferencial, se decidió a realizar los ensayos correspondientes con DNA de *N. brasiliensis* y con la cepa de *E. coli* JM107 como cepa control. En la **Figura 1** se muestra el material nucleico extraído de ambas cepas. Con este material se hicieron ensayos de PCR utilizando varias combinaciones de primers de acuerdo al **Cuadro 4** de Material y Métodos.

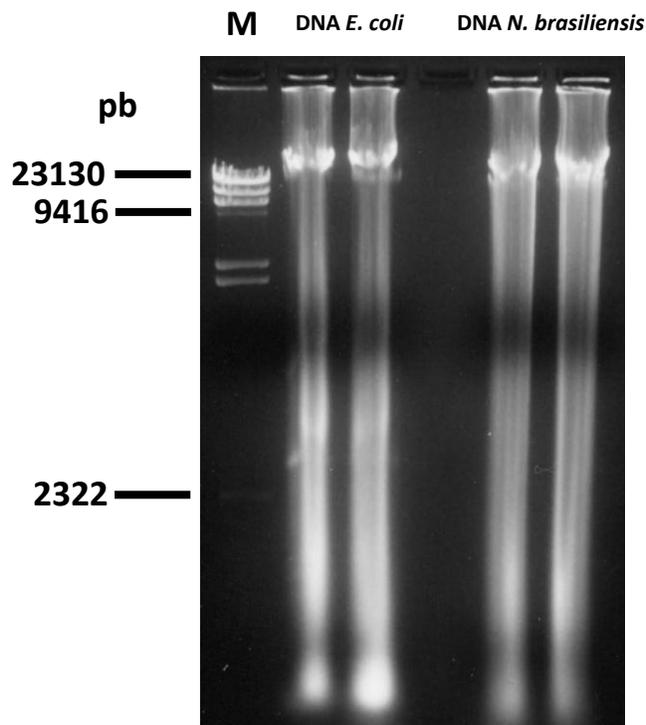


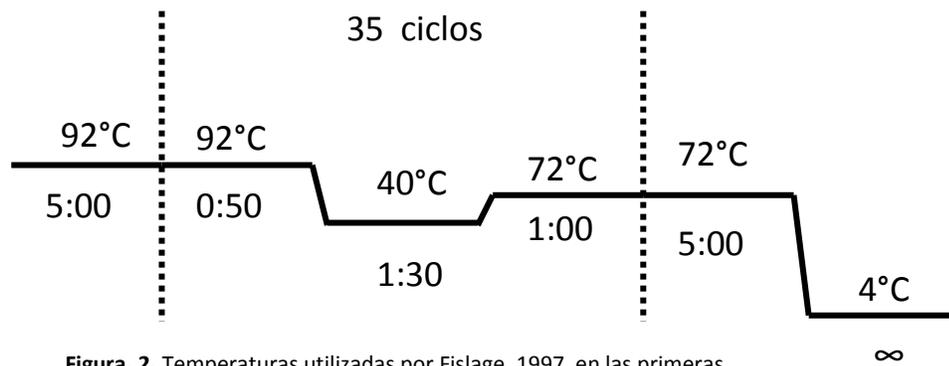
Figura 1. DNA de *E. coli* y DNA de *N. brasiliensis*

Con este material y siguiendo las condiciones mostrada en el **Cuadro 2** y la **Figura 2** se realizaron los primeros ensayos para verificar la funcionalidad de los primers En la **Figura 3** se muestra que con el DNA de *E. coli* se forma un ligero bandeo. Con el DNA de *N. brasiliensis* no se produjo ningún amplificado

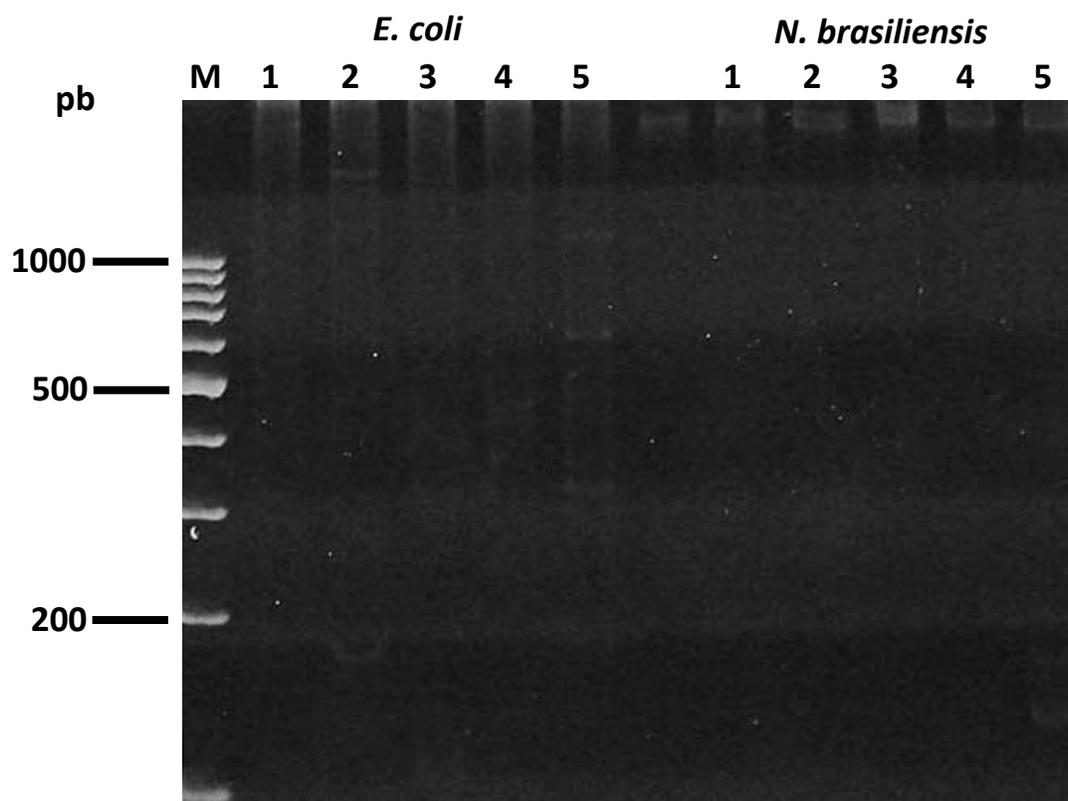
visible. Con este resultado inferimos que los primers eran funcionales, sin embargo las condiciones de PCR no eran las óptimas.

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> (10 mM)	1.5mM
dNTP's (2 mM)	2μM
Ea3 (25 μM)	5μM
Es5 (25 μM)	0.5μM
cDNA	2μl
Taq polimerasa Fermentas®	2 U
H <sub>2</sub> O MQ	c.b.p. 30 μl

**Cuadro 2.** Condiciones para PCR utilizadas por Fislage. 1997.



**Figura. 2.** Temperaturas utilizadas por Fislage. 1997 en las primeras reacciones de PCR

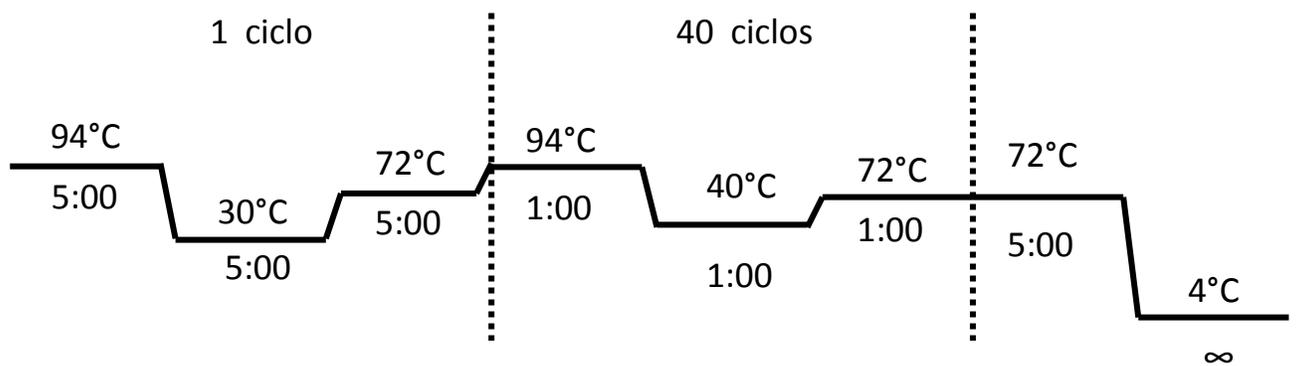


**Figura 3.** PCR con primers aleatorios utilizando DNA de *E. coli* y *N. brasiliensis*. Condiciones tomadas de Fislage. 1997.

A continuación se consideraron las condiciones de PCR propuestas por Williams y Welsh (Williams.1990; Welsh. 1992) mostradas en el **Cuadro 3** y **Figura 4**.

Reactivo	Concentración final Condiciones Williams et al, 1990.	Concentración final Condiciones Welsh et al, 1992.
Buffer 10X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (10 mM)	2mM	3mM
dNTP's (2 mM)	200 μM	50 μM
Ea3 (25 μM)	100μM	2μM
Es5 (25 μM)	100μM	2μM
cDNA	2μl	2μl
Taq polimerasa	0.5 μl	0.5 μl
H <sub>2</sub> O MQ	c.b.p. 20 μl	c.b.p. 20 μl

**Cuadro 3.** Concentraciones de reactivos utilizados por Williams y Welsh. Distintas condiciones para la estandarización de la técnica RAP-RT-PCR



**Figura 4.** Programa de temperaturas utilizado en el termociclador para estandarizar la técnica RAP-RT-PCR

Bajo estas condiciones no se favoreció la amplificación. Por lo anterior se decidió hacer las siguientes modificaciones:

Diversas combinaciones de primers

Uso de DNA y cDNA como material de partida (**Figura 5**)

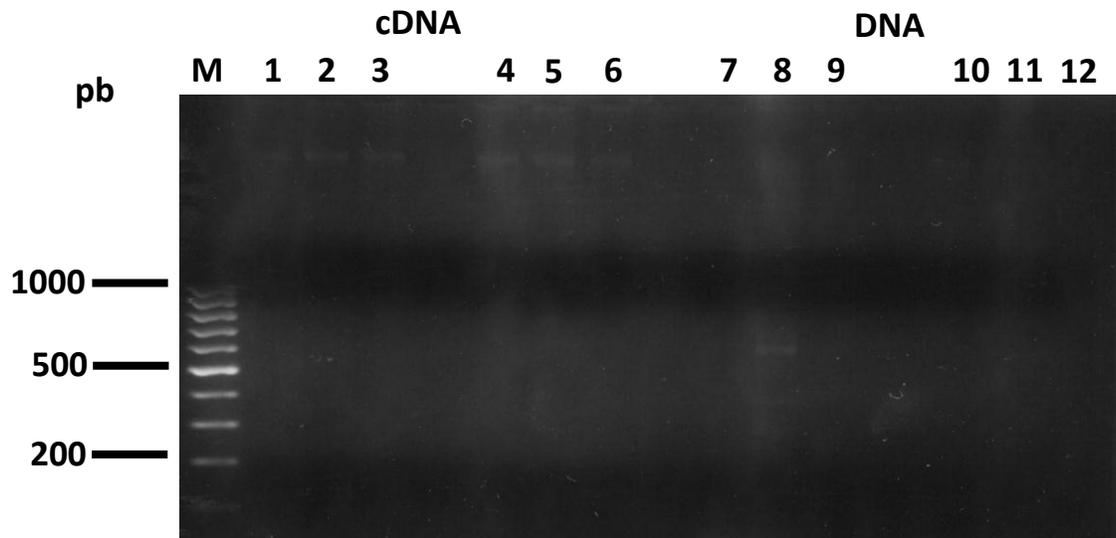
Cantidad de cDNA (5  $\mu$ l, 8  $\mu$ l y 10  $\mu$ l) (**Figura 7**)

Curva de Temperatura de alineamiento y tiempos (**Figura 8**)

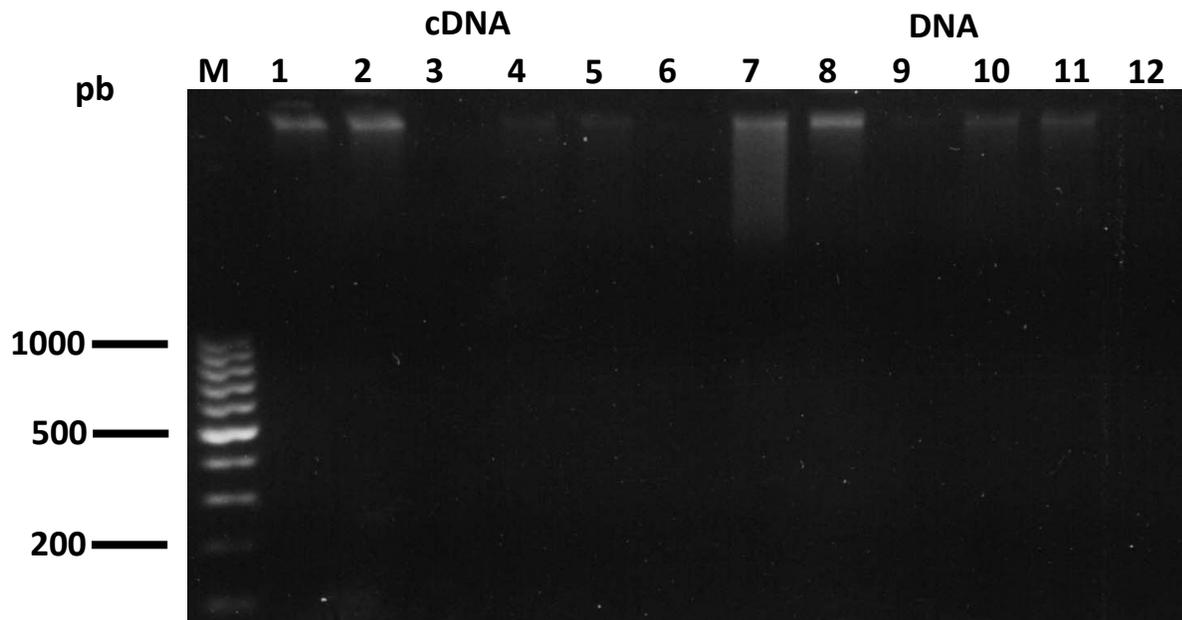
Curva de concentración de MgCl<sub>2</sub> (**Figura 7**)

Utilización de la enzima Taq Platinum (invitrogen) (**Figura 6**)

Utilización del Kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de Invitrogen (**Figura 9**)

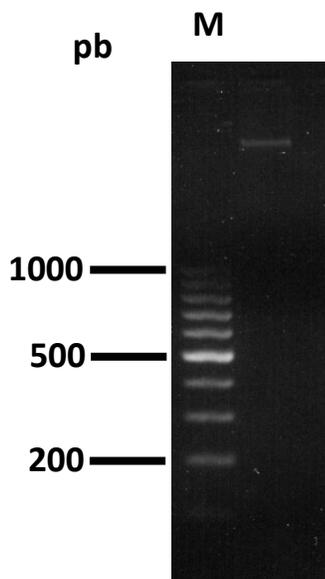


**Figura. 5.** PCRs a partir de cDNA y DNA de *N. brasiliensis* utilizando la enzima Taq Polimerasa Amplificasa Biotecmol. Pozos 1,4,7,10, combinación de Primers Ea3+Es2. Pozos 2,5,8,11, combinación de primers Ea3+Es5. Pozos 3,6,9,12 combinación de primers Ea3+Es8



**Figura. 6.** PCRs a partir de cDNA y DNA de *N. brasiliensis* utilizando la enzima **Platinum Taq** de Invitrogen. Pozos 1,4,7,10, combinación de Primers Ea3+Es2. Pozos 2,5,8,11, combinación de primers Ea3+Es5. Pozos 3,6,9,12 combinación de primers Ea3+Es8

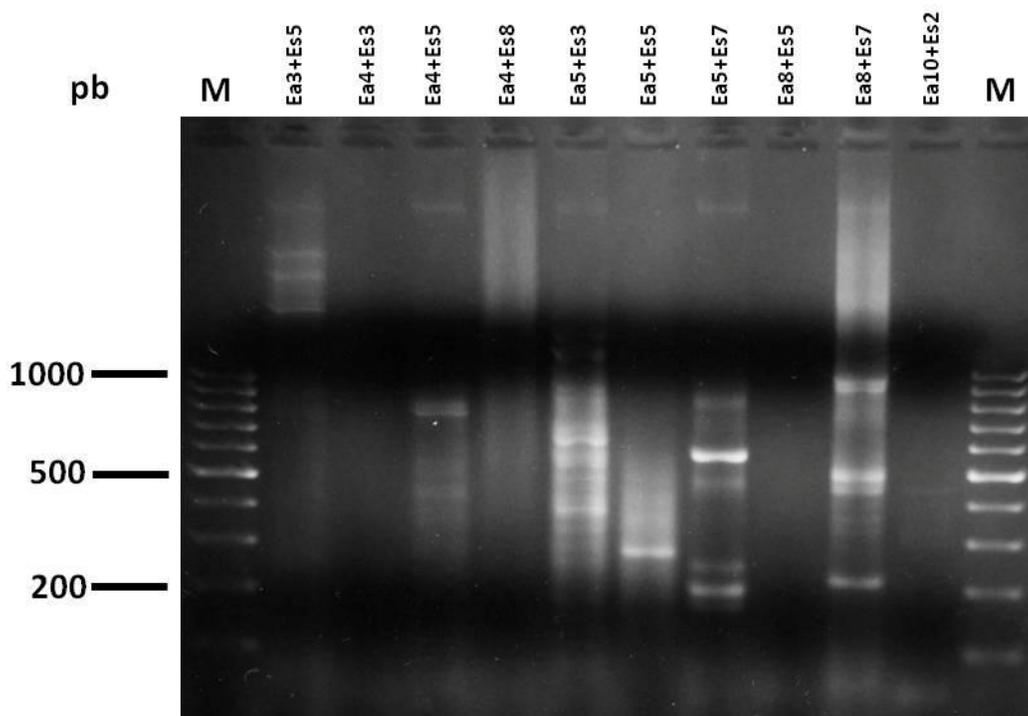




**Figura 9.** RT-PCR en un solo paso con el Kit SuperScript™One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de Invitrogen

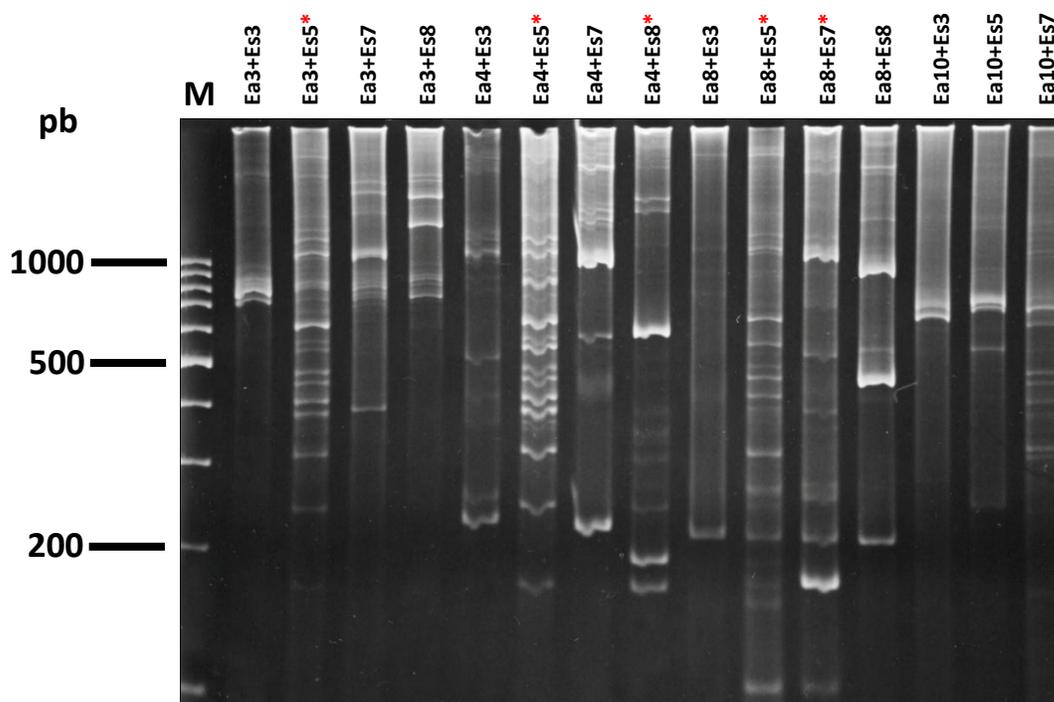
Finalmente se decidió cambiar la enzima. Se recurrió a utilizar otras enzimas polimerasas ya que únicamente se había trabajado con la enzima Amplificasa BioTecMol y con la Platinum® Taq de Invitrogen. Para estas pruebas se partió de las condiciones de Williams (Williams, 1990) con algunas modificaciones de acuerdo a los resultados anteriores. Las enzimas fueron la Taq DNA Polymerase (recombinant) de Fermentas y una polimerasa extraída en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

Los resultados mostraron que tanto la enzima UAEM (no mostrada), como la enzima Taq DNA Polymerase (recombinant) de Fermentas induce la síntesis de algunos productos de amplificación **Figura 10.**



**Figura 10.** Amplificación por la enzima Taq Polimerasa de Fermentas utilizando combinaciones de primers descritos en el **Cuadro 10**.

Se aumentó el número de combinaciones de primers y los productos fueron corridos en un gel de poli-acrilamida al 6% teñido con una solución de bromuro de etidio al 0.1% (**Figura 27**). Con este perfil de bandeo se determinó que la enzima Taq DNA Polymerase (recombinant) de Fermentas fue la mejor enzima para el RAP-RT-PCR. De acuerdo a la **Figura 11** se eligieron 5 juegos de primers (marcados con asterisco) para los estudios con estimulación hormonal.



**Figura 11.** Amplificación de la enzima Taq polimerasa de Fermentas®. Distintas combinaciones de primers. El asterisco (\*) indica las combinaciones de primers que fueron utilizadas en los experimentos posteriores.

Con base en los ensayos previamente descritos, a continuación se resumen las condiciones definitivas para obtener un patrón de amplificación satisfactorio para el estudio de RAP-RT-PCR de *N. brasiliensis* estandarizadas durante el presente trabajo.

Las mejores condiciones para obtener un amplificado satisfactorio fueron:

RNA total 3µg

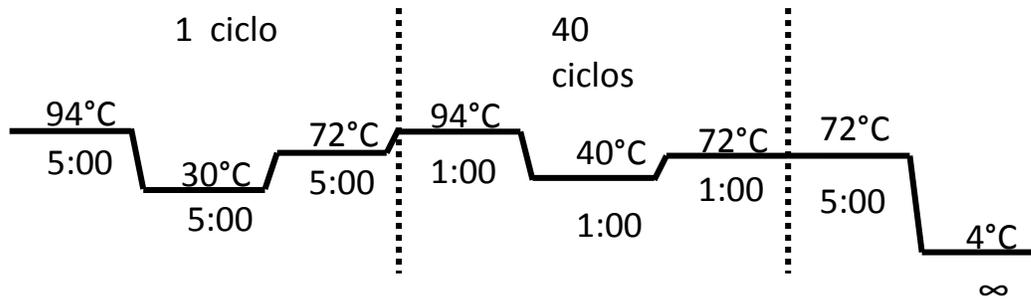
Condiciones de RT descritas en la sección 6.4.6. de Material y Métodos

Condiciones de PCR:

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 mM
dNTP's (3 mM)	200 µM

Ea3 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ M
Es5 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ M
cDNA	5 $\mu$ l
Taq polimerasa Fermentas®	3.75 U
H <sub>2</sub> O MQ	c.b.p. 30 $\mu$ l

**Cuadro 4.** Condiciones para PCR estandarizadas para la técnica RAP-RT-PCR



**Figura 12.** Programa de temperaturas estandarizado para la técnica RAP-RT-PCR

Volumen de Carga en gel: 30  $\mu$ l con buffer de carga naranja G a 1 X.

Corrimiento de productos de PCR en un gel de agarosa al 3.5% teñido con bromuro de etidio, en buffer TAE 1X, a 80 volts durante 1.5 horas.