

## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

El Micetoma conocido inicialmente como “pie de Madura” fue encontrado en el Servicio Médico de Madras en la Armada Británica de la India en 1842 por Gill en la ciudad de Madura, India. Carter en 1860 determinó que los hongos pueden producir Micetoma, en 1988 Nocard aisló de lesiones granulomatosas bacterias del género *Nocardia*, tiempo después en 1890, Eppinger reportó el primer caso de infección por *Nocardia* en humanos, posteriormente en 1913 Pinoy subdividió los agentes causales de Micetoma en dos clases; los causados por hongos llamados eumicetos y los causados por bacterias, llamados actinomicetos. El 60% de los Micetomas son causados por bacterias aerobias que pertenecen a la familia Actinomycetales, en México el 98 % de los Micetomas son causados por bacterias y solo el 2% por hongos (32, 35, 79 y 98).

El Micetoma es una infección crónica de la piel y se manifiesta con múltiples fistulas exudativas de aspecto tumoral en manos y pies. Esta infección se presenta en una amplia distribución en el mundo,

encontrándose más frecuentemente en las zonas localizadas entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio (38, 52 y 72).

En México el primer médico mexicano en describirla fue Cicero en 1912, la especie más frecuentemente aislada en pacientes infectados en México es *Nocardia brasiliensis* (*N. brasiliensis*) (124).

El o los mecanismos de patogenicidad que utilizan estas bacterias para inducir enfermedad son pobremente conocidos.

Los estudios realizados para evaluar el papel del macrófago en la resistencia a la infección por *N. brasiliensis* revelan que la respuesta celular por macrófagos juega un papel importante en la resistencia a la infección ya que macrófagos obtenidos de un ratón que fue infectado con *Listeria monocytogenes* evitan el establecimiento de la infección por *N. brasiliensis* cuando son transferidos a un ratón sano (93). Otros estudios han revelado en un modelo de ratones atímicos homocigotos y heterocigotos, el papel del linfocito T en la resistencia a la infección por *Nocardia asteroides* (*N.asteroides*), sus resultados muestran que los ratones homocigotos al ser infectados con *N. asteroides* no desarrollaban la infección a diferencia de

los heterocigotos donde el grado de mortalidad se presentó en un 100% de los ratones infectados (46).

Por otro lado se ha reportado la falta de participación protectora de la respuesta inmune mediada por anticuerpos, incluso hay autores que sugieren que los anticuerpos favorecen y agravan la infección. En el mismo marco de estudio se ha demostrado que en suero de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* muerta por calor, existen factores séricos que al ser transferidos a ratones sanos y estos posteriormente retados con *N. brasiliensis* vivas, evitan el establecimiento de la infección, a diferencia de los ratones que recibieron suero homólogo de ratones que se curaron espontáneamente y que desarrollaron micetoma, así como aquellos que recibieron suero heterólogo (100,108 y 138).

Al igual que otros microorganismos patógenos intracelulares facultativos, como *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), los factores de virulencia de *N. brasiliensis*, no han sido totalmente esclarecidos.

El género *Nocardia* se encuentra estrechamente relacionado con el género *Mycobacterium* ya que ambos poseen características microbiológicas similares además de producir infecciones crónicas en el humano. La variedad en la resistencia a algunas drogas de diferentes especies del genero de Micobacterias se relaciona con la pérdida de la actividad enzimática de algunas proteínas y se asume que las diferencias en la expresión de estas proteínas pudieran determinar la capacidad de sobrevivir en células fagocíticas (51, 76, 77, 88 y 103).

Actualmente se ha estudiado en un extracto celular crudo el patrón proteico de *N. brasiliensis*, identificando la presencia de tres proteínas inmunodominantes, las cuales fueron reveladas por sueros de pacientes enfermos de micetoma causado por *N. brasiliensis*, el análisis por inmunoelectrotransferencia mostró bandas proteicas para P61, P26 y P24, principalmente. Posterior a estos estudios se determinó que la proteína inmunodominante P61 posee actividad de catalasa (119, 122 y 145).

La actividad de catalasa se ha relacionado estrechamente con la actividad de otras enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD) de

diferentes microorganismos, en *N. brasiliensis* se desconoce la presencia de SOD y su relación con P61, se sabe actualmente que estas enzimas son cruciales para la supervivencia de los organismos aerobios (4, 15, 48, 107, 125, 127 y 139).

Por otro lado se ha propuesto que el gen que codifica para SOD en *N. asteroides* GUH-2, es un factor de virulencia en la infección de nocardiosis por *N. asteroides* y además que esta proteína corresponde a un grupo de proteínas periplásmicas, la cual posee actividades diferentes a otros tipos previamente reportadas (3).

Como se mencionó anteriormente *N. brasiliensis*, es el agente causal más común en México del micetoma actinomicótico y en la actualidad no se conocen sus mecanismos de patogenicidad, por ello el objetivo general de este trabajo es estudiar el papel de la actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental en ratones BALB/c.

Para realizar este trabajo utilizamos una cepa de referencia inductora de micetoma y catalasa positiva (P61), *N. brasiliensis* HUJEG-1, registrada

en la ATCC con el número 700358, la cual fue tratada con un agente mutágeno (etilmetanosulfonato) para la obtención de una clona no inductora de micetoma en ratones BALB/c y que a su vez fueron catalasa negativa, determinamos por análisis cuantitativo y cualitativo la actividad de catalasa en cada una de las cepas aisladas, a una de ellas posteriormente se le restauró la actividad de catalasa transformando una clona con un vector que contenía el gen que codifica para una catalasa de *M. tuberculosis* (KAT-G), posteriormente aislamos clonas transformadas con actividad de catalasa y evaluamos la capacidad de inducir micetoma en ratones BALB/c.

## CAPITULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 Generalidades:

##### 2.1.1 Características microbiológicas:

**2.1.1.1 Condiciones de crecimiento:** *N. brasiliensis*, es un actinomiceto Gram positivo, no móvil, filamentoso, parcialmente ácido-alcohol resistente; aeróbico estricto, saprófito que se encuentra en suelos cálidos y secos (46 y 126), crece en medios de cultivo convencionales y enriquecidos como el Sabouraud, BHI (de las siglas en inglés, Brain, Heart, Infusion) además de medios de cultivos enriquecidos de sales para la producción de proteasas (110), crece a una temperatura de 37 °C y en un rango de 10-50 °C, además de un pH de 7.5, sus colonias en medios semisólidos son apiladas rugosas, secas y amarillentas, en cultivos viejos las colonias toman un color café rojizo. En ocasiones las colonias presentan un desarrollo voluminoso, de color blanco con grandes filamentos, los cuales al microscopio se distribuyen en formas bacilares y cocoidales, semejantes a

las del género *Mycobacterium* y *Corynebacterium* (77).

**2.1.1.2 Fermentación de azúcares:** *N. brasiliensis* utiliza hidratos de carbono como fuente de energía para lo cual posee la propiedad de fermentar algunos azúcares (por ejemplo; D-arabinosa, D-fructosa, glucosa, glicerol, manosa, sorbitol y trehalosa) así como de hidrolizar algunas proteínas y sus derivados (por ejemplo, esculina, gelatina, caseína, hipoxantina, queratina, tirosina y urea), esto es sin la producción de gas, (126). Los cultivos de *N. brasiliensis* tienen la característica de emanar un olor a tierra mojada, el cual es dado por las germinas, las cuales corresponde a compuestos cíclicos derivados de los procesos fermentativos (141).

Bourgeois y Beaman (19) reportaron que en presencia de glicina, liozima y D-cicloserina , así como la combinación de éstos se favorece la formación de esferoplastos para *N. asteroides*, *N. cavie* y *N. brasiliensis*, ellos mencionaron que la combinación de liozima y D-cicloserina fue más efectiva que las otras combinaciones, el análisis por microscopia evidenció la presencia de esferoplastos y protoplastos, además de observar la presencia de formas “L” cuando los medios fueron hipotónicos.



El grupo de especies bacterianas incluidas en el género *Nocardia* se encuentra estrechamente relacionado con varios géneros de actinomicetos que contienen ácidos-micólicos tales como *Corynebacterium*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*, así como aquellos microorganismos con alto contenido de ácido meso-diaminopimélico, arabinosa, galactosa, catalasa, ácido 10-metilestéarico y menaquinona tetrahidrogenada con nueve unidades de isopreno (77). El porcentaje en promedio de los rangos de DNA en guanina y citosina que contiene es de 64 a 72% (126).

## **2.2 Infección (Micetoma):**

**2.2.1 Etiología de Micetoma:** Existen aproximadamente 26 agentes causantes de micetoma entre los cuales los eumicetos (hongos verdaderos) y los actinomicetos (bacterias aeróbicas) son los responsables. De los géneros *Nocardia* y *Actinomadura* las especies patógenas más comunes son *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. cavie*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*, los cuales en conjunto constituyen cerca del 98%

del total de las bacterias causantes de Micetoma en México (32 y 35).

En el grupo de bacterias intracelulares obligatorias o facultativas una variedad de bacterias altamente patógenas es representada por los géneros *Mycobacterium*, *Listeria*, *Corynebacterium* y *Nocardias*, que son algunos géneros bacterianos clásicos que producen enfermedades crónicas en el hombre.

Las Nocardias, producen diferentes enfermedades en el hombre, por un lado el micetoma que afecta la piel y tejido subcutáneo y por otro la nocardiosis que se manifiesta en forma generalizada o diseminada preferencialmente en el cerebro (1), esta última se presenta principalmente en pacientes con enfermedades metabólicas, inmunosuprimidos, enfermos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1), lo cual nos sugiere que un estado de inmunodeficiencia o inmunosupresión favorece el establecimiento y desarrollo de la infección por *N. asteroides*. Actualmente existe tratamiento que favorecen la resolución de la infección de microorganismos causantes de nocardiosis o micetoma, (147). Las tres especies más comúnmente aisladas en hombres y animales son *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. cavie* (*N. otitiscaviarum*) y en peces *N.*

*seriole* y *N. cassostrae* (90).

**2.2.1.1 Incidencia:** La frecuencia del micetoma en base al sexo es de cuatro hombres por una mujer, los cuales corresponden comúnmente al grupo de pacientes entre los veinte y cuarenta años de edad. La localización más frecuente de la infección es en las extremidades inferiores seguida del tórax y dorso, no existe un lugar específico pero aunque no se disemina a órganos puede encontrarse ocasionalmente en pericardio (26).

## **2.2.2 Diagnóstico de la infección:**

**2.2.2.1 Diagnóstico serológico:** Las infecciones causadas por microorganismos del género *Nocardia* suelen ser de difícil diagnóstico, en el caso de micetoma actinomicótico por *N. brasiliensis* el análisis es lento, ya que se confirma con la elaboración de un cultivo y caracterización del agente causal, lo que requiere de aproximadamente dos a tres semanas de incubación además de sumar pruebas diferenciales entre *Nocardias* y otros

TABLA 1

Criterios de evaluación del micetoma experimental en  
ratones BALB/c

Evaluación	Datos clínicos macroscópicos del micetoma experimental
+	Inflamación mayor de 5 mm
++	Inflamación, focos ulcerativos y microabscesos
+++	Inflamación, úlceras y gránulos purulentos.
++++	La presencia de necrosis sumada a los datos clínicos anteriores y/o mutilación del miembro

Datos obtenidos de. SALINAS-CARMONA ( 120)

agentes causales, tales como *Mycobacterias*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Sporotricosis*, *Actinomicosis* o tumores de hueso y tejido blando (109).

Biehle y col., en 1996 (16), reportaron un nuevo método para la identificación de especies del género *Nocardia*, en este trabajo estudiaron la degradación de diferentes substratos cromógenos comerciales, y analizaron 85 cepas de *Nocardia* que correspondieron a cinco especies, todas fueron

identificadas previamente por métodos de rutina. El resultado de este trabajo fue que *N. farcinica* y *N. nova* hidrolizaron la L-pyrrolidinoil- $\beta$ -naftilamida (PYR), mientras que *N. brasiliensis* fue la única especie que hidrolizó el  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-manopyranosido (MNP), todas las demás especies en estudio fueron negativas a la hidrólisis del fosfato de indoxilo, *N. nova* y *N. asteroides* sensu stricto fueron siempre negativas a todos los substratos. Con estos resultados los autores sugieren que la presencia de algunas enzimas que diferencian a las especies del género *Nocardia* facilitan la identificación más rápidamente que los métodos de identificación convencionales.

Salinas-Carmona y col.. En 1992, reportaron que existen 3 proteínas inmunodominantes en un ensayo de inmunoelectrotransferencia (Western-blot), la P61, P26 y P24. Vera, Salinas y Welsh aislaron dos de las tres proteínas inmunodominantes de *N. brasiliensis*; la P24 y P26 con las cuales Casillas y Salinas-Carmona, desarrollaron un método inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico rápido, específico y reproducible de la presencia de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* en pacientes con micetoma (119, 122 y 145).

*N. brasiliensis* es una bacteria intracelular facultativa capaz de sobrevivir y continuar su crecimiento dentro o fuera de las células polimorfonucleares o macrófagos; se ha propuesto que algunos microorganismos tales como *M. tuberculosis*, son capaces de evadir la respuesta inmune no específica (macrófagos), por medio de la inhibición de la fusión fago-lisosoma en las células que fagocitaron dicho microorganismo ó que éstas sean capaces de sintetizar enzimas que neutralicen la toxicidad de los radicales de oxígeno, tales como la oxidorreductasas e hidrolasas. (8,14 y 62) Este fenómeno se ha observado en otras infecciones causadas por bacterias del género *Mycobacterium* (43 y 89). En el caso de *M. leprae* se ha observado que estas bacterias se encuentran provistas de una cubierta resistente a la acción de las enzimas localizadas en los lisosomas; por lo cual pueden salir del fagosoma y permanecer dentro del citoplasma de la célula (115). Beaman y col, en 1988, encontraron con *N. asteroides* GUH-1 la propiedad de inhibir la fusión fago-lisosoma en fagocitos por posibles mecanismos de acidificación que evitan la toxicidad de los radicales liberados en el metabolismo respiratorio y poder así unirse, adherirse, penetrar y/o crecer dentro de la célula (14).

El gen que codifica para la catalasa-peroxidasa de varias especies del género *Mycobacterium*, actualmente se ha clonado en un vector referido como pMD31 y se han evaluado los métodos de mayor eficiencia y simplicidad en la transformación de estas bacterias (31,37, 63, y 64), que debido a su pared celular esto resulta ser complicado. Actualmente se han reportado trabajos de transformación de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, en los cuales la actividad de catalasa se encuentra ausente por mutación espontánea o inducida y esta ha sido restaurada parcial o totalmente por el gen KAT-G(71, 91, 94, 150 y 151).

El análisis genético de transformación de *Mycobacterias* con alteración en el gen que codifica para catalasa-peroxidasa (KAT-G), ha mostrado que restaura la susceptibilidad a drogas por el vector, dando un papel definido del gen KAT-G en determinar los niveles de susceptibilidad a isoniazida así como la correlación inversa entre la resistencia a drogas y la virulencia en cobayos (7, 44, 66 y 128).

Los mecanismos de patogenicidad y de resistencia a la infección por *N. brasiliensis* no son bien conocidos, Salinas-Carmona y col, reportaron la

presencia de un grupo de proteínas con actividad caseinolítica que podrían estar involucrados en el mecanismo de daño o contribuir a la virulencia en la infección por *N. brasiliensis*. Licon evaluó las propiedades inmunogénicas de esta proteína, obteniendo una pobre respuesta de anticuerpos en un modelo experimental (78 y 118).

**2.2.2.2 Factores de virulencia:** Se conocen factores de virulencia que son característicos de cada especie, éstos favorecen la habilidad de colonizar y causar enfermedad, a su vez facilitan la invasión y actúan como inductores de toxicidad. Específicamente son representados por bacterias que contienen, cápsula, pili, fimbrias, adhesinas, exotoxinas, endotoxinas y exoenzimas, de las cuales las más relevantes son hialuronidasa, fibrinolisin, hemolisinas, coagulasas, catalasas, proteasas, DNAsa y RNAsa (estas últimas tres que actúan inespecíficamente) (28, 102, 113, 139 y 143). En la tabla 2 se muestra algunas de las enzimas reportadas en el género de *Nocardias*.



TABLA 2

Enzimas reportadas en el género *Nocardia*

ENZIMA	BACTERIA	REFERENCIA
Catalasa	<i>N. asteroides</i> <i>N. brasiliensis</i>	Sandoval 1983 (124) Vera 1992 (144)
Fosfatasa ácida Superóxido dismutasa	<i>N. asteroides</i>	Jiménez-Zlotnik 1988 (30) Alcendor 1995 (3)
Fosfatasa alcalina	<i>N. brasiliensis</i>	Jiménez-Zlotnik 1988 (65)
Hemolisina	<i>N. asteroides</i> <i>N. brasiliensis</i>	Sandoval 1993 (124)
$\beta$ -Lactamasa	<i>N. brasiliensis</i>	Sandoval 1993(124)
Proteasa caseinolítica	<i>N. brasiliensis</i>	Salinas 1992(118)

**2.3. Histopatología del Micetoma:** Hasta ahora solo se han mencionado algunos hallazgos que apoyan la participación de la respuesta inmune celular, así como la no-participación de la respuesta inmune humoral en el micetoma, sin embargo a nivel microscópico existen algunas diferencias celulares que hacen característica la lesión causada por *N. brasiliensis*.

**2.3.1 Lesión brasiliensis:** Folb y col, (45) en 1976, establecieron un modelo experimental de micetoma con ratones blancos Swiss infectados con *N. asteroides* y *N. brasiliensis* con adyuvante incompleto de Freund. En este estudio se describió la Histopatología de las lesiones producidas por las Nocardias y encontraron que la típica lesión producida por *N. brasiliensis*, se caracteriza por la presencia de microorganismos que son rodeados por macrófagos vacuolados, histiocitos y una capa externa de fibroblastos recubiertos por material hialino. A esta lesión encontrada en ratones infectados con *N. brasiliensis* se le denominó “lesión tipo brasiliensis”. En cambio los ratones infectados con *N. asteroides* presentaron lesiones similares pero con ausencia de microorganismos intracelulares en macrófagos y ausencia de material hialino en la periferia de la lesión. Esta lesión fue referida como “lesión tipo asteroides”.

## **2.4 Respuesta Inmune:**

**2.4.1 La respuesta inmune celular en respuesta a la infección por *N. brasiliensis*:** La importancia de la respuesta inmune celular mediada por

linfocitos T fue demostrada por Folb y col. En 1977 (46) ellos publicaron el desarrollo de micetoma en un modelo experimental de ratones infectados con *N. asteroides* y *N. brasiliensis* respectivamente. Dichos autores utilizaron ratones inmunocompetentes (BALB/c, C57BL/6 y C3H) y ratones atímicos (BALB/nu+, C57BL/nu+ y C3H/nu+) los cuales fueron infectados con bacterias vivas, estos investigadores observaron que la mortalidad para los ratones atímicos fue del 100% a los 28 días de la infección, a diferencia de los ratones inmunocompetentes donde no se observó mortalidad. Estos mismos autores encontraron que a pesar de utilizar cepas de ratones con fondo genético diferente no encontraron diferencias en los hallazgos histopatológicos de las lesiones con ambas bacterias. Otro grupo de investigadores encabezado por Deem, reportaron en 1982 (36) la participación de LT en los mecanismos de resistencia a la infección con *N. asteroides* y también demostraron la capacidad de los LT reactivos a *N. asteroides* puede ser transferida a ratones atímicos, al mismo tiempo que los LT pueden activar a los macrófagos in vitro. El aumento a la resistencia a la infección en ratones atímicos reconstituidos con LT apoya la importancia de estas células en la defensa del huésped contra infecciones por *N. asteroides* (13, 36 y 73).

#### **2.4.1.1 Transferencia pasiva de inmunidad específica para *N.***

***brasiliensis***: La respuesta inmune humoral se ha estudiado en modelos experimentales de ratones que previamente hemos reportado (120). En este modelo estudiamos el efecto de un suero hiperinmune, obtenido de ratones BALB/c inmunizados con *N. brasiliensis* muerta por calor, este suero al ser transferido a ratones sanos y posteriormente infectados con *N. brasiliensis*, evitó el establecimiento y desarrollo de la infección, a diferencia de otros ratones que recibieron suero de otra especificidad, tanto homólogo como heterólogo. Ahora sabemos por estos mismos investigadores que entre los sueros que utilizaron para evaluar la respuesta inmune humoral, las interleucinas Th2 y específicamente el IFN $\gamma$  juegan un papel importante en el establecimiento y desarrollo de la infección por *N. brasiliensis* (121).

#### **2.4.2 La respuesta inmune humoral en respuesta a la infección por**

***N. brasiliensis***: Beaman y col, en 1982 (13) evaluaron el papel del linfocito B (LB) en la resistencia a la infección con *N. asteroides* en ratones F1(CBA/N X DBA/2), y deficientes en LB, ellos demostraron que existían niveles muy bajos de IgM e IgG3 como resultado del defecto en LB para proliferar en presencia de mitógeno (129 y 130), pero con respuesta inmune

normal para LT. La infección clínica no fue más grave en ratones hembras que en ratones machos. Con estos datos los autores sugirieron que los anticuerpos no participan en la resistencia a la infección por *N. asteroides*. En 1982 Rico y col, reportaron que en ratones inmunocompetentes y atímicos, el efecto de la transferencia pasiva del suero anti-*N. brasiliensis* en el desarrollo de micetoma no logró conferir protección en ningún grupo de ratones, por el contrario los anticuerpos (suero de ratón) favorecieron la infección y agravaron el daño óseo, comparados con los ratones que no recibieron suero (108).

**2.4.2.1 Anticuerpos protectores en respuesta a la infección por *N. brasiliensis*:** Los mecanismos de patogenicidad y de resistencia a la infección por *N. brasiliensis* no son bien conocidos (55 y 56). Salinas-Carmona y col., en 1992 (118), reportaron la presencia de un grupo de proteínas con actividad caseinolítica, las cuales podrían estar involucradas en el mecanismo de daño o contribuir a la virulencia en la infección por *N. brasiliensis*, utilizando un análisis por zimograma, identificaron la presencia de actividad caseinolítica en cultivos sólidos de *N. brasiliensis*, además de evidenciarlas en un gel de poliacrilamida por el mismo método. Posteriormente Licon-Trillo en 1997, estudió la inmunogenicidad de estas

proteasas así como su efecto inductor en el desarrollo del micetoma experimental en ratones BALB/c, él semipurificó las proteasas y determinó la respuesta de anticuerpos y su efecto en la inducción del micetoma. Los resultados mostraron que el suero de ratones inmunizados con proteasa mas AIF evitó al 100 % el desarrollo del micetoma a diferencia de los ratones que recibieron la proteasa por inmunización pasiva y sin adyuvante (78).

**2.5 Actividades enzimáticas como factores de virulencia:** Las proteínas con actividad de catalasa han sido relacionadas directa o indirectamente con otras enzimas que participan en la eliminación de radicales libres generados en el metabolismo de células tanto eucariotas como procariotas (142), estos radicales son el ión superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y los iones de cloruros ( $Cl^-$ ), además de  $H_2O_2$ , que en presencia de un sustrato reaccionan para generar moléculas de agua como producto final. La superóxido dismutasa (SOD) y catalasa se han relacionado como posibles factores de virulencia en diferentes microorganismos, a saber: *Listeria monocytogenes* (33 y 34), *Toxoplasma gondii* (131), *Coxiella burnetii* (4), *Caulobacter crescentus* (125 y 133), *Bacillus subtilis* (61), *Bordetella pertussis* (69), *Staphylococcus aureus* (29 y 114), *Streptococcus spp.*(148), *Escherichia coli* K-12 (85, 104 y 140),

bacterias del género *Mycobacterium* (40, 152 y 183), diferentes especies del género *Plasmodium* (41 y 127) y bacterias del género *Nocardia* (3 y 12).

En el género *Nocardia* no se ha establecido una relación directa de estas proteínas como factor de virulencia. Visica y Beaman en 1983 (143) reportaron el aislamiento de dos cepas mutadas de *N. asteroides* GUH-2, en las cuales a diferencia de la cepa silvestre (wild-type), la morfología de las colonias así como el contenido de ácidos grasos fue distinta para las tres cepas, ellos reportaron además que esta diferencia de ácidos grasos dependía del tiempo de cultivo, cuando cada una de las cepas mutadas fue inyectada en ratones a diferentes tiempos observaron que solo las bacterias que no fueron cultivadas más de 28 h fueron menos virulentas que la cepa silvestre. Más tarde en 1985 Beaman y col., reportaron dos enzimas con posible papel en la patogénesis por *N. asteroides*, la SOD y la catalasa fueron estudiadas *in vitro* y su papel en la resistencia a los factores microbicidas del PMN humanos. Ellos observaron que en cultivos en fase logarítmica (log) esta bacteria, fue más virulenta después de 180 min de incubación comparada con una cepa menos virulenta (*N. asteroides* 10905), además los PMN no fueron capaces de matar las bacterias cuando se encontraban en fase estacionaria, en esta fase *N. asteroides* GUH-2 presentó

diez veces más actividad de catalasa que la cepa menos virulenta. En este mismo trabajo reportaron un experimento con una cepa mutada de *N. asteroides* GUH-2 (SCII-C), ésta fue protegida de la acción bactericida del PMN cuando fue adicionado al medio superóxido dismutasa (SOD), por lo cual después de la adición de la enzima ésta mostró ser una cepa más virulenta que la cepa silvestre, pero solo si la bacteria era catalasa positiva (11).

Por otro lado un anticuerpo monoclonal fue desarrollado por Beaman en 1990 (12), el cual fue evaluado para evitar la acción de los mecanismos de muerte oxidativa en PMN de ratones, ellos realizaron una incubación *in vitro* de *N. asteroides* en presencia y ausencia de SOD, posteriormente un cultivo en fase log fue preparado como inóculo infectante, el estudio lo realizaron a diferentes tiempos post-infección y evaluaron la presencia de bacterias en diferentes órganos (cerebro, riñón, bazo, pulmón e hígado), ellos reportaron que el tejido cerebral, hígado y pulmones de ratones que recibieron bacterias mas anticuerpo monoclonal contra SOD, mostró menos UFC en cada órgano comparado con el control negativo, con este estudio se mencionó que el anti-SOD monoclonal favorece un mecanismo de resistencia a los mecanismos oxidativos de los PMN del ratón y que si este



anticuerpo se fija a la pared de la bacteria se trataba entonces de una proteína periplásmica que juega un papel importante en la patogénesis de *N. asteroides*.

Alcendor y col., en 1995 (3), reportaron el aislamiento, secuenciación y expresión de la SOD de *N. asteroides* GUH-2, en este trabajo partieron de la construcción de una biblioteca genómica de *N. asteroides* GUH-2 y utilizaron una sonda obtenida del gen de la SOD de *M. tuberculosis*. El gen completo que codifica para la SOD de *N. asteroides* se encuentra clonado en *pYEX1* y lograron expresar la enzima cuando transformaron *E. coli* mutada en SOD-A y SOD-B, en presencia de paraquat como estimulante para la producción de radicales  $O_2^\bullet$ .

En otro estudio Beaman reportó que los niveles de fosfatasa ácida lisosomal se modificaron cuando PMN fueron infectados con *N. asteroides* y que este fenómeno podía ser una causa para favorecer el crecimiento de *Nocardia* intracelularmente en PMN (14).

Felice y col, reportaron, que fagocitos infectados con *Nocardia asteroides*, no fueron capaces de matar a las bacterias después de 4 horas de

incubación, ellos evaluaron por quimioluminiscencia la presencia de los metabolitos oxidativos generados en la reacción microbicida de la célula fagocítica, ellos reportaron la presencia de moléculas de reacción oxidativa a pesar de lo cual no había acción microbicida, por lo que los autores sugieren que *N. asteroides* posee alguna molécula que evita la acción bactericida a pesar de presentarse los compuestos oxidantes (42).

En 1999 Vera y col., reportaron que la P61 de *N. brasiliensis* de la cepa HUJEG-1 posee actividad de catalasa, además reportaron la secuencia aminoacídica y nucleotídica parcial de algunos fragmentos de esta proteína, la relación de estas secuencias corresponde a catalasas de eucariotes pero no de procariotes, ellos publicaron que esta proteína no posee actividad de peroxidasa. (145)

Actualmente no se conoce el papel de la actividad de catalasa como factor de virulencia en la inducción del micetoma inducido por *N. brasiliensis*.

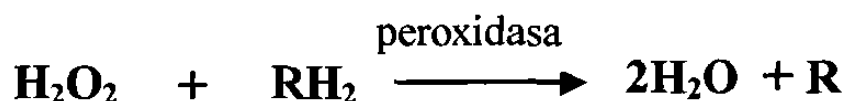
Odenbreit y col, en 1998 (99), reportaron la presencia de un gen que codifica para una catalasa de *Helicobacter pylori* y esta a su vez actúa

como adhesina del microorganismo sobre células epiteliales, el gen que codifica para esta proteína se clonó para expresarla en células eucarióticas y procarióticas, además se reportó que presenta cierta homología con el gen que codifica para catalasa de *Bordetella pertussis* (64.9%), *Bacteroides fragilis* (59.8%) y *Haemophilus influenzae* (57.9%).

**2.5.1 Actividad de Catalasa:** Las reacciones catalizadas por la catalasa son uno de los más potentes mecanismos de degradación que se fundamentan en la oxido-reducción, este tipo de reacciones es crucial para la vida, ya que no permiten el almacenamiento de compuestos tóxicos para las células. Como se mencionará en breve, esta enzima utiliza dos moléculas de peróxido de hidrógeno como substrato, que se considera un agente oxidante y lo degrada en agua y oxígeno molecular. El oxígeno molecular liberado en esta reacción se utiliza en la oxidación de toxinas, incluyendo fenoles, ácido fórmico, formaldehídos y alcoholes (49).



Las catalasas son enzimas que contienen grupos hem con un centro de hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) como sitio activo y actúan por un proceso de óxido-reducción (redox), esta enzima se encuentra en altas concentraciones en compartimentos celulares llamados peroxisomas. En algunos organismos puede encontrarse en forma bifuncional, ya que además puede actuar con actividad de peroxidasa, esta última función evita el acumulamiento de compuestos tóxicos  $\text{RH}_2$  (Radical- $\text{H}_2$ ), derivados de las vías metabólicas de la célula. La reacción de peroxidasa es la siguiente (54).



**2.5.2 Clasificación de las catalasas:** Las catalasas son metaloproteínas, su nombre deriva del griego “kata”, que significa separador en partes y aplicado en biología significa que libera energía. Estas proteínas se encuentran agrupadas bioquímicamente como oxidorreductasas (E.C.1.11.1.6;  $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ , CAT). Actualmente son aceptadas tres familias de genes que codifican para las proteínas con actividad de catalasa (70).

**2.5.2.1. Catalasas/peroxidasas o HPI**, estas proteínas con actividad de catalasa se han encontrado principalmente en procariotes, corresponden al grupo de catalasas bifuncionales (catalasas/peroxidasas), hasta 1996 solo se conocían seis secuencias completas en Gene Bank de estas proteínas, este grupo de enzimas son codificadas por el gen HPI (70). Hay dos isoenzimas de HPI, HPI-A y HPI-B las cuales poseen diferentes densidades de sedimentación y son codificadas por el mismo gen (59).

**2.5.2.2 Catalasas verdaderas o HPII**, estas proteínas enzimáticas se encuentran en todas las células eucariotas y en algunos procariotes, además corresponden al grupo de catalasas monofuncionales y son codificadas por el gen HII (21, 80 y 81).

**2.5.2.3. Catalasas dependientes de Mn**, poco se conoce acerca de este grupo de catalasas, sin embargo se han relacionado con pseudocatalasas que en común dependen de Mn (70).

Las catalasas y sus diferentes clases juegan un papel crucial en las reacciones de oxidación, éstas generan intermediarios como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ),  $H_2O_2$  y radical  $OH^{\bullet}$ , los cuales al almacenarse o aumentar

su concentración citoplasmática dañan a proteínas, ácidos nucleicos y membrana celular, y estos radicales pudieran a su vez contribuir a muchas enfermedades. Estudios recientes sugieren que el efecto de estos oxidantes se encuentra estrechamente unidos al daño causado por ácido hipocloroso (HOCL) y los intermediarios del óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), peroxinitrito (HOONO) y nitrosotiol (RSNO). Debido a las diferentes fuentes de radicales que participan en la oxidación, es inevitable que los microorganismos que son aerobios, liberen radicales como el O<sub>2</sub><sup>•</sup> y/o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los cuales son liberados de cualquier molécula portadora de oxígeno (49).

Lowen y col., en 1985 analizaron en cepas mutadas de *E. coli*, la expresión del gen de la catalasa en el ciclo de crecimiento, observaron que los niveles de HPI aumentaron gradualmente alrededor de dos veces durante la fase logarítmica de crecimiento pero no aumentaron en la fase estacionaria. Por otra parte HPII no mostró cambios en la fase logarítmica pero aumentó diez veces la actividad de catalasa durante la fase estacionaria, por lo cual se dedujo que estos genes son inducidos independientemente (80 y 81).

Más tarde Felice en 1990 reportó la resistencia a la muerte intracelular dependiente de oxígeno de *N. asteroides* por células fagocíticas. Sus experimentos se basaron en la incubación previa de *N. asteroides* a metabolitos como peróxido de hidrógeno, lactoperoxidasa, radicales hidroxilo además de ion superóxido, comparándolo con *Staphylococcus aureus*. El resultado de sus experimentos reveló que *N. asteroides* poseía 2.8 veces más catalasa que *S. aureus* y los niveles de SOD en ambas bacterias fue similar, posteriormente al inhibir la actividad de catalasa con azida de sodio mostró una disminución en la resistencia a metabolitos oxidativos, ellos sugirieron que la resistencia a la muerte celular por fagocitos puede estar relacionada con los niveles de catalasa. (43)

En 1999 Motho-Norihiro y col., reportaron la presencia de una catalasa de *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) la cual resultó ser más resistente a concentraciones de 500 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comparada con una mutante sin actividad de catalasa que resultó ser resistente solo a concentraciones de 6 mM. Estos estudios indican que la toxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un factor importante en la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la catalasa de *S. pombe* y que a su vez esto juega un papel importante en la resistencia a concentraciones elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (97).

Bubert A. y col, (23) en 1997, aislaron de líquido de ascitis de pacientes con listeriosis una cepa de *Listeria monocytogenes* que dio negativa la reacción de catalasa, sin embargo la actividad de la enzima se restauró al subcultivar in vitro la cepa. Este estudio mostró que aparentemente la catalasa no es un factor de virulencia en este microorganismo.

Kelly y col, en 1998 reportaron la restauración de actividad de catalasa en una cepa de *M. tuberculosis* H37RvINHR (INHR referente a la ausencia de catalasa) con genes de *M. tuberculosis* H37Rv (*Tbkat-G*) y *M. intracellulare* (*Makat-G*). Estas cepas transformadas fueron posteriormente inyectadas en ratones BALB/c y evaluaron el papel de las cepas catalasa/peroxidasa en diferentes órganos encontrando que al restaurar la actividad las clonas transformadas fueron resistentes a la INH in vitro y en ratones la infección fue diseminada (71).

Algunos factores de virulencia importantes de los microorganismos fueron mencionados anteriormente, el papel de las enzimas producidas por *Nocardia brasiliensis* en el desarrollo de micetoma no ha sido estudiado,



del grupo de enzimas más relevantes que se encuentran expresadas en *Nocardia brasiliensis* se encuentra una proteasa (118), a la fecha solo se ha reportado una catalasa (144) y una fosfatasa ácida (65). Existen factores que limitan la manipulación para el análisis genético, de la familia de Actinomycetales (*N. brasiliensis*), éstos pueden ser bioquímicos, microbiológicos y/o inmunológicos. Un factor importante es que contienen un alto contenido de ácidos grasos y compuestos orgánicos complejos que evitan el acceso a la purificación de material genético o traspasar la pared celular para la obtención de proteínas (47, 132 y 137). Para muchos microorganismos se han utilizado clonas mutadas, ya sea inducidas con algún agente físico o químico otra forma es la obtención de clonas mutadas en forma espontánea considerando que la frecuencia de mutación promedio para algunas bacterias es de  $1 \times 10^{-9}$  (82 y 134), estos modelos experimentales han favorecido ampliamente la aplicación de herramientas de la Biología Molecular para entender el mecanismo y regulación de muchas moléculas, entre las que se encuentran las enzimas y aquellas proteínas que confieren resistencia a antibióticos (50, 57, 58 y 84). Cabe mencionar que KAT-G de los géneros *Mycobacterium* y *Escherichia*, han sido ampliamente estudiados ya que parecen ser el punto de partida para el estudio de catalasas involucradas como factores de virulencia (96,104 y

150). Estudios reportados por Zhang y col. en 1992, reportaron que KAT-G es un factor de virulencia de *M. tuberculosis* pero esto no sucede en *E. coli* (151). Posteriormente otro grupo de investigadores reportaron que la presencia de catalasa/peroxidasa de *M. tuberculosis* tiene la propiedad de activar a la pro-droga INH, la cual actúa sobre la pared celular en la síntesis de ácidos micólicos y al nivel de la formación de compuestos enóilos, los cuales no posee *E. coli* (115 y 128).

Con lo anteriormente mencionado, la obtención de una mutante que tenga alterada una o varias de las propiedades enzimáticas de *N. brasiliensis*, nos servirá experimentalmente para entender los posibles mecanismos de virulencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en el desarrollo del micetoma.

## **CAPITULO 3**

### **HIPOTESIS**

La actividad de catalasa de *Nocardia brasiliensis*  
HUJEG-1 es un factor de virulencia en la inducción del  
micetoma experimental en ratones BALB/c

## **CAPITULO 4**

### **4.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Estudiar la actividad de catalasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 en  
la inducción del micetoma experimental  
en ratones BALB/c.

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener clonas mutadas no inductoras de micetoma a partir de *N. brasiliensis* HUJEG-1.
2. Identificar la actividad de catalasa en las clonas de *N. brasiliensis* que no inducen micetoma.
3. Transformar una clona mutada de *N. brasiliensis* HUJEG-1 catalasa negativa, con un vector portador del gen de la catalasa de *Mycobacterium tuberculosis*.
4. Determinar la actividad de catalasa en las clonas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 transformadas.
5. Evaluar la inducción de micetoma con las clonas transformadas con el vector del gen de la catalasa, en ratones BALB/c.

## CAPITULO 5

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1 Material Biológico.

**5.1.1 Ratones BALB/c:** En este trabajo se utilizaron ratones BALB/c machos y hembras entre 9 a 12 semanas y un peso en el rango de 25 a 35 g. Estos ratones fueron obtenidos del bioterio de la colonia del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina UANL. Esta cepa es derivada de una cepa original de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica NIH, BETHESDA, MD. EUA. Los ratones fueron alimentados con Purina y agua estéril suplementada con complejo vitamínico de uso veterinario. En todos los experimentos de inducción de micetoma se utilizaron grupos de 10 ratones.

### 5.1.2 Cepas Bacterianas.

**5.1.2.1 *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.** Esta cepa fue aislada de un paciente en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a cargo del Dr. Oliverio Welsh Lozano. La identificación fue realizada en el Departamento de Microbiología por el Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla y confirmada por June Brown del Centro de Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta GA. EUA. Actualmente se encuentra registrada en la ATCC con el número 700358. Esta cepa se mantiene en medios de cultivo de agar dextrosa Sabourad.

**5.1.2.2 Clonas mutadas de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1:** estas clonas fueron obtenidas posterior al tratamiento con EMS (etilmetano sulfonato) y mantenidas en placas estériles conteniendo BHI-agar al 2%.

**5.1.2.3 *E. coli* XL-1 Blue:** La cepa bacteriana fue donada por el Ph. D. Ying Zhang del laboratorio de Micobacterias de la Johns Hopkins University en Baltimore MD. EUA.

**5.1.3 pKAT-G:** El vector portador del gen que codifica para una catalasa de *M. tuberculosis* fue gentilmente donado por Ph D. Brigitte Saint-Jones, del laboratorio de Microbiología en el Instituto Pasteur, Francia (117).

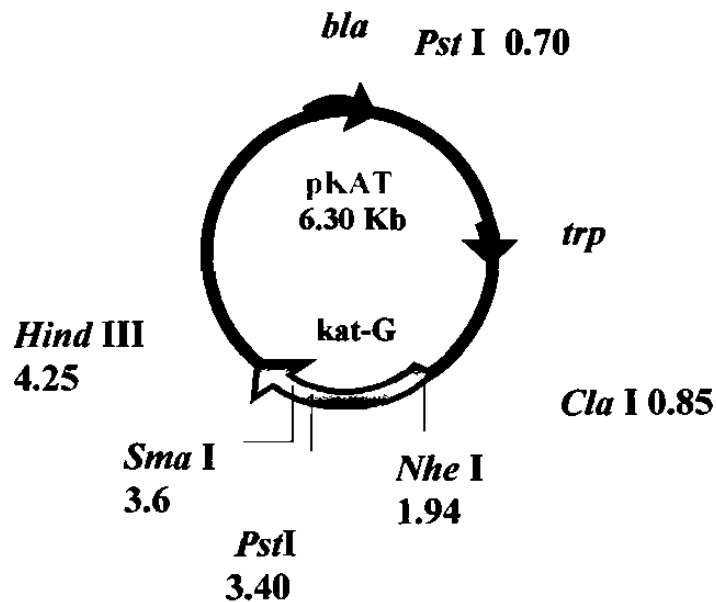


Figura 1: Mapa de restricción de pKAT-G. Promotor de triptofano (*trp*), río abajo el gen de KAT-G que codifica para la catalasa de *M. tuberculosis* y un marcador para resistencia a la ampicilina (*bla*). Se señalan los principales sitios de corte con enzimas de restricción.

**5.1.4 Enzimas de restricción:** Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de las casas comerciales New England BioLab



La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental  
Inc. (Beverly, MA. EUA) y Gibco-BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD. EUA), las enzimas fueron utilizadas acorde a las indicaciones de la casa comercial correspondiente.

**5.2 Reactivos:** Los reactivos utilizados en la preparación de amortiguadores de electroforesis (agarosa y poliacrilamida), obtención de extractos proteicos, mutagénesis y reactivos para la determinación de la actividad de catalasa, fueron de Sigma-Aldrich Inc. Los reactivos para la preparación de medios de cultivo se adquirieron en Bioxon de México S.A. de C.V. y Difco Laboratories Detroit. MI. EUA.

**5.3 Equipo:** El equipo de electroporación de Cell-Porator System, Life Technologies, fue facilitado por la Dra. Herminia G. Rodríguez Martínez, jefe del laboratorio Celular en la ULIEG del departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina, UANL. El equipo de Bio-Rad GenePulser II System, fue facilitado por el PhD Ying Zhang jefe del laboratorio de Mycobacterias en la Johns Hopkins University Baltimore, MD, EUA. El espectrofotómetro de diodos utilizado se adquirió de la casa comercial Beckman, modelo DU-7500.

#### **5.4 Material para la obtención de la sonda y marcaje radioactivo:**

Para la obtención de la sonda a partir del gel de agarosa, se utilizó un método comercial de extracción, Qiagen Plasmid Midi/Maxi, las condiciones de extracción se realizaron según el protocolo recomendado por la casa comercial. La sonda obtenida a partir de KAT-G se marcó con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P, siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial, Random Primers DNA Labeling System (Life-Technologies).

**5.5 Material de vidrio y desechable:** El material de vidrio y desechable fue adquirido en la casa comercial Scientific Product, Merck.

#### **5.6 Métodos.**

##### **5.6.1 Preparación de *E. coli* XL-Blue calcio competentes (10 y 123):**

A partir de una placa de petri con medio LB-agar se colocó una colonia en un tubo de vidrio con 4 mL de medio LB y se dejó a 37°C en agitación vigorosa (650 rpm) por toda la noche. Un matraz de 500 mL se inoculó con 0.5 mL del cultivo previo y se dejó en incubación a 37°C en agitación, siguiendo el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica a 600 nm

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental en el espectrofotómetro, hasta obtener una densidad de 0.3, principio de la fase exponencial del crecimiento. El matraz se colocó a 4°C por 10 min y se decantaron en un tubo Falcon de 50 mL, previamente frío y estéril. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm/5 min y el sobrenadante se desechó, se lavaron dos veces con agua estéril y la pastilla final se resuspendió en 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, se dejó incubar 20 min en hielo, después del tiempo la suspensión bacteriana se centrifugó a 5000 rpm/5min y se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Las células se conservaron a -70°C.

**5.6.2 Preparación de células electrocompetentes (10 y 123):** Los cultivos para obtener células electrocompetentes de *E. coli* XL-Blue y NbC68, se hicieron como se mencionó anteriormente, solo que se resuspendió en agua desionizada estéril.

**5.6.3 Obtención de inóculo infectante:** El procedimiento utilizado para la obtención de inóculo bacteriano infectante se realizó en las mismas condiciones experimentales para la *N. brasiliensis* HUJEG-1 de referencia como para las clonas mutadas y clonas transformadas utilizadas en este trabajo. A partir de un cultivo bacteriano se inocularon matraces

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental conteniendo 50 mL de caldo BHI estéril, en cada uno se aplicó una colonia bacteriana, se incubaron en baño María a 37°C, con una agitación a 600 rpm (GCA/Precision Scientific) en un tiempo de 12 y 24 h, la masa bacteriana obtenida se transfirió a tubos de 50 mL de polipropileno (Corning SP, 21008-730) y se centrifugaron por 10 min. a 3,000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5810R) a 4°C, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se lavó dos veces con solución salina estéril al 0.85 % (p/v), el paquete celular se resuspendió en un volumen final de 5 a 10 mL. Los grumos bacterianos se disgregaron con un homogenizador Potter-Elvehjem (SP, cat.# KT885500-0019), la suspensión bacteriana se dejó reposar 30 min y del sobrenadante se determinó la DO a 325 nm, la dosis infectante se ajustó con diluciones en solución salina estéril para *N. brasiliensis* HUJEG-1 y fue de  $1 \times 10^6$  bacterias en 0.1 mL, para las clonas mutadas se utilizaron además dosis alta ( $1 \times 10^{11}$  bacterias/0.1mL) y dosis bajas ( $1 \times 10^2$  bacterias/0.1 mL) para las clonas transformadas se utilizó solo la dosis infectante de la cepa de referencia.

**5.6.4 Obtención de la LD<sub>50</sub> del EMS:** Se preparó una solución estándar del EMS a una concentración de 2 mg/ml, en PBS 0.1 M estéril. El rango de concentraciones que se utilizaron en este trabajo fue de 0 a 200

$\mu\text{g/mL}$  disueltos en el medio de cultivo BHI estéril. El tratamiento de las bacterias con el EMS se llevó a cabo en una serie de tubos de 15 mL (SP, Corning, cat # 21008-670), cada tubo contenía 4 mL de caldo BHI, 0.1 mL de una suspensión bacteriana con  $1 \times 10^5$  bacterias/ mL y el volumen correspondiente del EMS para obtener las concentraciones en el rango antes mencionado. Los tubos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de una solución de tiosulfato de sodio al 5 % p/v (92). Las muestras se centrifugaron y el paquete celular se resuspendió en 0.5 mL de caldo BHI estéril, toda la muestra se inoculó en placas conteniendo BHI-agar al 2%, distribuidas homogéneamente con una asa de vidrio. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Las clonas se contaron en un cuenta colonias, Leica Québec Dark-Field Colony Counter. Se contó el porcentaje (Tabla 4) de *N. brasiliensis* sobrevivientes de cada una de las placas, y los valores fueron graficados contra las diferentes dosis del EMS, como se muestra en la gráfica 1. Finalmente se tomó la  $\text{LD}_{80}$  y como se mencionó anteriormente se trató la *N. brasiliensis* HUJEG-1 a una dosis de 70  $\mu\text{g/mL}$  de EMS para la obtención de clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1, las clonas fueron aisladas y mantenidas en BHI-agar.

**5.6.5 Actividad de catalasa:** La actividad de catalasa en las clonas mutagenizadas con EMS fue determinada cualitativamente por dos métodos: el directo (126) y en gel de poliacrilamida (146), la determinación cuantitativa se realizó por un método espectrofotométrico (2).

**5.6.5.1 Método directo:** se aplicó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en solución acuosa a una muestra de la colonia aplicada en un portaobjetos, la presencia de actividad de catalasa se registró como positiva cuando aparecieron burbujas en la suspensión bacteriana, el caso contrario fue registrado como negativo.

**5.6.5.2 Identificación de la actividad de catalasa y peroxidasa en gel de poliacrilamida:** para la identificación de la actividad de catalasa en gel se utilizó la técnica de Wayne (146).

**5.6.5.2.1 Preparación del gel de poliacrlamida en condiciones nativas (75):** Los reactivos y las cantidades para preparación del gel de corrimiento al 12%, se describen en el apéndice.

**5.6.5.2.2 Obtención de extractos proteicos (138):** Los extractos proteicos se obtuvieron por la técnica establecida en el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario de la UANL, a cargo del Dr. Mario Cesar Salinas Carmona, se inició de un cultivo celular bacteriano a mediana escala en matraz de 500 mL con medio de cultivo BHI estéril, incubado a 37°C por cuatro días, la masa bacteriana se obtuvo por centrifugación y se lavó tres veces con agua destilada estéril, el paquete celular se desengrasó por extracción con alcohol-éter a concentraciones de 1:1, 1:2 y 1:3, la masa se dejó secar y se trituró en un mortero con polvo de vidrio estéril y se realizaron tres extracciones con Tris-HCl acetato de  $Mg^{++}$  0.01 M, pH 7.4 en agitación constante por 18 h las extracciones fueron mezcladas y finalmente se dializaron frente a agua destilada, del dializado se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (18).

**5.6.5.2.3 Condiciones de corrimiento electroforético e identificación de la actividad de catalasa y peroxidasa en gel de poliacrilamida:** Se utilizó la técnica de Wayne (146), la cual se realizó de la siguiente manera: Se colocaron 200  $\mu$ g de proteína total de cada una de las clonas así como del extracto proteico de la cepa de referencia por carril,

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental en un volumen de 40 a 50  $\mu\text{L}$ . El corrimiento electroforético se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 12 %, a un voltaje de 80 V para el empaquetamiento y 125 V para corrimiento en una solución amortiguadora Tris-Glicina pH 8.3. La actividad de catalasa y/o peroxidasa se determinó inmediatamente después a la electroforesis, el gel se lavó tres veces con una solución de PBS pH 7.0, por 10 minutos cada lavado, posteriormente para determinar la actividad de peroxidasa el gel fue teñido con 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % y se mezcló con 100 mL de una solución que contenía DBA (3,3'diaminobencidina-tetrahidroclorada) a una concentración de 50 mg/mL, dejándolo en agitación por 20 minutos a temperatura ambiente, se aspiró la solución con vacío y se lavó tres veces con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada dejando 10 minutos cada vez. El gel se colocó en una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y se agitó suavemente por 10 minutos. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se retiró por aspiración y el gel se lavó como se mencionó anteriormente. Una mezcla v/v de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  al 2% en presencia de  $\text{FeCl}_3$  al 2%, recientemente preparada fue adicionado al gel, la reacción fue detenida con  $\text{H}_2\text{O}$  de la llave, el gel fue finalmente fotografiado.



**5.6.5.3 Determinación cuantitativa de la actividad de catalasa por espectrofotometría :** El análisis que utilizamos se basa en el método de Aebi (2), el cual tiene como fundamento la disminución de la absorbancia dado por la descomposición de la actividad del peróxido de hidrógeno al 3%, en presencia de la actividad de la catalasa en un pH neutro a 25°C , a una longitud de onda de 240 nm. En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se colocaron 950  $\mu$ L de una solución amortiguadora de fosfatos a una concentración de 50 mM y pH 7.4, se añadieron 40  $\mu$ L de la muestra, la cual correspondió a cada uno de los extractos proteicos mencionados anteriormente, se mezcló y se tomó el valor de absorbancia a 240 nm (este valor corresponde al blanco de reactivos), la reacción enzimática se inició agregando 10 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6% en amortiguador fosfatos. Los reactivos fueron preparados al momento de su uso y la mezcla de reacción se dejó por seis minutos en un programa computacional de cinética enzimática en un espectrofotómetro (Beckman DU-7500), obteniéndose el promedio del cambio de la absorbancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto,  $\Delta A/\text{min}$ . El volumen final de la reacción fue de 1 mL. La actividad de catalasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el cambio de absorbancia /min por 692.5 ( ver apéndice).

**5.6.6 Transformación bacteriana:** El pKAT-G que se usó, es un vector derivado de pBR-322, su mapa de restricción se muestra en la Figura 1; contiene el gen completo que codifica para la catalasa/peroxidasa de *Mycobacterium tuberculosis* bajo la influencia del promotor del triptofano (67,68).

**5.6.6.1 Transformación de *E. coli* XL-1 Blue con pKAT-G (150):**

Para obtener suficiente KAT-G se transformaron *E. coli* XL-Blue calcio competentes, con el siguiente protocolo: se descongeló a 4°C, una alícuota de *E. coli* XL-Blue calcio competentes, por otro lado se diluyó el pKAT-G stock de 600 ng en una relación 1:10, lo cual correspondió a 60 ng, en un volumen total de 1 mL, de éste se tomó 1 µL y se agregó a la suspensión bacteriana, se dejó incubando por 30 min y posteriormente se colocó en hielo a 4°C por 5 min, se agregó 1 mL de LB y se colocó por 1 h a 37°C en una incubadora en agitación. Se centrifugó a 1,200 rpm / 5 min, se resuspendió en 0.5 mL de LB y se inoculó una placa de LB-agar con 50 µg/mL de ampicilina, 12 µg/mL de tetraciclina y 50 µL de X-gal (20 mg/mL disueltos en N, N dimetilformamida), las placas se incubaron en forma invertida por 18 h.

### 5.6.6.2 Obtención del DNA plasmídico (Método alcalino) (123):

Una colonia de *E. coli* XL1-Blue transformada con pKAT-G, fue colocada en 4 mL de LB con 50 µg/mL de ampicilina, 12 µg/mL de tetraciclina, para obtener DNA plasmídico a pequeña escala, se dejó el cultivo por 18 h a 37°C en agitación vigorosa. El DNA plasmídico fue obtenido por el método alcalino descrito por Ausbel, el cual consiste en obtener el paquete celular bacteriano de *E. coli* XL1-Blue transformada con pKAT-G en un tubo de 15 mL (Corning # 25319-15) al cual se agregaron 4 mL de una solución de TE-Sacarosa (Tris al 50 mM y 25% de sacarosa), luego el tubo se colocó 10 min en hielo, se agregaron 4 mL de SDS-NaOH (SDS al 1% en NaOH al 0.2 M), se mezcló por inversión, posteriormente se dejó de 5 a 10 min a temperatura ambiente y se agregaron 3 mL de una solución de acetato de sodio 3M, pH 5. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10,000 rpm/10 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y el precipitado se descartó. El DNA plasmídico precipitó al agregar 2.5 volúmenes de etanol frío al sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con etanol frío al 75%, se centrifugó y el sobrenadante se eliminó por decantación, el precipitado se dejó a 37°C para que secase, finalmente se resuspendió en 50 µL, se agregó 1 µL de ribonucleasa (10mg/mL) (Sigma, cat.# R-6513), se

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental incubó 30 min a 37°C y posteriormente se incubó a 65°C por 1 min. Para verificar la pureza se analizó una muestra por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, el pKAT-G que se obtuvo por este método se utilizó en el ensayo de transformación de *Nocardia* además como control en las electroforesis.

**5.6.6.3 Caracterización enzimática de pKAT-G: Digestión enzimática de pKAT-G:** Para la caracterización de pKAT-G se utilizaron como enzimas de restricción *Hind* III, *Pst* I y *Sma* I, en la siguiente combinación para obtener los respectivos fragmentos de digestión de pKAT-G. La mezcla de reacción tipo utilizada para la caracterización de pKAT-G con enzimas de restricción se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

**Digestión enzimática de pKAT-G**

Reactivos	Volumen en $\mu\text{L}$
DNA plasmídico pKAT-G ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	2
Agua ultra pura (MQ)	5
Amortiguador 10X	1
Enzima 1	1
Enzima 2	1
Volumen total de reacción	10

Las enzimas fueron de New England BioLab y se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

Las mezclas de reacción se prepararon en tubos ependorff de 1.5 mL estériles y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 h, posteriormente  $5\mu\text{L}$  de cada una de las digestiones fueron corridas en un gel de agarosa al 1 % en amortiguador TE 0.1 X. Como marcador se uso  $\lambda\text{-Pst I}$ . El gel fue analizado en un Gel-Doc-1000 (Bio-Rad).

### **5.6.7 Transformación con pKAT-G de una clona de *N. brasiliensis* catalasa negativa no inductora de micetoma.**

**5.6.7.1 Transformación de *N. brasiliensis* HUJEG-1 mutada:** Se seleccionó una clona de *N. brasiliensis* HUJEG-1 mutada, no inductora de micetoma (*Nb-C68*), cuya actividad de catalasa era negativa, a partir de una placa de Petri con BHI-agar se tomó, con una asa bacteriológica una colonia se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo BHI, se mantuvo en una incubadora con agitación vigorosa ( $\approx 1200$  rpm), durante 48 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , las células fueron transferidas a contenedores y colocados en frío a  $4^{\circ}\text{C}$  (en hielo), para eliminar el medio de cultivo por centrifugación a 3000 rpm por 10 min, se realizaron 4 a 5 lavados con agua fría estéril, el paquete celular se resuspendió en un volumen mínimo alrededor de 1 a 5 mL de agua fría dependiendo del tamaño del paquete celular. Se colocó 1 mL de la suspensión celular electrodensa en micro tubos, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de pKAT-G 1:10 ( stock de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), la mezcla se dejó 5 min en hielo y se transfirió a una cubeta de 1 mL de capacidad y 0.1 mL de diámetro interno ( Life Technologies, cat.# 11608-031). En este estudio se aplicaron las condiciones de electroporación

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental reportadas por David Rouse y Zhang (115 y 150), que consisten en aplicar en una cámara de electroporación 1 mL de células competentes en presencia del vector de transformación en hielo y aplicar 2.5 V por un segundo, siguiendo al mismo tiempo las recomendaciones proporcionadas por la casa comercial del electroporador (Cell-Porator System, Life Technologies).

**5.6.7.2 Eficiencia de transformación:** Se calculó contando el número de colonias en la placa de LB-agar ampicilina, multiplicando por el volumen colocado en la placa y la concentración del vector en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (123).

**5.6.7.3 Aislamiento de clonas transformadas con pKAT-G:** Posterior a la electro-transformación la suspensión bacteriana, se colocó 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación y se aplicó 0.2 mL de la muestra en diferentes placas de Petri conteniendo BHI-agar ampicilina ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), la suspensión bacteriana se distribuyó con una asa de vidrio estéril sobre la superficie, para posteriormente incubarlas a  $37^{\circ}\text{C}$  y el tiempo necesario para observar colonias bacterianas. Diferentes colonias fueron levantadas y colocadas en caldo BHI para verificar la presencia de pKAT-G, por medio del método de extracción alcalina de DNA plasmídico .

### **5.6.8 Determinación de actividad de peroxidasa de *N. brasiliensis***

#### **HUJEG-1.**

**5.6.8.1 Determinación de actividad de peroxidasa en gel de poliacilamida:** Las proteínas de un extracto de *N. brasiliensis* se separaron por electroforesis, en un en gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones no desnaturalizantes, para revelar la actividad de peroxidasa como se indica en la sección 5.6.5.2.3, con la reacción de la 3,3' DAB en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%.

**5.6.8.2 Determinación de actividad de peroxidasa en tubo (151):** En un microtubo se agregaron 100 µL de extracto de proteínas obtenido de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se agregaron 100 µL de una solución de 3,3' DAB a una concentración de 1mg/mL, en agua p/v, y 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, la mezcla se agitó vigorosamente y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente.

**5.6.9 Inducción del micetoma experimental en ratones BALB/c:** La inducción de micetoma por cepas de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 de



La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental referencia y mutada se realizaron en las condiciones previamente establecidas, en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina (138), las bacterias se obtuvieron a partir de un cultivo primario en caldo BHI en agitación suave ( $\approx 200$  rpm) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h, de este cultivo se obtuvo un segundo inóculo para subcultivo en las mismas condiciones de crecimiento, se homogenizó la masa bacteriana en un Potter-Elevehjem (American Scientific product) para obtener una suspensión bacteriana con  $1 \times 10^7$  UFC/mL, de los cuales se inyectó 0.1 mL ( $1 \times 10^6$  bacterias/ mL) en el cojinete plantar de la pata trasera de cada ratón, en grupos de 10 ratones cada uno. Para las clonas obtenidas a partir del tratamiento con EMS se trabajó en las mismas condiciones de crecimiento además de utilizar dosis altas ( $1 \times 10^{12}$  bacterias/mL) así como dosis bajas ( $1 \times 10^3$  bacterias /mL). Los ratones fueron observados todos los días, en un tiempo de 28 a 45 días, se utilizaron los criterios de evaluación clínica reportados previamente para la presencia de micetoma, como se mostró en la sección de antecedentes (138).

### **5.6.10 Construcción de una Biblioteca Genómica de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (123).**

**5.6.10.1 Obtención y Purificación de PUC-18:** El vector PUC-18 fue donado por el Ph. D. Ying Zhang, este vector fue amplificado en *E. coli* XL-Blue y purificado por un método alcalino (Mini-kit plasmid, QUIAGEN), una muestra de 100 µg fue digerida con *Bam* HI por 2 h a 37 °C, después de este tiempo la enzima se inactivó a 70 °C por 15', para posteriormente purificar por precipitación el DNA, éste se defosforiló en presencia de CIP (de las siglas en inglés Calf intestine alkaline phosphatase), para finalmente utilizarlo en la reacción de ligación en la construcción de la biblioteca genómica. Para comprobar la digestión el DNA plasmídico se corrió en un gel de agarosa al 1 % en amortiguador TE.

**5.6.10.2 Obtención de fragmentos del DNA genómico de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1:** La digestión parcial del DNA de *N. brasiliensis* HUJEG-1 se llevó a cabo en presencia de *Sau3A* I, los fragmentos fueron obtenidos a diferentes concentraciones de *Sau3A* I, para lo cual se aplicaron 2 U (0.5µL) de la enzima en 60 µL de mezcla de reacción, que

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental contenía 30 µg de DNA de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (10 µL) en 800 µL de Tris-HCl pH 8 10mM, 100µL de ASB 10X y 100µL de amortiguador de la enzima 10X, 30 µL de esta solución fueron colocados en una serie de ocho tubos, del primer tubo se transfirieron 30 µL del primer tubo al segundo y así sucesivamente, diluyendo la enzima en una relación 1:2. Las concentraciones oscilaron entre 1 a 0.0039 unidades de enzima, además se llevaron en paralelo en presencia y ausencia de enzima como controles, la reacción se llevó a 37 °C por 1h y posteriormente la enzima se inactivó a 70°C por 15' y la enzima se inactivó a 75 °C por 15 minutos. Una muestra de 10 µL fue aplicada en un gel de agarosa al 0.8% para obtener los productos de digestión por electroforesis, el gel fue analizado en una cámara de luz UV.

**5.6.10.3 Clonación de Fragmentos del DNA de *N. brasiliensis* HUJEG-1:** Reacción de ligación. Esta reacción se llevó a cabo mezclando los productos de digestión del DNA genómico de *N. brasiliensis* y el DNA plasmídico de PUC-18, la relación utilizada fue de 20:1, se usó la enzima T4 DNA ligasa (BioLab,# 202S) y un amortiguador de reacción, la mezcla se incubó a 4°C por 18 h, en este mismo ensayo se colocaron controles de ligación con PUC-18 digerido y defosforilado respectivamente en presencia

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental de la mezcla de ligación, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L, al final de la reacción la enzima se inactivó a 70 °C por 15' y posteriormente el DNA fue purificado por precipitación. La ligación se determinó en un gel de agarosa al 1 % en amortiguador TE (Tris-EDTA 0.01 M, pH 7), las bandas fueron reveladas con bromuro de etidio.

**5.6.10.4 Transformación de *E. coli* XL-1 Blue con DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 clonado en PUC-18:** Una suspensión densa de células electrocompetentes contenidas en un volumen de 100  $\mu$ L fue descongelada y colocada en un baño de hielo a 4°C, se agregó 1 $\mu$ L de la reacción de ligación, un control negativo de ligación el cual no contenía fragmentos de DNA de *Nocardia* fue colocado en otro tubo de microcentrífuga, la mezcla se dejó reposar por 5' en un baño de hielo y posteriormente se transfirió a una cámara de electroporación para aplicar una descarga eléctrica como se mencionó anteriormente, la corriente aplicada fue de 2.5 V respectivamente, posterior al pulso la suspensión bacteriana se incubó a 37 °C / 1h y en agitación de 600 rpm. Finalmente la suspensión bacteriana fue colocada en placas de Petri conteniendo LB-agar con ampicilina (50  $\mu$ g/mL) y X-gal (20 mg/mL, disuelta en N, N dimetilformamida) y se incubaron por 16-18 h a 37 °C, las recombinantes

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental se obtuvieron por raspar la superficie del agar de cada una de las placas y fueron mantenidas en medio LB con ampicilina, las recombinantes obtenidas se congelaron  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su el tamizaje.

#### **5.6.10.5 Tamizaje de la Biblioteca genómica de *N. brasiliensis* con KAT-G de *M. tuberculosis*.**

**5.6.10.5.1 Obtención de la sonda:** La secuencia nucleotídica utilizada como sonda corresponde al fragmento que codifica para la catalasa de *M. tuberculosis* y se aisló a partir de KAT-G que se encontraba clonado en un vector referido como *PY214*, donado por el Dr. Ying Zhang, la reacción de digestión se llevó a cabo en un tubo eppendorf de 1.5 mL, en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , con *BamH* I y *EcoR* V, el producto fue analizado en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos correspondientes a 3.1 y 1.5 Kb, fueron obtenidos al cortar del gel de agarosa la banda de cada fragmento, posteriormente se purificaron por un método alcalino comercial (Mini-kit plasmid, QUIAGEN).

**5.6.10.5.1 Marcaje de la sonda:** Los fragmentos obtenidos por la digestión de KAT-G fueron marcados con  $\alpha^{32}\text{P}$  en presencia de una mezcla

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental de dNTP y fragmento Klenow, las condiciones de marcaje fueron las sugeridas por la casa comercial, en breve; en un micro tubo de centrifuga se agregó 25µL de DNA (fragmento de KAT-G), se desnaturalizó 5 minutos por ebullición, se dejó en hielo y se agregaron 2 µL de cada uno de los siguientes componentes, dATP, dGTP dTTP y 15 µL de un amortiguador conteniendo una mezcla de iniciadores (iniciadores al azar, Life Technologies, Cat. 18187-013), posteriormente se agregaron 5 µL de [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP con  $\cong 50\mu\text{Ci}$ , este último paso se realizó con protección de una cámara de acrílico y en área especial de radioactividad, se llevó a un volumen final de 49 µL y se mezcló suavemente, 1 µL de una mezcla de fragmentos Klenow (fragmento largo de la DNA polimerasa I) fue agregada, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 2 h, la reacción se detuvo con 5 µL de una solución  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M.

**5.6.10.5.3 Hibridación *in situ*:** Las recombinantes obtenidas en la sección 5.6.10.4, fueron sembradas en LB- agar ampicilina (100 µg/mL) por 18 h. Las colonias obtenidas fueron unidas a un filtro de nitrocelulosa circular, con una marca para no perder la orientación de la placa, con pinzas el filtro se colocó directamente sobre la superficie del agar evitando

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental espacios vacíos (burbujas) y se dejó por 2 minutos, se retiró la membrana y se colocó en un recipiente conteniendo SDS al 10 % y se dejó por 5 minutos, después se colocó en un recipiente con solución desnaturizadora (ver sección 5.6.11.3.3.) por 5 minutos y posteriormente 5 minutos en una solución neutralizadora, las membranas se dejaron secar y se colocaron en una cámara de luz UV, las membranas se colocaron en una bolsa de plástico y se siguió la secuencia de marcaje como se menciona para el Southern-blot en el apartado 5.6.11.4.

#### **5.6.11 Southern-blot blot para el DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1.**

##### **5.6.11.1 Obtención del DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1:**

El DNA genómico se aisló a partir de un paquete celular de una semana de incubación en caldo BHI, una muestra de 1 mL se trató con perlas de vidrio en solución extractora y fenol cloroformo por 10 minutos en agitación vigorosa, el DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de isopropanol y se dejó secar a 37°C, se resuspendió en 20 µL de agua mQ estéril, 1 µL se aplicó en un gel de agarosa al 1 % y se corrió una electroforesis a 70 V por 15 minutos y posteriormente el voltaje se aumentó a 110 V, se determinó la

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental concentración por espectrofotometría UV a 260/280 nm. Los DNA's genómicos de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* se aislaron por el mismo método y se utilizaron como control negativo y positivo respectivamente de KAT-G, tanto en el Southern-blot como en PCR.

**5.6.11.2 Digestión del DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1:**

El DNA de *N. brasiliensis*, al igual que el DNA de micobacterias, fue digerido siguiendo el protocolo de la siguiente tabla:

**TABLA 4**

**Digestión enzimática del DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1**

	<i>Kpn</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI
DNA	5µL	5µL	5µL
Enzima de Restricción	1µL	1µL	1µL
Amortiguador De la enzima 10X	1µL	1µL	1µL
ASB 10X	1µL	—	—
Agua MQ	2µl	3µL	3µL
Volumen Total	10µL	10µL	10µL



Esta reacción de digestión se llevó independientemente para cada enzima y cada uno de los DNA's (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis* y *N. brasiliensis*), la mezcla de reacción se incubó por 16 a 18 h a 37°C sin agitación y posteriormente se colocó el volumen total en un gel de agarosa al 1% para la separación de los productos de digestión por electroforesis, la que se verificó en una cámara de luz UV.

**5.6.11.3 Transferencia de los productos de digestión a papel de nitrocelulosa (PNC):** El gel de agarosa conteniendo los fragmentos fue tratado con solución desnaturalizadora (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M) por 30 minutos, después con una neutralizadora (Tris-HCl 0.5 M y NaCl 1.5 M) por 30 minutos y 30 minutos más en una solución de SSC 10X (NaCl 3M y citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0), finalmente se cortó un papel de nitrocelulosa un poco más grande que las dimensiones del gel y se impregnó del amortiguador de transferencia (SSC 10X), el PNC se colocó en la parte inferior de una cámara de vacío, se sobrepuso el gel marcando la orientación de la membrana con el gel, la transferencia se llevó a cabo por dos horas en constante hidratación con el amortiguador de transferencia. Los productos de digestión transferidos, fueron fijados al PNC por

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJBG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental  
tratamiento en una cámara de luz UV (Spectro-Linker, XL-1000UV  
Crosslinker, Spectronic Co.), una muestra de la sonda fue colocada como  
control de orientación e hibridación en el PNC.

#### **5.6.11.4 Hibridación de los productos de digestión con la sonda KAT-G de *M. tuberculosis*:**

**5.6.11.4.1 Pre-hibridación:** El PNC con los fragmentos transferidos se colocó en una bolsa de plástico se aplicaron 10 mL de solución de hibridación, que contenía 0.1 mL de SDS 5X, 3.0 mL de SSC 20X, 1.0 mL de solución Denhardt's 50X, 0.1 mL de DNA de esperma de salmón, 5 mL de formamida y 0.8 mL de agua desionizada estéril, esta mezcla se calentó a ebullición por 5 minutos antes de ponerla en contacto con el PNC, la bolsa fue sellada con calor y se dejó incubando en agitación a 42°C por dos horas

**5.6.11.4.2 Hibridación con KAT-G marcado ( $\alpha^{32}\text{P}$ ):** La sonda KAT-G  $\alpha^{32}\text{P}$ , fue agregada en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  al interior de la bolsa de plástico y posteriormente resellada, se incubó por 18 h en agitación constante a 42°C.

**5.6.11.5 Autorradiografía:** Al finalizar el tiempo de hibridación la membrana se dejó secar a 37°C y después en un cuarto oscuro se colocó frente a una película radiográfica (KODAK), en un cassette metálico, éste se dejó a -80°C por 18h. Por último la película radiográfica fue revelada.

**5.6.12. PCR para KAT-G de *N. brasiliensis* HUJEG-1:** La reacción para la PCR se llevó a cabo con los DNA's de *N. brasiliensis* digerido con *Sau3A-I* y otra muestra sin digerir, además de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* sin digerir. Los iniciadores KAT-F (5'-ACAGCGGTAA-CCGGGATCTGGAGAA-3') y KAT-R (5'-GATCCCGGTTACCGCTG-TAACGCTCATC-3'), fueron proporcionados por el Ph. D. Ying Zhang y corresponden a las secuencias que codifican para el gen KAT-G de *M. tuberculosis*, la reacción se llevó a cabo con el siguiente protocolo:

TABLA 5

**Protocolo de reacción para la amplificación de KAT-G  
por PCR**

<b>Mezcla de dNTPs</b>	<b>5 <math>\mu</math>L</b>
<b>Amortiguador de Enzima</b>	<b>5 <math>\mu</math>L</b>
<b>Mg<sup>++</sup></b>	<b>1.5 <math>\mu</math>L</b>
<b>ASB</b>	<b>0.5 <math>\mu</math>L</b>
<b>Iniciador KAT-R</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>Iniciador KAT-F</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>DNA</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>35 <math>\mu</math>L</b>

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador en las siguientes condiciones:

**TABLA 6**  
**Condiciones de PCR**

<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo En minutos</b>	<b>Ciclos*</b>
94	2	1
55	1	35*
72	1	
0	1	—

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para determinar la presencia de los productos de amplificación, éste se corrió en presencia de marcadores de peso molecular y cada uno de los DNA's amplificados.

## CAPITULO 6

### RESULTADOS

#### **6.1. Obtención de clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 no inductoras de micetoma:**

**6.1.1. Viabilidad de *N. brasiliensis* HUJEG-1 al EMS:** Para obtener clonas mutadas a partir de *N. brasiliensis* HUJEG-1 utilizamos diferentes concentraciones del EMS como mutágeno, partimos de concentraciones entre 200 µg a 1000 µg como tratamiento inicial, observando que estas concentraciones fueron letales para una suspensión  $1 \times 10^5$  bacterias /mL a 37°C por 24 h. Por lo cual se realizó otro ensayo a concentraciones menores de 200 µg para encontrar la LD<sub>80</sub>. En la Tabla 7 y Figura 2 se enlistan respectivamente los valores porcentuales de viabilidad de *N. brasiliensis* al tratamiento con el EMS así como la grafica correspondiente para obtener la LD<sub>80</sub>. La concentración de 70 µg correspondió a la dosis que daba aproximadamente un 20% de sobrevivientes y esta dosis fue la que se utilizó para obtener clonas

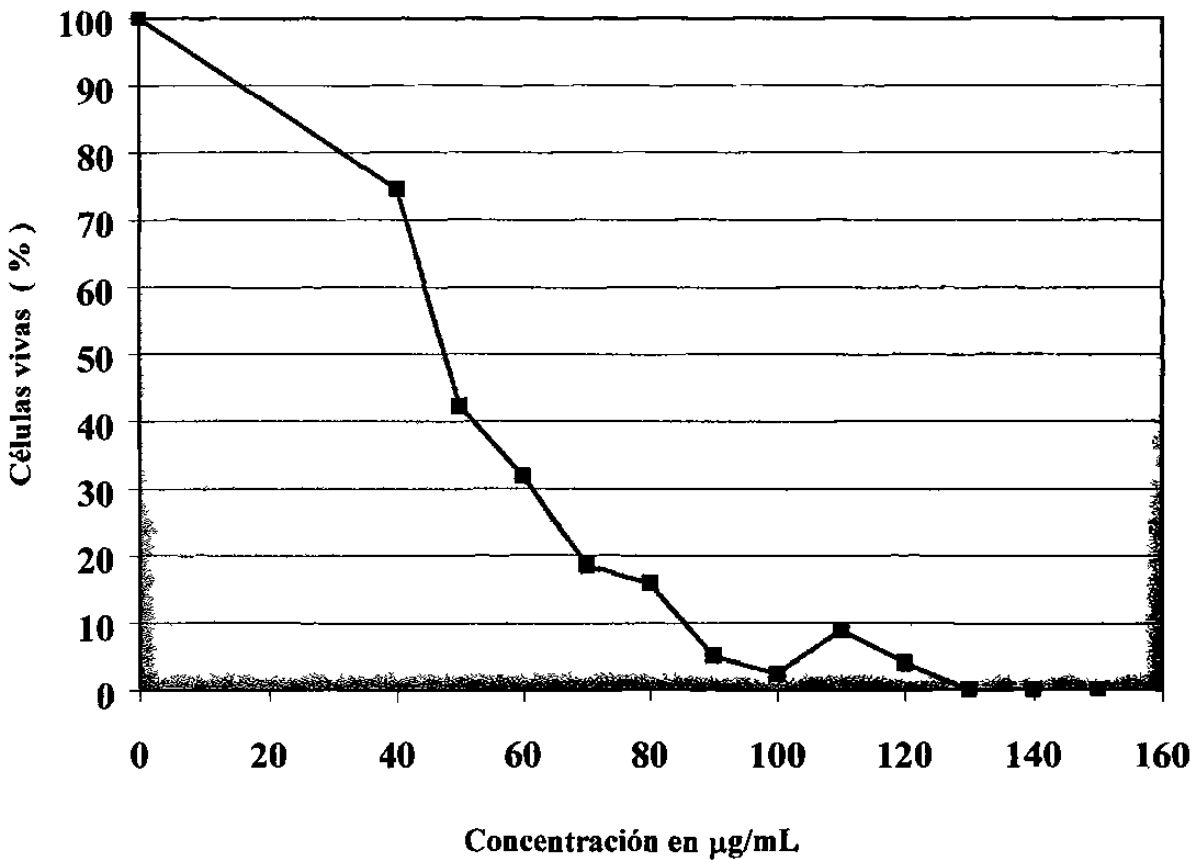
La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental mutadas sin actividad de catalasa, las sobrevivientes se aislaron en frascos independientes conteniendo BHI agar estéril y se incubaron a 37°C para su mantenimiento. Cada una de las clonas aisladas fueron la fuente para la obtención de biomasa para cada uno de los experimentos subsecuentes.

TABLA 7

Valores porcentuales de bacterias vivas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 tratadas con diferentes dosis de EMS

Concentración de mutágeno en µg / mL (EMS)*	Células bacterianas vivas (%)
0	100
40	74.5
50	42.25
60	31.84
70	18.47
80	15.9
90	5
100	2.5
110	8.9
120	4
130	0
140	0
150	0
160	0

Los valores porcentuales se obtuvieron tomando el 100% de sobrevivencia de un control sin mutágeno. \* El EMS se diluyó en BHI para obtener la concentración correspondiente, partiendo de una solución 200mg/ml



**Figura 2:** Curva de viabilidad de *N. brasiliensis* HUJEG-1 tratada con EMS para determinar LD<sub>80</sub>: En el eje de ordenadas el valor porcentual de viabilidad bacteriana y las abscisas la concentración en µg/mL del EMS. Este tratamiento se realizó por triplicado, cada punto corresponde a una concentración. Para las dosis menores de 120 µg/mL del EMS. DS= ± 3 % de viabilidad.



**6.1.2. Evaluación de la capacidad de inducir micetoma por clonas mutadas catalasa negativa de *N. brasiliensis* HUJEG-1:** En este estudio para la evaluación del desarrollo de micetoma se utilizaron los criterios clínicos del desarrollo del micetoma previamente reportados por Salinas-Carmona, estos se muestran en la Tabla 1. Los resultados mostraron que ninguna de las clonas mutadas que se probaron fueron capaces de inducir micetoma en ratones BALB/c al día 28 después de la infección a diferencia de la cepa de referencia, la cual indujo un micetoma a partir del día 14 en la misma cepa de ratones. El micetoma que desarrollaron los ratones que recibieron *N. brasiliensis* HUJEG-1, se presentó en forma crónica ya que el tiempo que duró la infección llegó hasta después de dos años post-infección, en este caso es difícil establecer la causa de muerte del ratón ya que la infección o la vejez del animal pudieron ser responsables. Para este estudio seleccionamos solo las clonas que mantuvieron su viabilidad por más de tres meses en BHI- agar sin revertir la actividad de catalasa. En la Tabla 8 se muestra el resultado de la evaluación clínica macroscópica del desarrollo de micetoma, cada grupo experimental fue de 10 ratones para cada clona, este experimento se realizó además con dosis altas y bajas de inóculo de bacterias, como se mencionó en material y métodos, los datos clínicos mostrados para cada una de las clonas estudiadas no presentaron diferencias

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental en el desarrollo de la infección a diferentes dosis.

**TABLA 8**

**Evaluación clínica del micetoma en ratones BALB/c por clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con EMS.**

**TIEMPO EN DIAS POST-INFECCIÓN**

	1	2	3	4	7	14	<sup>a</sup> 28	45
<i>Nb-C1</i>	++	++	++	++	+	+	-	-
<i>Nb-C 8</i>	++	++	++	-	-	-	-	-
<i>Nb-C 47</i>	++	++	+	-	-	-	-	-
<i>Nb-C 48</i>	++	++	++	++	-	-	-	-
<i>Nb-C 59</i>	++	++	++	++	+	-	-	-
<i>Nb-C 68</i>	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Nb-C 76</i>	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>Nb-C 77</i>	++	++	++	++	-	-	-	-
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	++	++	++	+++	+++	++++	++++	++++

<sup>a</sup> Tiempo establecido para el desarrollo de micetoma por *N. brasiliensis* HUJEG-1(120).

**6.1.3. Evaluación de la capacidad de inducir micetoma por clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con diferentes actividades enzimáticas entre la catalasa y/o proteasa:** En este experimento se analizaron diferentes clonas después de mutarlas con el EMS y encontramos diferencias en sus actividades entre catalasa y/o proteasa. A partir de las clonas que formaron un panel completo entre la presencia y ausencia de estas dos enzimas se prepararon los inóculos correspondientes y se infectaron grupos de 10 ratones en una dosis infectante única de  $1 \times 10^6$  bacterias/mL, por vía subcutánea como se mencionó anteriormente. Como se muestra en la Tabla 9, el desarrollo del micetoma se evaluó hasta el día 45 y ninguna clona fue capaz de inducir micetoma en ratones BALB/c, comparados con los que fueron infectados con *N. brasiliensis* HUJEG-1.

**6.2. Determinación cualitativa de la actividad de catalasa en clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1:**

**6.2.1. Resultados de la actividad de catalasa por el método directo:**

La actividad de catalasa en cada una de las clonas fue evaluada inicialmente en forma directa con  $H_2O_2$  al 3%, el resultado fue que ninguna de las clonas seleccionadas presentó actividad de catalasa visible, la cepa de referencia fue intensamente positiva.

TABLA 9

**Inducción de micetoma por clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con diferentes actividades enzimáticas**

Clona	Actividad de Proteasa <sup>c</sup>	Actividad de Catalasa	Desarrollo de Micetoma
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	+	+	Positivo ++++
<i>Nb-C4</i> <sup>b</sup>	-	+	Negativo
<i>Nb-C5</i> <sup>a</sup>	+	+	Negativo
<i>Nb-C8</i>	-	-	Negativo
<i>Nb-C68</i>	+	-	Negativo

<sup>a</sup> La diferencia entre esta clona y la de referencia es que *Nb-C4* es susceptible a ampicilina. <sup>b</sup> *Nb-C*: corresponde al origen de la clona mutada y su número de aislamiento. <sup>c</sup> La actividad de proteasa se determinó en un gel BHI-caseína y se basa en la hidrólisis de la caseína presenten en el medio de cultivo. Una reacción de proteasa positiva se muestra con un halo de hidrólisis en el agar.

**6.2.2 Determinación espectrofotométrica de la actividad de catalasa en clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1:** Se realizó a partir de los extractos proteicos obtenidos de cada una de las clonas que no indujeron micetoma, como control positivo de actividad, el análisis se realizó en paralelo a un extracto de proteínas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (cepa de referencia), la determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (18) y la actividad enzimática se reportó como actividad específica para cada una de las clonas. Como se muestra en la Tabla 10 los valores de actividad enzimática para cada una de las clonas mostró una diferencia de 1000 veces menor de actividad enzimática comparadas con la cepa de referencia. Este ensayo sirvió para proporcionar datos cuantitativos, ya que el realizado en el 6.2.1 registró solo apreciación cualitativa.

TABLA 10

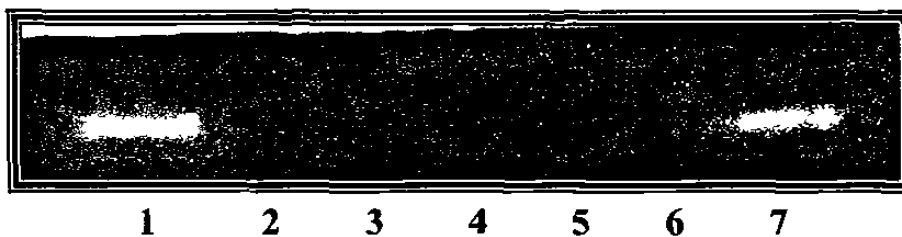
Determinación de actividad de catalasa en extractos proteicos de clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 no inductoras de micetoma

Clonas mutadas	Actividad específica de catalasa (U/mg)*
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	5,975 ± 240
<i>Nb-C1</i> **	1.4 ± 0.3
<i>Nb-C8</i>	1.3 ± 0.27
<i>Nb-C47</i>	1.2 ± 0.16
<i>Nb-C48</i>	0.5 ± 0.31
<i>Nb-C59</i>	1.2 ± 0.43
<i>Nb-C67</i>	1.1 ± 0.10
<i>Nb-C68</i>	1.9 ± 0.84
<i>Nb-C77</i>	1.0 ± 0.9

\* Concentración en U/mg de proteína, ver apéndice.

\*\* *Nb-C*, corresponde a las siglas y número de cada clona aislada después del tratamiento con EMS en *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, el análisis se realizó por triplicado.

**6.2.3. Actividad enzimática en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.** La Figura 3 muestra la falta de actividad de catalasa en gel comparada con los extractos de proteínas de los controles de referencia, una muestra de *N. brasiliensis* y un extracto de proteínas de *E. coli* transformada con pKAT-G son controles positivos de actividad de catalasa, esta actividad fue revelada por una reacción de oxido-reducción en presencia de  $K_3Fe(CN)_6$  al 2% y  $FeCl_3$  al 2%.



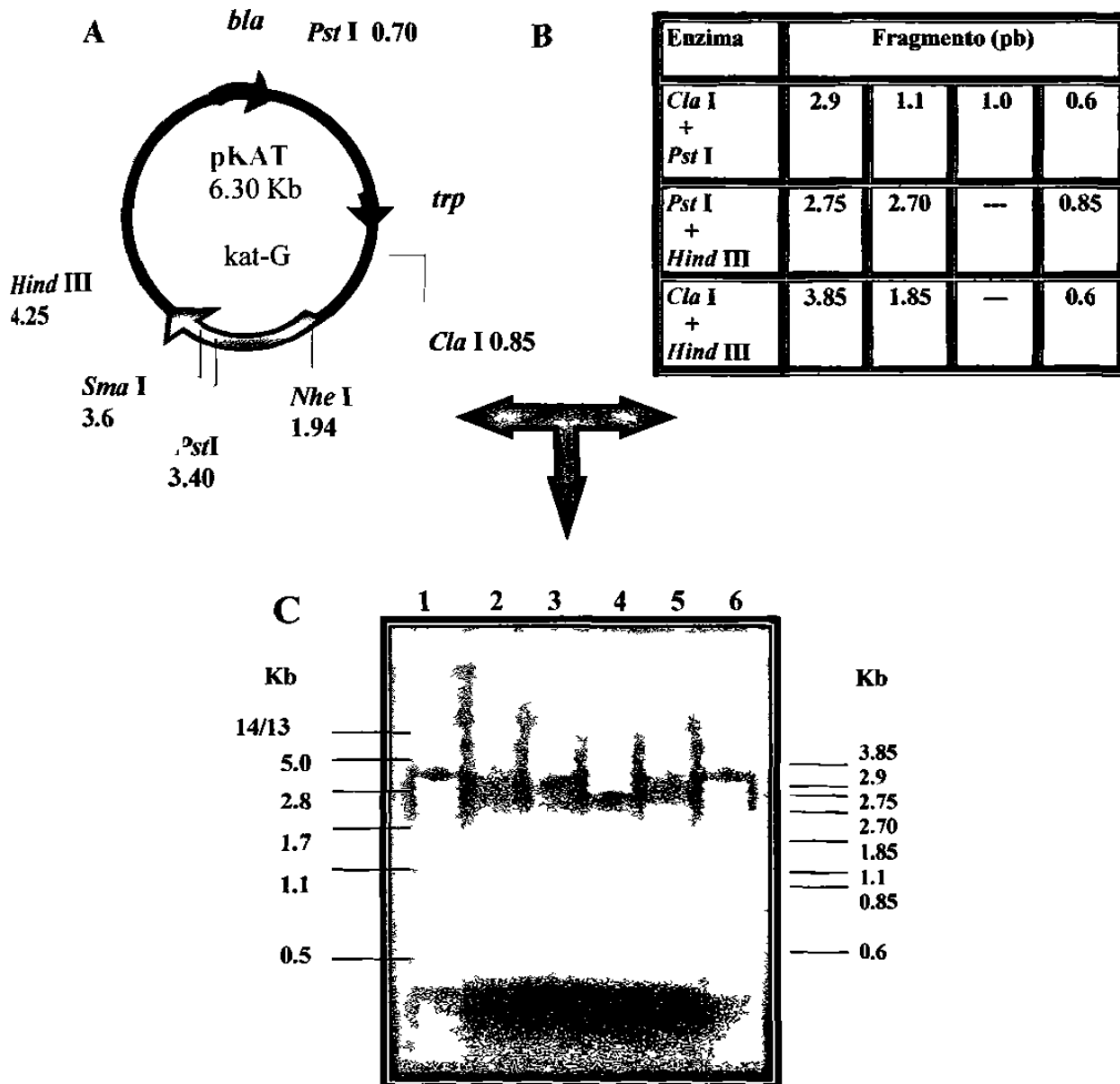
**Figura 3:** Actividad de catalasa en gel de poliacrilamida al 12 % no desnaturalizante. El carril 1 corresponde a un extracto proteico de *N. brasiliensis* HUJEG-1, con actividad de catalasa positiva, los carriles 2,3,4,5 y 6 corresponden a los extractos proteicos de las clonas Nb-C47, Nb-C48, Nb-C59, Nb-C68 y Nb-C77 respectivamente, el carril 7 corresponde a un extracto proteico de *E. coli* transformada con pKAT-G. Las clonas analizadas fueron no inductoras de micetoma.

### **6.3. Transformación de clonas mutadas de *N. brasiliensis* con pKAT-G**

**6.3.1 Transformación de *E. coli* con pKAT-G:** Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4 C en el carril 2, este DNA plasmídico fue utilizado como control en todos los experimentos, la concentración fue determinada por espectrofotometría a una absorbancia de 280 nm, una muestra que se diluyó 1:1000, obteniendo una concentración de DNA plasmídico de 450 µg en 40 µL. Una muestra fue separada en gel de agarosa al 1.0 % para analizar su pureza como se observa en el carril B de la Figura 6.

**6.3.2. Caracterización de pKAT-G:** Para caracterizar el plásmido pKAT-G, se sometió a digestión con *Pst* I, *Cla* I y *Hind* III, en las combinaciones que se muestran en la Figura 4 B. El tamaño y presencia de los fragmentos fue revelado en un gel de agarosa al 1 % como se observa en Figura 4 C carriles 3,4 y 5. Un volumen de 5 µL de muestra fueron aplicados en el gel y el tamaño fue comparado con el marcador de peso molecular en los carriles en los carriles 1 y 6.





**Figura 4. Caracterización enzimática de pKAT-G.** A.- Esquema con la ubicación de los sitios de restricción de pKAT-G y el tamaño esperado de la digestión. B.- En el cuadro se muestran los tamaños de los fragmentos liberados por las enzimas utilizadas en la caracterización. Una muestra de 5  $\mu$ L de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 0.8 %, C.- Muestra los productos de la digestión del plásmido teñidos con bromuro de etidio. Los carriles de ambos extremos corresponden a un marcador de peso molecular  $\lambda$ +*Pst* I, el carril 2 corresponde a pKAT-G sin digerir, en el carril 3,4 y 5 se observan los productos de digestión de pKAT-G con *Pst* I+*Cla* I, *Pst* I+ *Hind* III y *Hind* III+*Cla* I, respectivamente.

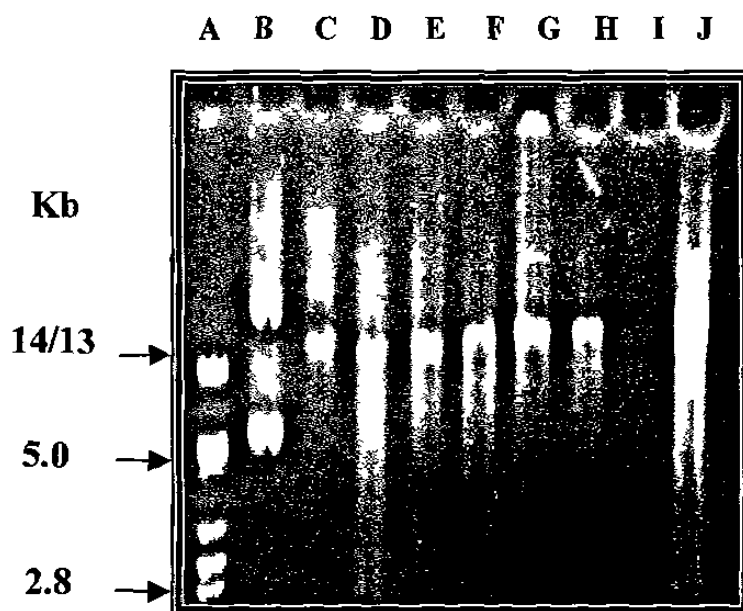
### 6.3.3 Transformación de una clona mutada (Nb-C68) de *N.*

*brasiliensis* con pKAT-G: La transformación se llevó a cabo utilizando el método de electrotransformación y se obtuvo una eficiencia de transformación de  $1 \times 10^9$  recombinantes por  $\mu\text{g}$  de pKAT-G, se levantaron varias colonias de la placa BHI-agar con ampicilina y se aislaron en frascos con medio de cultivo, las colonias restantes en la placa se guardaron en refrigeración.

### 6.3.4 Obtención de DNA plasmídico de clonas transformadas de

*Nb-C68* con pKAT-G: La Figura 5 muestra el resultado de la obtención de DNA plasmídico de diferentes clonas Nb-C68 transformadas con pKAT-G. Se utilizó un método de extracción alcalina y se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra en cada carril. En el carril A se encuentra el marcador de peso molecular  $\lambda$  + *Pst* I, en el carril B y C una muestra de pKAT-G obtenido de *E. coli* transformada (sin digerir), el resto de los carriles corresponden a diferentes clonas transformadas.

**6.3.5 Caracterización del DNA plasmídico obtenido de una clona transformada de *N. brasiliensis* (Nb-C68T4):** El DNA plasmídico de la clona Nb-C68T4 fue aislado y purificado para la caracterización con las mismas enzimas de restricción y condiciones de reacción mencionadas en 5.6.6.3, para pKAT-G. Este análisis reveló que el plásmido de las cepas electrotransformadas correspondió al de pKAT-G original. Los productos de digestión se separaron en un gel de agarosa y se logró observar cada uno de los fragmentos correspondientes a los previamente descritos para pKAT-G.

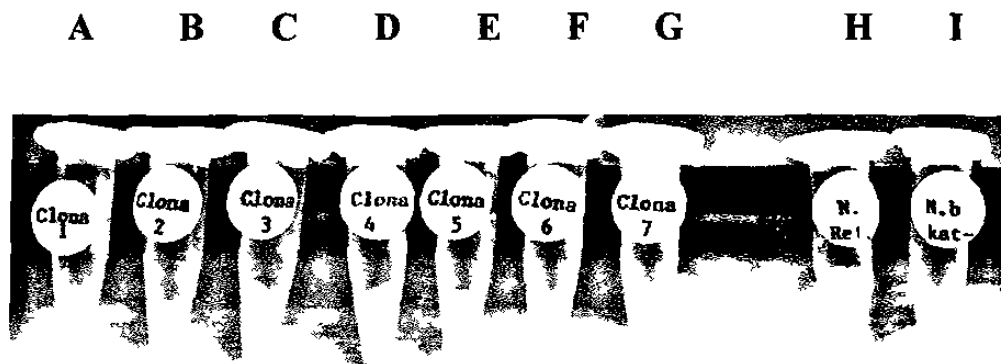


**Figura 5. Obtención de DNA plasmídico de clonas Nb-C68 transformada con pKAT-G.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se utilizó un método de extracción alcalina y se colocaron 5  $\mu$ L de muestra en cada carril. En el carril A se encuentra el marcador de peso molecular  $\lambda + Pst$  I, en el carril B una muestra de pKAT-G concentrado (stock original), en C pKAT-G obtenido de *E. coli* XL-Blue, los carriles D a J muestran el DNA de pKAT-G obtenido de las clonas transformadas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. El carril I no contiene DNA.

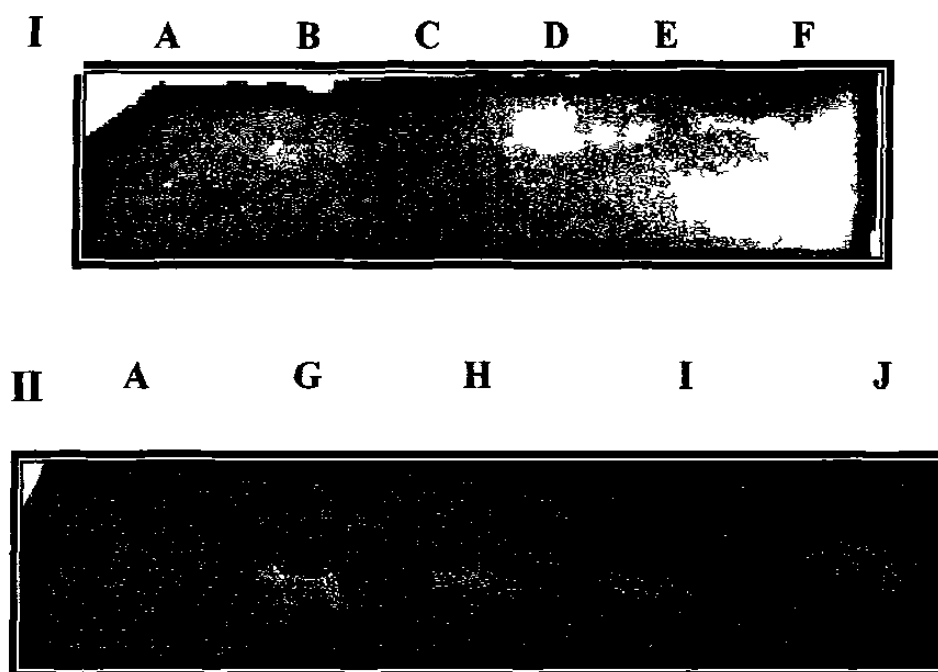
## **6.4 Actividad de catalasa de las clonas Nb-C68 transformadas con pKAT-G:**

**6.4.1. Actividad de catalasa directa:** La Figura 6 muestra la actividad de catalasa de diferentes extractos de proteínas obtenidos de clonas transformadas con pKAT-G, la prueba se realizó aplicando una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% directamente sobre el extracto soluble, la presencia de burbujas evidenció la actividad de catalasa.

**6.4.2 Actividad de catalasa en gel de poliacrilamida:** Los extractos de proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturizantes y la actividad de catalasa se evidenció por una reacción de oxido-reducción (ver material y métodos). En la Figura 7, se muestran los resultados , en el carril A un extracto de proteínas de la clona antes de la transformación, en el carril B un extracto de proteínas de *N. brasiliensis* y los carriles restantes corresponden a diferentes clonas, en este estudio se logró observar diferente intensidad de banda así como una aparente doble banda en el carril de *N. brasiliensis*, no se observó actividad de peroxidasa en ningún gel de los analizados.



**Figura 6: Determinación cualitativa de actividad de catalasa en forma directa sobre extractos de proteínas obtenidos de diferentes clonas aisladas de *NbC68* transformada con pKAT-G, que corresponden los microtubos A al G, H corresponde a un extracto proteico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 de referencia y el I corresponde a *NbC68* antes de la transformación, con actividad de catalasa negativa. La reacción se llevó a cabo agregando una gota de  $H_2O_2$  al 3% en cada uno de los microtubos correspondientes, la presencia de burbujas evidencia la actividad de catalasa.**



**Figura 7:** Determinación de actividad de catalasa en gel de poliacrilamida al 12 % no desnaturizante. En ambos geles A corresponde a un extracto de proteínas de *Nb-C68*, control negativo. El carril B corresponde a un extracto de proteínas de *N. brasiliensis* HUJEG-1, los carriles C a I corresponden a diferentes clonas aisladas de *NbC68*, después de la transformación, *Nb-C68T1*, *Nb-C68T2*, *Nb-C68T3*, *Nb-C68T4*, *Nb-C68T5*, *Nb-C68T6* y *Nb-C68T7* el carril J corresponde a un extracto de proteínas de *E. coli* transformada con pKAT-G.

**6.4.3 Actividad de catalasa por espectrofotometría:** A partir de las clonas obtenidas de la transformación con pKAT-G se obtuvieron extractos proteicos, estos fueron sometidos a una reacción oxidativa en presencia de  $H_2O_2$ , las concentraciones fueron calculadas en base a la disminución de la

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental absorbancia a un tiempo de 5 min para evaluar el consumo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ver apéndice), el valor final fue calculado como unidades específicas de actividad de catalasa. El resultado de las actividades para cada una de las clonas se observa en la Tabla 11. En este análisis se observaron buenos niveles de recuperación de la actividad de catalasa en varias clonas que se analizaron, lo cual pudiera ser comparable a los niveles de actividad de catalasa de la cepa de referencia, además éste efecto es similar al reportado para otras bacterias y llama la atención que ninguno de los extractos proteicos obtenidos de las diferentes clonas transformadas, expresó mayor actividad de catalasa que el extracto proteico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 que induce micetoma.

**6.4.4 Actividad de peroxidasa en *N. brasiliensis* HUJEG-1:** La reacción de actividad de peroxidasa en gel de poliacrilamida al 12% no desnaturizante resultó negativa tanto para las clonas como para la cepa de referencia, sin embargo al realizar un ensayo en tubo para cada uno de los extractos obtenidos de la cepa de referencia así como de las clonas antes y después de transformarse se evidenció la actividad de peroxidasa de hecho en este estudio fue posible incluir una muestra de la P61 semipurificada y el resultado fue positivo, además se incluyó un extracto proteico de

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental *M. tuberculosis* como control positivo. La Figura 8 muestra la actividad de peroxidasa para cada uno de los extractos proteicos, esta reacción se llevó a cabo en presencia de 3,3', DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

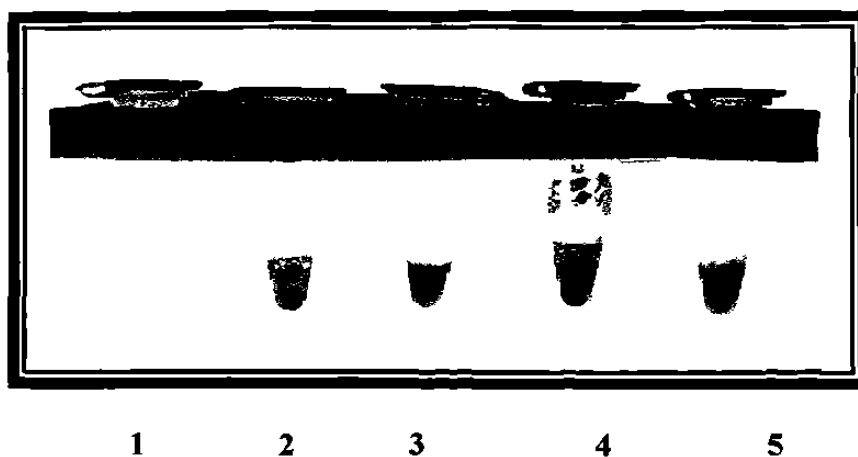
TABLA 11

Actividad de catalasa de *Nb-C68* transformada con pKAT-G

Cepa bacteriana	Actividad específica de catalasa <sup>a</sup>
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	5900 ± 235
<i>Nb-C68</i> <sup>b</sup>	1.9 ± 0.84
<i>Nb-C68-T1</i>	5611 ± 264
<i>Nb-C68-T2</i>	5480 ± 180
<i>Nb-C68-T3</i>	4050 ± 155
<i>Nb-C68-T4</i>	3750 ± 160
<i>Nb-C68-T5</i>	10 ± 4.1
<i>Nb-C68-T6</i>	4535 ± 230
<i>Nb-C68-T7</i>	15 ± 3.5

<sup>a</sup>Concentración en U/mg de proteína, ver apéndice. <sup>b</sup>*Nb-C68* corresponde a la clona seleccionada, no inductora de micetoma y catalasa negativa antes de la transformación con pKAT-G.





**Figura 8: Reacción de Peroxidasa:** La reacción se llevó a cabo en una mezcla de amortiguador fosfatos pH 7.4  $H_2O_2$  al 6 % y fue activada por la adición del extracto proteico de cada una de las clonas, en el tubo 1 corresponde al control negativo, sin extracto proteico, el tubo 2 corresponde a un extracto celular de *M. tuberculosis*, el tubo 3 corresponde a *N. brasiliensis* HUJEG-1, el tubo 4 a *Nb-C68* transformada con *pKAT-G* y el tubo 5 corresponde a P61 semipurificada

**6.5 Inducción de micetoma por clonas Nb-C68 transformadas con pKAT-G:** Los resultados obtenidos de la evaluación de inducción de micetoma de diferentes clonas que fueron transformadas con pKAT-G y que se restauró la actividad de catalasa se muestran en la Tabla 12, la cual muestra que ninguna clona fue capaz de inducir micetoma en un grupo de 10 ratones BALB/c (Figura 10), a diferencia de la cepa de referencia que si indujo micetoma después de los 28 días de la infección (Figura 9). La clona *Nb-C68T-4* solo fue capaz de inducir o estimular un proceso inflamatorio intenso, pero según los criterios mencionados por Salinas-Carmona y col. (120), no llegó a considerarse micetoma.



**Figura 9. Cojinete plantar de la pata de un ratón BALB/c infectado con *N. brasiliensis* HUJEG-1. Una dosis de  $10^5$  bacterias/0.1mL de *N. brasiliensis* HUJEG-1 fueron inoculadas en el cojinete plantar de un ratón BALB/c. El micetoma se desarrolló al día 28 después de la infección, el proceso inflamatorio y granulomatoso además de la congestión vascular que se clasifica con 3+ según los criterios de evaluación clínica.**



**Figura 10. Cojinete plantar de la pata posterior de un ratón BALB/c infectado con Nb-C68:** El cojinete plantar del ratón BALB/c es normal, este fue inyectado con 0.1 mL de una suspensión bacteriana de Nb-C68 ( $10^6$  bacterias/mL), obtenida después del tratamiento con EMS. El cojinete plantar solo muestra un pobre proceso inflamatorio y congestión vascular, no presenta desarrollo de micetoma, catorce días después de la inyección y 28 días después no desarrollo micetoma.

TABLA 12

## Evaluación de la inducción de micetoma por clonas Nb-C68 transformadas con pKAT-G

Días post-infección

Clona transformada	1	2	3	4	7	14	28 <sup>b</sup>	45
<i>Nb-C68T-1</i> <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nb-C68T-2</i>	+	++	+	+	-	-	-	-
<i>Nb-C68T-3</i>	+	++	+	-	-	-	-	-
<i>Nb-C68T-4</i>	+	++	++	++	++	++	+	-
<i>Nb-C68T-5</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nb-C68T-6</i>	+	++	++	++	++	-	-	-
<i>Nb-C68T-7</i>	+	++	++	++	++	-	-	-
<i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++

<sup>a</sup> *Nb-C68T*, corresponde a la nomenclatura dada a las clonas obtenidas a partir de la clona mutada no inductora de micetoma *Nb-C68*. <sup>b</sup> Un micetoma es considerado positivo cuando al día 28 post-infección con *N. brasiliensis*, posee ++++ como criterio de evaluación clínica del micetoma experimental. Salinas –Carmona (120).

## **6.6. Southern-blot para la identificación del gen que codifica para la catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1:**

**6.6.1 Obtención de una secuencia nucleotídica que codifica para la catalasa de *M. tuberculosis*:** El gen KAT-G que codifica para la catalasa de *M. tuberculosis* se aisló del vector PY214 en el cual se encontraba clonado, la liberación de la secuencia interna que codifica para la catalasa se realizó en presencia de *Bam* HI y *Eco* R V, los fragmentos de digestión se muestran en la Figura 11 A y muestran el esqueleto del vector y tres fragmentos de digestión, los fragmentos de 3.1 y 1.5 Kb fueron aislados y purificados del gel para marcarlos posteriormente con  $\alpha^{32}\text{P}$ , como se muestra en la Figura 11 A, y utilizarlos como sonda en los siguientes pasos del Southern-blot.

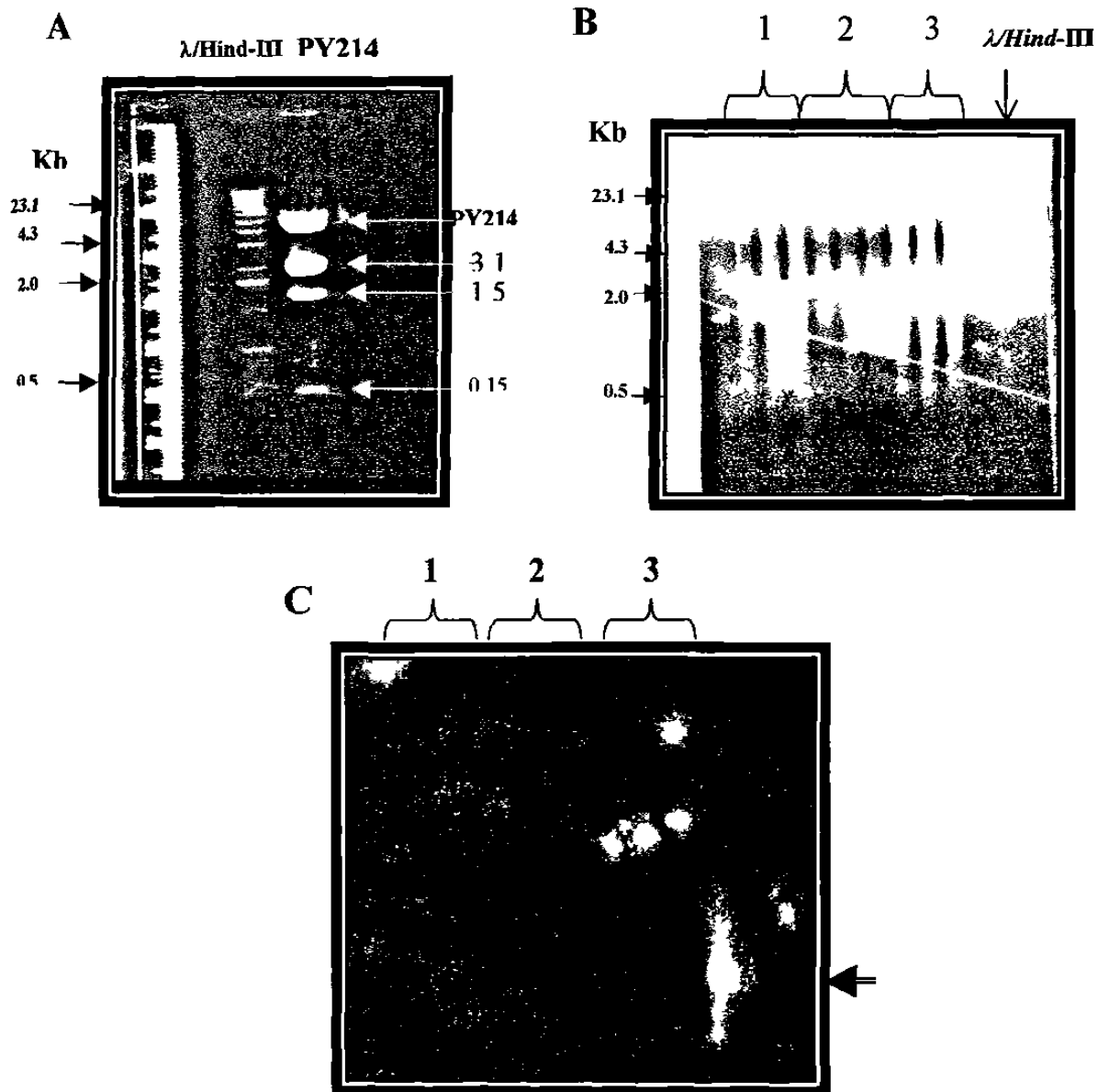
**6.6.2. Digestión del DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con las enzimas *Kpn* I, *Pst* I y *Bam* HI:** Una muestra de los productos de digestión del DNA genómico de *N. brasiliensis* obtenidos por la digestión de las enzimas *Kpn* I, *Pst* I y *Bam* HI, se separaron en un gel de agarosa al 1.0 % y se colocaron en los primeros tres carriles, seguidos por los



La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental  
fragmentos de *M. smegmatis*, como control negativo y después por los de *M. tuberculosis*, este último como control positivo, Figura 11 B. En el carril derecho se aplicó una muestra de la sonda para control de marcaje e hibridación de la sonda, como se muestra en la Figura 11 C. Esto permitió la orientación del gel y la película radiográfica a la vez.

**6.6.3 Autorradiografía:** En la Figura 12 C se muestra el resultado de la autorradiografía, ésta revela la hibridación de la sonda nucleotídica con los fragmentos correspondientes de KAT-G de *M. tuberculosis*, en los tres carriles del número tres de esta misma figura. Los productos de digestión del DNA de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con *Kpn* I, *Pst* I y *Bam* HI resultaron negativos a la hibridación de KAT-G de *M. tuberculosis*, como se muestra en la Figura 12 C.

El Southern-blot se realizó tres veces para cada uno de los fragmentos de KAT-G, 3.1 y 1.5 Kb, en todos los intentos el resultado fue la no hibridación.



**Figura 11: Southern-blot:** A) Gel de agarosa al 1.0 % que muestra los productos de digestión de PY214-KAT-G obtenidos con *BamH-I* y *EcoR-V*, B) Gel de agarosa al 0.8 % conteniendo los fragmentos de digestión de 1) *N. brasiliensis*, 2) *M. smegmatis* como control negativo y 3) *M. tuberculosis* como control positivo, cada línea corresponde a la digestión con *Kpn I*, *Pst I* y *Bam HI* respectivamente para cada DNA geonómico. C) Autorradiografía de los productos de digestión obtenidos e hibridación con KAT-G.  $\leftarrow$  Corresponde a un control positivo de la sonda y orientación de la película radiográfica.



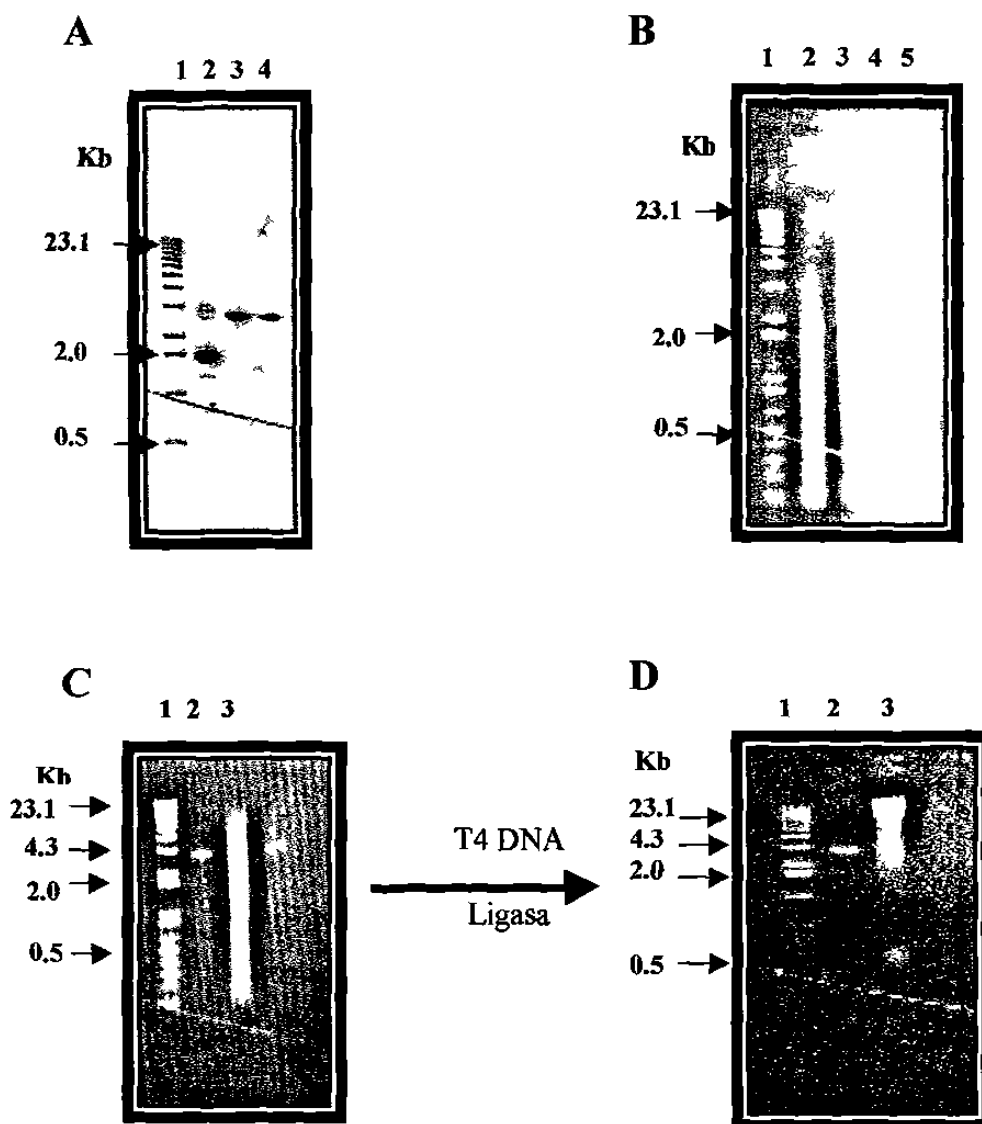
## **6.7. Construcción de una biblioteca genómica de *N. brasiliensis*:**

**6.7.1 Obtención y purificación de PUC-18:** PUC-18 fue propagado en *E. coli* XL-1 Blue y purificado por un método comercial, al mismo tiempo fue digerido y defosforilado con CIP, en cada uno de los procesos se tomó una muestra y en un gel de agarosa al 1.0 % se observó la purificación así como la digestión, como se muestra en la Figura 12 A, los carriles 3 y 4 muestran el producto de digestión con *Bam* HI y el defosforilado con CIP respectivamente.

**6.7.2. Digestión parcial del DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1:** Para obtener un digerido rico en fragmentos en el rango de 1 a 2 Kb se digirió el DNA de *N. brasiliensis* con *Sau3* A1 a diferentes concentraciones cada una de ellas fue separada por electroforesis en gel de agarosa, la Figura 12 en B, muestra cada uno de los digeridos y puede observarse la diferencia entre cada concentración de enzima, los fragmentos que se separaron en el carril tres el cual correspondió a 0.5 U de enzima

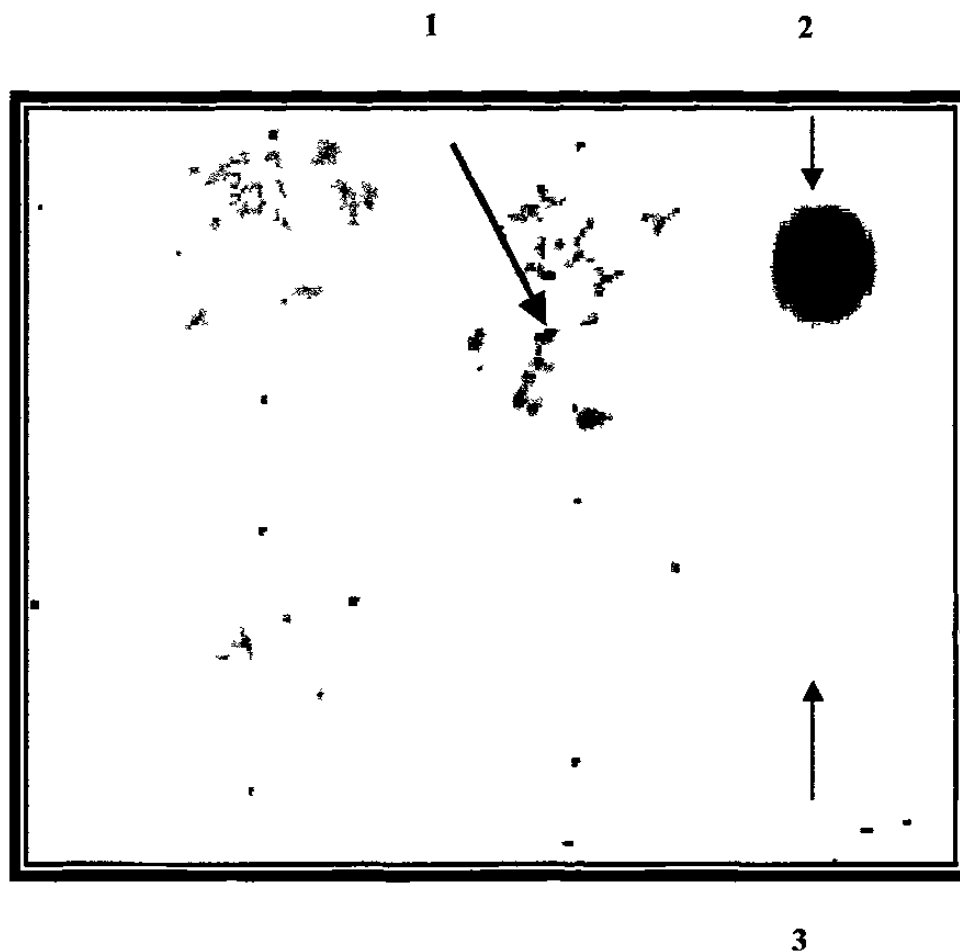
La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental fueron los que se aislaron y purificaron los fragmentos para clonarlos en PUC-18.

**6.7.3. Reacción de ligación con T4:** La ligación de fragmentos del DNA genómico de *N. brasiliensis* en PUC-18 se llevó a cabo en presencia de T4 DNA ligasa, muestras de la reacción de ligación antes y después fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, observándose el efecto de la ligación de los fragmentos en PUC-18, como se muestran en la Figura 12, C y D respectivamente. La mezcla de reacción de ligación fue utilizada posteriormente para transformar *E. coli* XL-1 Blue por electroporación y obtener clonas recombinantes, éstas crecieron en un medio semisólido LB en presencia de ampicilina y X-gal, las colonias blancas fueron analizadas para la búsqueda del inserto que hibridizó con KAT-G.



**Figura 12: Biblioteca genómica, reacción de ligación:** A) Gel de agarosa al 1.0 % que muestra la purificación de PUC-18, así como la digestión con *BamH-I* en el carril 3, el carril 4 corresponde a PUC-18 digerido y defosforilado. B) Los resultados de la digestión parcial del DNA geonómico de *N. brasiliensis* con *Sau3A-I* se muestran en un gel de agarosa al 1.0 %. C) Un corrimiento preliminar del vector y los fragmentos digeridos fueron aplicados a un gel de agarosa al 1.0%, como se muestra en el carril 2 y 3 respectivamente. D) Una muestra de la reacción de ligación, en paralelo con el vector sin ligación fueron analizados en un gel de agarosa.

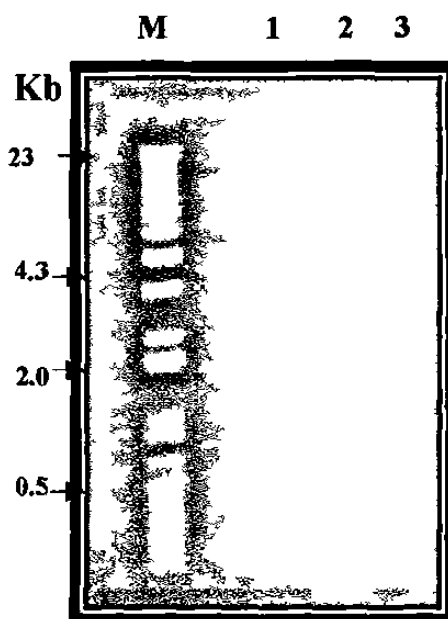
**6.7.4. Tamizaje de la Biblioteca genómica de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con KAT-G  $\alpha^{32}\text{P}$ :** El tamizaje se llevó a cabo por hibridación *in situ* del DNA de la clonas recombinantes en PNC, el DNA se transfirió y desnaturalizó para posteriormente ponerlo en contacto con la sonda marcada con  $\alpha^{32}\text{P}$ , las condiciones de hibridación fueron las mismas que en el Southern blot, en condiciones de alta exigencia a 42°C. El tamizaje se realizó con los fragmentos de 3.1 y 1.5 Kd de KAT-G de *M. tuberculosis* marcados con  $\alpha^{32}\text{P}$ , como se muestra en la Figura 11 A. El cálculo para determinar la eficiencia de transformación de PUC-18 fue de  $1 \times 10^9$  recombinantes por 1 ng de DNA plasmídico. En este análisis un total de 64,000 recombinantes fueron tamizadas, considerando el tamaño de DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ( $\cong 4.0$  Mb), las clonas recombinantes que fueron positivas, como se indica con la flecha 1 en la Figura 13, fueron aisladas y su DNA digerido con *Bam* HI, para la liberación del fragmento, un total de 45 recombinantes fueron reanalizadas por Southern blot y a pesar de liberar un fragmento de diferente peso molecular ninguno híbrido con KAT-G.



**Figura 13: Autorradiografía de recombinantes KAT-G<sup>+</sup> (Tamizaje de la biblioteca genómica):** El DNA de las colonias recombinantes de *E. coli* XI-1 Blue fue transferido a PNC y estas fueron tamizadas en la búsqueda de KAT-G de *N. brasiliensis* con una sonda obtenida de KAT-G de *M. tuberculosis*, marcada con  $\alpha^{32}\text{P}$ . En esta se observan diferentes recombinantes obtenidas por hibridación *in situ* la flecha marcada con 1 muestra algunas de las recombinantes obtenidas, la flecha 2 el control positivo de sonda y la flecha 3 en control negativo sin marcaje, esta se llevó a cabo en una película radiográfica Kodak.

### 6.8. Amplificación por PCR del KAT-G de *N. brasiliensis* HUJEG-1

1: El DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 se sometió a un análisis de PCR, las condiciones de corrimiento se describieron en material y métodos, los resultados del PCR para una muestra de DNA digerido con *Sau3* AI y sin digerir se muestran en la Figura 14, en el carril 1 se observó un producto de amplificación del DNA genómico de *M. tuberculosis* y no se encontró producto de amplificación para *N. brasiliensis* HUJEG-1 digerido con *Sau3* AI y sin digerir, carriles 2 y 3 respectivamente.



**Figura 14: Amplificación por PCR del KAT-G de *N. brasiliensis* HUJEG-1:** Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 0.8 %, el carril M corresponde a marcador  $\lambda$ Hind III, carril 1 contiene el producto de amplificación obtenido del DNA genómico de *M. tuberculosis*, no digerido. Los carriles 2 y tres corresponden al DNA genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 digerido con *Sau3A-1* y no digerido respectivamente.

## CAPITULO 7

### DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó al estudio de la actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 que sabemos que es la proteína inmunodominante de 61 Kd (145).

En los experimentos de mutagénesis con el EMS, logramos obtener clonas mutadas que no indujeron micetoma en los ratones, probando dosis altas o bajas de inóculo de bacterias, como se mencionó en material y métodos, este experimento se realizó en paralelo con una cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 de referencia en la misma cepa de ratones los cuales sí desarrollaron micetoma.

Cabe mencionar, que de las diferentes clonas mutadas aisladas logramos obtener un panel de clonas con diferentes actividades enzimáticas, proteasa y/o catalasa, estas actividades enzimáticas se encuentran presentes en la cepa de referencia inductora de micetoma, la Tabla 9 muestra el

resultado de la evaluación de la inducción del micetoma por diversas clonas positivas y negativas a estas actividades. La clona Nb-C5 presentó las mismas actividades que la cepa de referencia a pesar de lo cual no indujo micetoma, lo cual nos indica que el EMS modificó otras proteínas que pudieran estar involucradas en el daño tisular ocasionado por la infección por *Nocardia*, una diferencia entre estas clonas es que la clona mutada fue susceptible a ampicilina. Con este experimento parecería ser que ni la actividad de proteasa ni catalasa son factores de virulencia sino que pudieran ser factores secundarios menos relevantes, pero éste merece un estudio posterior. La Figura 9 muestra una fotografía del cojinete plantar de un ratón que fue infectado con la cepa de referencia, el desarrollo de micetoma en este ratón fue de 14 días, así como con el resto de animales del grupo, todos desarrollaron la infección hasta por mas de dos años, en esa fecha los ratones fueron muriendo tal vez por viejos y no por la propia infección que se manifestó de forma crónica. La Figura 10 muestra un ejemplo del proceso inflamatorio de uno de los ratones infectados con una clona mutada de *N. brasiliensis*, en estos grupos de animales el proceso no fue mayor a dos cruces ya que solo desarrollaron una inflamación moderada así como congestiónamiento vascular. En todos los experimentos de



La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental inducción de micetoma, los animales de experimentación fueron observados diariamente por 45 días.

La actividad de catalasa de cada una de las clonas fue determinada por tres métodos, los resultados del método directo fueron negativos para las clonas mutadas y positivo para la cepa de referencia lo cual nos indicó la ausencia de la actividad en las primeras, para corroborar y cuantificar la actividad de catalasa, se realizaron pruebas en gel de poliacrilamida que se muestran en la Figura 5, comparadas con la cepa de referencia es notable la ausencia de actividad enzimática. En la Tabla 10 se muestra los resultados de la cuantificación de actividad específica y se observa una gran diferencia en el rango de mil veces menos que la cepa de referencia.

En esta etapa del trabajo obtuvimos clonas mutadas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 no inductoras de micetoma y con actividad de catalasa negativa. La siguiente etapa considerada, fue la restauración de la actividad de esta enzima y debido a la falta de trabajos reportados y enfocados a la obtención de mutantes y/o transformantes de bacterias del género *Nocardia*, seleccionamos uno de los métodos utilizados para el género *Mycobacterium*. Hasta ahora por muchos años se consideró difícil obtener

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental clonas transformadas a partir de Nocardias, pero existen trabajos publicados que mencionan el aislamiento de plásmidos y fagos encontrados en estas bacterias (9), lo cual sugiere que esta transformación existe en la naturaleza en forma espontánea para Nocardias así como para *Mycobacterium* (57 y 106).

Como se mencionó anteriormente existen varias clases de catalasas, la actividad de catalasa de *Mycobacterium tuberculosis* es hasta ahora la única catalasa involucrada como factor de virulencia en la resistencia a la infección (151) y se encuentra relacionada filogenéticamente con el grupo de catalasas de bacterias y plantas (54), es codificada por KAT-G y es bifuncional (catalasa/peroxidasa). Zhang y col., (150) reportaron el método de electrotransformación aplicado a diferentes cepas de *Mycobacterium*, logrando su transformación lo cual resultó ser un avance metodológico para el estudio y regulación de los genes involucrados como factores de virulencia (47, 58, 111 y 135).

Para restaurar la actividad de catalasa en las clonas mutadas de Nocardia , la clona Nb-C68, fue transformada con pKAT-G, la Figura 1 muestra el mapa génico de restricción y la Figura 4 muestra los fragmentos

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental esperados para cada una de las enzimas de restricción, los resultados de la caracterización del vector pKAT-G se muestran en la Figura 4 C y coinciden con los referidos en el mapa de restricción (117).

La clona Nb-C68 fue transformada por el método de electroporación, al igual que las micobacterias, con pKAT-G. Los resultados de la recuperación de la actividad específica de catalasa se muestran en la Tabla 11 y muestra las actividades de catalasa que contenían cada uno de los extractos de proteínas de las clonas transformadas y ninguna clona expresó mas actividad que la de referencia. Esta actividad enzimática fue corroborada por la actividad de catalasa directa en los extractos proteicos de cada una de las clonas transformadas como se muestra en una fotografía en la Figura 6, la actividad en gel de poliacrilamida se muestra en la Figura 7 y esta actividad fue dada por pKAT-G ya que se obtuvieron por extracción alcalina los DNA's plasmídicos de cada una de las clonas y se determinó el patrón de restricción, verificando la presencia del vector así como la actividad de catalasa. La obtención del DNA plasmídico se muestra en la Figura 5. El DNA plasmídico de la clona Nb-C68-T4 transformada digerido con enzimas de restricción para verificar el patrón de restricción y coincidió con el pKAT original.

Con los anteriores resultados demostramos que *N. brasiliensis* es una bacteria en la que podemos introducir material genético, obteniendo una alta eficiencia de transformación, con los métodos aplicados al género *Mycobacterium*. (150)

A la fecha no se conocen los mecanismos de virulencia de bacterias del género *Nocardia*, solo se han reportados para *N. asteroides*. Beaman (11 y 12) ha propuesto un mecanismo de virulencia dado por la SOD y no por la catalasa, ya que esta última varía en su expresión dependiendo del tiempo de crecimiento en cultivo (81 y 95), esta expresión sucede en diferentes microorganismos (24, 67 y 95), y parece ser según reportes que la actividad de algunas enzimas para actuar como factores de virulencia difieren ampliamente entre la fase logarítmica primaria y la estacionara además de ser específica para cada microorganismo. (112 y 142)

La actividad de catalasa de varias clonas transformadas fueron determinadas para evidenciar la expresión del gen. La Figura 6 muestra la actividad de varias de ellas, determinada en extractos de proteínas obtenidas de cada una de las clonas, todas fueron positivas en diferentes intensidades,

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental estas diferencias pudieran ser debido a diferencias en la incorporación del plásmido, este fenómeno fue también observado cuando cepas de *Mycobacterium tuberculosis* fueron transformadas (151), la Figura 7 I B, muestra la actividad de catalasa determinada en gel de poliacrilamida, del extracto de proteínas de *N. brasiliensis* HUJEG-1, parece ser que presenta dos bandas de actividad de catalasa, lo cual no descarta la posibilidad de que *Nocardia* posea dos catalasas. Para investigar esta posibilidad se requieren analizar en *N. brasiliensis* la expresión de la actividad de catalasa en base al tiempo de crecimiento en cultivo, determinar en que fase del cultivo se encuentra en mayor concentración.

La Tabla 11 muestra las actividades de catalasa que se restauró por transformación de la clona mutada y como producto en las recombinantes analizadas se obtuvieron diferencias en la actividad de catalasa que contenían cada uno de los extractos de proteínas de las clonas transformadas además ninguna clona expresó mas actividad que la de referencia.

Vera y col., (144), publicaron la secuencia nucleotídica parcial del gen que codifica para la catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1, de hecho

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental mencionan que la P61 inmunodominante de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-

1 es catalasa positiva y que no presenta actividad de peroxidasa. En el presente trabajo buscamos la actividad de peroxidasa en un extracto de proteínas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 la cual no fue posible evidenciarla en gel de poliacrilamida por el método de Wayne-Díaz, como el utilizado en el citado trabajo de Vera y col., pero si fue posible en una reacción directa en presencia de la 3',3'DAB en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la Figura 8 muestra la actividad de peroxidasa positiva del extracto crudo de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en el tubo 3 y es reconfirmada por la reacción positiva de la P61 semipurificada en el tubo 5, estos resultados confirman la actividad de peroxidasa por P61 de *N. brasiliensis* HUJEG-1. La evidencia de la actividad de peroxidasa da un giro a los estudios hasta ahora para P61, por lo cual a partir de este trabajo debe ser considerada como una proteína bifuncional con actividad de catalasa/peroxidasa y siguiendo la nomenclatura de los genes que codifica para esta proteína correspondiente al gen KAT-G, se propone que sea *NbKAT-G*, el nombre que identifique al gen que codifique para esta proteína, al mismo tiempo se propone que los subsecuentes estudios sean encaminados no solo a la actividad de catalasa sino en paralelo a la actividad de peroxidasa ya que hasta donde se conoce esta actividad es la responsable de degradar los radicales nitritos que se

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental derivan del metabolismo de la arginina y juegan un papel importante en la respuesta bactericida en la célula huésped. (5,6). Desde este punto de vista se abre una línea de investigación para esta proteína.

Los resultados de la inducción del micetoma por clonas Nb-C68 transformadas con pKAT-G y que restauraron la actividad de catalasa se presentan en la Tabla 12, estos resultados muestran que ninguna de las clonas fue capaz de inducir micetoma en ratones BALB/c, solo la Nb-C68-T4 fue capaz de inducir un fuerte proceso inflamatorio en todos los ratones del grupo que fueron infectados con esta clona, sin embargo no cumplió con los criterios establecidos y no indujo un micetoma completo a los 28 días después de la infección.

Estos últimos experimentos apoyan los trabajos de Zhang y col., (150 y 151), donde reportan que KAT-G es un factor de virulencia por su participación en la activación de la INH como pro-droga, así como la modulación de esta por otros factores secundarios como KAT-E y KAT-F (20), ellos reportaron que cuando *E. coli* catalasa negativa es transformada con KAT-G la cepa no adquiere la virulencia de *M. tuberculosis* cuando es inyectada en ratones, pero cuando las cepas son catalasas negativas y

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental  
resistentes a tratamiento con INH y son transformadas con KAT-G se recupera la actividad de catalasa y se restaura la susceptibilidad a la INH. En este trabajo fue posible la restauración de la actividad de catalasa en *Nocardia* pero no así la capacidad de inducir micetoma en ratones BALB/c. Por lo anterior la actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 parece no estar directamente involucrada con la capacidad de inducir micetoma en ratones BALB/c.

Es importante enfatizar que la comparación de estos experimentos con los antes mencionados no define totalmente la falta de actividad de catalasa como factor de virulencia para *Nocardia brasiliensis*, pero es importante mencionar que la actividad de catalasa hasta ahora reportada para muchos microorganismos no es un factor de virulencia, solo actúa como regulador y/o modulador de los mecanismos de detoxificación de radicales que a su vez son generados por otras vías metabólicas. La actividad de la SOD en *N. asteroides* es una de las reacciones directamente relacionada ya que se ha determinado que se encuentra en la zona periplásmica y parece ser que es más importante en el establecimiento de la infección que la actividad de catalasa (11,12).



La obtención de nuevas proteínas con actividad de catalasa llegan hasta el año de 1997, a 70 proteínas purificadas, aisladas y además se conoce la secuencia nucleotídica parcial o total del gen que codifica para cada una de éstas. Para el género *Nocardia* existen diferentes reportes que facilitan la obtención de material genético (137), para estudiar el genoma de estas bacterias que así como se ha podido determinar los genes responsables de la virulencia de varios microorganismos pueda ser este el inicio para la búsqueda de los genes involucrados en la inducción del micetoma (16, 39 y 105).

Los estudios filogenéticos realizados por Klotz y col., en 1997, colocan a la catalasa de *M. tuberculosis* en el grupo de catalasas de hongos y bacterias, en el cual esta incluida además la catalasa de *E. coli* la cual tienen una secuencia homóloga del 65% aproximadamente (54), ambas bacterias poseen dos catalasas una monofuncional y otra bi-funcional (catalasa/peroxidasa), esta última fue reportada como un factor de virulencia para *M. tuberculosis*, y ha sido estudiada por mutagénesis sitio dirigida para analizar los sitios nucleotídicos responsables de la actividad enzimática (21, 111 y 117).

En *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 conocemos que la proteína con actividad de catalasa es un antígeno inmunodominante en ratones y humanos y posee un peso molecular de 61 Kd, en este trabajo obtuvimos clonas mutadas con actividad de catalasa negativa y no inductoras de micetoma en ratones BALB/c, logramos además transformar y restaurar la actividad de catalasa en clonas mutadas que a su vez fueron no inductoras de micetoma, lo cual sugiere fuertemente que la actividad de catalasa en *N. brasiliensis* no es un factor de virulencia en forma directa sino que tal vez el tratamiento del EMS modificó otras proteínas y esto contribuya a la falta de capacidad para inducir micetoma, como se ha reportado para la catalasa de otros parásitos (151).

Este trabajo apoya la no-participación de la actividad de la catalasa como factor de virulencia ya que las cepas que recuperaron la actividad de catalasa al ser transformadas con KAT-G no indujeron micetoma, sin embargo es necesario enfatizar que la restauración de la actividad de catalasa se realizó con un gen heterólogo proveniente de *M. tuberculosis*, por lo cual se realizaron algunos experimentos para tratar de aislar el gen que codifica para la catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 y así poder restaurar en las clonas mutadas la actividad de catalasa expresada por el gen

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental de este Actinomiceto. Los resultados que obtuvimos por Southern-blot muestran que no hubo hibridación en ninguna de las dos sondas obtenidas de KAT-G, como se muestra en la Figura 11. Otro intento para aislar el gen fue la construcción de una biblioteca genómica de *N. brasiliensis* HUJEG-1, esta se construyó en PUC-18 con fragmentos del rango de 1 a 2 Kb, como se muestra en la Figura 12 C y D, las recombinantes obtenidas por la transformación de *E. coli* XL-Blue con PUC-18 con inserto del DNA genómico de *N. brasiliensis* fueron tamizadas con las mismas sondas que se utilizaron en el Southern blot y el resultado fue que tampoco hubo hibridación *in situ*. Un último intento por aislar el gen fue buscar un producto de amplificación del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 por PCR, esto fue utilizando el DNA genómico digerido con la enzima *Sau3* A1 y sin digerir, este método aumenta las posibilidades de encontrar un producto de amplificación ya que los iniciadores implicados en el estudio fueron específicos para el KAT-G de *M. Tuberculosis*; la Figura 14 muestra el resultado de este experimento en el que solo se encontró el producto de amplificación para KAT-G de *M. tuberculosis*.

Los experimentos antes mencionados sugieren que el gen KAT-G de *M. tuberculosis* parece ser diferente al gen que codifica para la

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental catalasa/preoxidas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (NbKAT-G) como se sugirió anteriormente. En las condiciones experimentales utilizadas no fue posible establecer la actividad de catalasa como un factor de virulencia además de encontrar que el gen NbKAT-G es diferente al gen MtbKAT-G, por lo cual sería recomendable evaluar la búsqueda del gen de la *N. brasiliensis* en condiciones de menor exigencia y tal vez con un grupo de secuencias nucleotídicas relacionadas a las catalasas.

Además para la búsqueda de genes involucrados en la virulencia de la infección por *N. brasiliensis* HUJEG-1 se recomienda aplicar otros estudios de hibridación *in situ* en condiciones diferentes de exigencia, sin formamida y a diferentes temperaturas de hibridación, utilizadas en este trabajo. Otra alternativa con métodos más avanzados tecnológicamente son los reportados por Pfeifer (120). Ellos reportaron tres métodos basados en la clonación de fragmentos genómicos en diferentes vehículos de expresión; a saber el IVET (in vivo expresión Technologies), el DFI (diferencial fluorescence induction) y STM (signature-tagged mutagenesis), este último de los más utilizados. Estos métodos de análisis han permitido una mayor y mejor disección de los genes involucrados como factores de virulencia para algunas bacterias (17, 101 y 102). Para poder realizar los

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental  
estudios antes mencionados en *N. brasiliensis* HUJEG-1, se cuenta con una biblioteca genómica en *E. coli* XL-1 Blue transformada con PUC-18 que contiene insertos del DNA genómico de ésta bacteria, de donde se pueden tamizar los genes de interés de esta especie bacteriana.

Es importante mencionar que como producto de este trabajo se cuenta con una colección de cepas mutadas no inductoras de micetoma y que pueden ser analizadas para determinar que otras propiedades además de la catalasa resultaron alterados, con el propósito de identificar posibles factores de virulencia.

## CAPITULO 8

### CONCLUSIONES

- 1- Con el uso del EMS fue posible eliminar la actividad de catalasa de la cepa HUJEG-1 de *N. brasiliensis*
- 2- En la inducción del micetoma por *N. brasiliensis* HUJEG-1, la actividad de catalasa no se requiere, por lo cual no representa un factor de virulencia en esta bacteria.
- 3- KAT-G de *M. tuberculosis* no es capaz de restaurar la virulencia en *N. brasiliensis* HUJEG-1 que perdieron la actividad de catalasa por el tratamiento con EMS.
- 4- La proteína inmunodominante de 61 Kd, de *N. brasiliensis* HUJEG-1, es una proteína bifuncional que posee actividad de catalasa y peroxidasa.
- 5- La hipótesis propuesta: “La actividad de catalasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 es un factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental“, es rechazada.

## CAPITULO 9

### BIBLIOGRAFÍA

1. Adair, J.C., Beck A.C., Apfelbaum R.I., Barninger J.R: Nocardial cerebral abscess in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Neurol. 1997,44:548-550.
2. Aebi H: Method en der enzymatischen, Bergmeyer(de). Analyze. 3<sup>rd</sup> de Weinheim. 1973, 255-479.
3. Alcendor D.J., Chapman G.D., and Beaman B.L: Isolation, sequencing and expression of the superoxide dismutase-encoding gene (sod) of *Nocardia asteroides* strain GUH-2. Gene. 1995, 164(4): 143-147.
4. Akporiaye E.T. and Baca O.G: Superoxide anion production and superoxide dismutase and catalase activities in *Coxiella burnetii*. J. of Bacteriology. 1983, 154(1): 520-523.
5. Alban P.S. and N.R. Krieg: A hydrogen peroxide resistant mutant of *Spirillum volutans* has NADH peroxidase activity but no increased oxygen tolerance.: J. Microbiology .1998, 44: 87-91.

6. Alcorn T.M., Zheng H.Y. Gunther M.R. Hassett D.J., and Cohen M.S: Variation in hydrogen peroxide sensitivity between different strains of *Neisseria gonorrhoeae* is dependent on factors I addition to catalase activity: Infection and Immunity 1994, 62(5): 2138-2140.
7. Altamirano M., Marostenmaki J., Wong A., Fitzgerald M., Black W.A., and Smith J.A: Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates: J. Infection Disease. 1994, 169(5): 1162-1165
8. Andreas J. Bäumlér and Fred Heffron: Microbial resistance to Macrophage effectors functions: strategies for evading microbicidal mechanisms and scavenging nutrients within mononuclear phagocytes: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogenesis, 2<sup>nd</sup>, Ed, Edited by J.A. Roth et.al. 1995 ASM. Washington D.C, pp: 115-131
9. Andrzejewski J, and Pietkiewicz D: [Isolation of bacteriophages from lysogenic *Nocardia asteroides* strains]: Zentralbl. Bakteriologie. 1972, 219:366-369.
10. Ausbel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D: D. Seideman J.G: Short protocols in molecular Biology. 2<sup>nd</sup> ed. 1992;1-16
11. Beaman, B.L., Black C.M., Doughty F and Beaman L: Role of



- La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental
- superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbial activities of human polymorphonuclear neutrophils: *Infection and Immunity* 1985, 47(1): 135-141.
12. Beaman L and Beaman, B.L: Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infection and Immunity* 1990, 58(9): 3122-3128
  13. Beaman B. L., Gershwin M.E, Aahmed S.M., Scates and Deem R.L: Responses of CBA/N X DBA/F1 mice to *Nocardia asteroides*. *Infection and Immunity* 1982, 35:111-116.
  14. Beaman L., Paliescheskey M., and Beaman B.L: Acid phosphatase stimulation of the growth of *Nocardia asteroides* and its possible relationship to the modification of lysosomal enzymes in macrophages: *Infection and Immunity*.1988, 56(6): 1652-1654.
  15. Beckman J.S., Minor R.L., With C.W., Repine J.E., Rosen G.M., and Freeman B.A., Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance: *J. Biol. Chem.* 1988, 263(14): 6884-6892
  16. Biehle J.R., Cavalieri S.J. Felland T., and Zimmer B.L: Novel method for rapid identification of *Nocardia* species by detection of preformed enzymes: *J. of Clinical Microbiology*. 1996, 34(1): 103-107.

17. Bishai, W.R., Howard, J.A. Winkelstein and H.O. Smith: Characterization and virulence analysis of catalase mutants of *Haemophilus influenzae*: Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins School of Medicine.
18. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: Annual Biochemical. 1976, 72:248-254
19. Bourgeois L. and Beaman B.L: In vitro spheroplast and L-form induction within the pathogenic nocardiae: J. Bacteriology. 1976, 127(1): 584-594.
20. Brandypadhyay P., and Steinman H.M: *Legionella pneumophila* Catalase-Peroxidase: Cloning of the *kat-B* Gene and Studies of Kat-B Function: J. of Bacteriology. 1998, 180(20): 5369-5374.
21. Bravo J., Mate M.J., Schneider T., Switala J., Wilson K., Lowen P.C., and Fita I: Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution: Proteins. 1999, 34(2): 155-166.
22. Brown-Peterson N.J., and Salin M.L: Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: characterization of some unique properties of the halophytic enzyme: J. of Bacteriology. 1993, 175(13): 4197-4202.
23. Bubert, A., Riebe J., Norbert. S., Arno. S., Werne. G., and Peter. S.

- Isolation of Catalase-Negative *Listeria monocytogenes* Strains from Listeriosis Patients and Their Rapid Identification by Anti-p60 Antibodies and/or PCR: *J. of Clin. Microbiol.* Jan.1997, 35:179-183.
24. Calera J.A., Paris S., and Monod M., Hamilton A.J., Debeaupuis J.P., Diaquin M., Lopez-Medrano R., Leal F., and Latge J.P: Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*: *Infection and Immunity* 1997, 65(11): 4718-4724.
  25. Carriere C., Marchandin H. Andrieu J.M., Vandome A., and Perez C: *Nocardia* Thyroiditis: Unusual Localization of Infection.: *J. of Clinical Microbiology.* 1999, 37(7):2323-2335.
  26. Cerbon J: Taxonomic analysis of *Nocardia*.: *Rev. Latinoam. Microbiol. Parasitol (Mex)* 1967, 9(2):65-68.
  27. Chang Y.C., Holland S.M., Miller G.F., and Kwon-Chung: Virulence of Catalase-deficient *Aspergillus* in p47phox Mice Implications for Fungal Pathogenicity and Host Defense in Chronic Granulomatous Disease: *J. Clin. Invest.* 1998, 101(9):1843-1850.
  28. Chiang S.L., Mekalanos J.J., and Holden D.W: In vivo genetic analysis of bacterial virulence: *Ann Rev. Microbiol.* 1999, 53:129-154.
  29. Clements M.O., Watson S.P., and Foster S.J: Characterization of the mayor superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in

- La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental
- starvation survival, stress resistance, and pathogenicity: J. of Bacteriology. 1999, 181(13): 3898-3903
30. Colon L.S., Jimenez N.M., Zlotnik H: Properties of a partially purified acid phosphatase from pathogenic *Nocardia brasiliensis*: Mycopathologia 1992 May; 118(2):85-93.
31. Connell N.D: Mycobacterium: isolation, maintenance, transformation, and mutant selection.: Methods Cell Biol. 1994, 45:107-125.
32. Cyde M. C. 1964. Los hongos y el hombre. 2ª Ed. Interamericana 155.
33. Dallmier A.W., and Martin S.E: Catalase and superoxide dismutase activities after heat injury of *Listeria monocytogenes*: Appl. Environment. Microbiol. 1988, 54(2):581-582
34. Dallmier A.W., and Martin S.E: Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride: Appl. Environment. Microbiol. 1990, 56(9):2807-2810.
35. Divo, A.1977. Microbiología Médica. 3ª ed. Ed. Interamericana, pp.: 377-380.
36. Deem, R. L., Beaman and M.E. Gershwin: Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice.: Infection and Immunity. 1982, 38:3; 914-920.

37. Deretic V., Philippe W., Dhandayuthapani S., Mudd M.H., Curcic R., Garge T. Heym B., Via L.E., and Cole S.T: Mycobacterium tuberculosis is a natural mutant with an inactivated oxidative –stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazida: Mol. Microbiology 1995, 17:889-990.
38. Elliner, J., A. Morrissey.1990. Tropical and Geographical Medicine. 2ª ed. Ed.Mc. Graw Hill. Cap. 109: 975-981.
39. Emeruwa A.C: Immunological analysis of cells of Nocardia at various developed stages during morphogenesis: Ann. Microbiol. (Paris). 1980, 131:249-254.
40. Escuyer V., Haddad N., Frehel C., and Berche P: Molecular characterization of a surface-exposed superoxide dismutase of Mycobacterium avium: Microb. Pathog. 1996, 20(1):41-55
41. Fairfield A.S., Eaton J.W., and Messhnick S.R.: Superoxide dismutase and catalase in the murine malaria, *Plasmodium berghei*: content and subcellular distribution: Arch. Biochem. Biophys. 1986, 250(2):526-529.
42. Felice G.A: Resistance of *Nocardia asteroides* to oxygen-dependent killing by neutrophils: J. Infection Disease. 1983, 148(5):861-867.

43. Felice. C. A., Beaman B. L: Effects of human neutrophils and monocites on *Nocardia asteroides*. J. Inf. Dis. 1990,131:665-672.
44. Ferrazoli L., Palaci M., Silva Telles M.A., Ueki S.Y., Kritki A., Marques L.R.M., Ferreira O.C., and Riley L.W: Catalase Expression, *kat-G*, and MIC of Isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Sao Paulo, Brazil: J. of Infection Disease. 1995, 171:237-240.
45. Folb, P.I., Jaffe and G.Altman. 1976. *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infection in mice. Infect. And Immun. 13:1490-1496.
46. Folb, P.I., A. Timme and Horowitz.1977. *Nocardia* infection in congenitally athymic (nude) mice and other inbred mouse strains. Infect. And Immun. 18: 459-466.
47. Foley-Thomas E.M., Whipple D.L., Bermudez L.E., and Barletta R.G: Phage infection, transfection and transformation of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium paratuberculosis*: Microbiology. 1995, 141 (Pt 5): 1173-1181.
48. Franzon V.L., Arondel J., and Sansonetti P.J: Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexnerii* pathogenesis: Infection and Immunity 1990,58(2):529-535.

49. Gebhardt, P.L. 1972 . Microbiología. 4<sup>a</sup> ed. Ed. Interamericana, pp:338-339.
50. Gliesche C.G: Transformation of methylotrophic bacteria by electroporation: Can. J. Microbiology 1997, 43:197-201
51. Goodfellow, M., J. Zakrzewska-Czerwinska., E.G. Thomas., M. Morda`ski., A.C. Ward, and A.L. James. 1991. Polyfasic taxonomic study of the genera *Gordona* and *Tsukamurella* including the description of *Tsukamurella trasvaliensis* spp. Nov. Zbl. Bakt: 275: 162-178.
52. González-Ochoa, A. 1975. Geografía de micosis profundas. Rev. Inv. Salud Publica (México). 35:85-96.
53. González-Ochoa A., H. Shibayama, D. Felix and M. Anaya.1962. Immunological aspects of actinomycotic mycetoma and nocardiosis. Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 55:542-551.
54. Guan L., and Scandalios J.G: Molecular Evolution of Maize Catalases and Their Relationship to Other Eukaryotic and Prokaryotic Catalases: J. of Molecular Evolution. 1996, 42:570-579.
55. Gupta, R., V. Pancholi, V.K. Vinayak and G. K. Khuller. 1985: Immunological response to protein , carbohydrates and lipid fraction of *Nocardia asteroides* in mice. J. Med. Microbiol: 20:263-274.

56. Gupta, R., V. Pancholi, V.K. Vinayak and G. K. Khuller. 1985: Protective immunity to systemic nocardiosis in mice immunized with cell extrac antigens of *Nocardia asteroides*: Med. Microbiol. Immunol: 174:157-166.
57. Hall B., Baldwin J., Rhie H.G., and Dennis D: Cloning of *Nocardia corallina* polyhydroxalkanoate synthase gene and production of poly-(3-hydroxybutyrate-3- hydroxyhexanoate) and poly-(3- hydroxyvalerate-3- hydroxyheptanoate): Canadian J. Microbiology. 1998, 44(7):687-691.
58. Harvill E.T., and Miller J.F: Manipulating the host to study bacterial virulence: Current Opinion in Microbiology 2000. 3:93-96.
59. Hillar A., Peters B., Loboda A., Zhang H., Mauk G. A., and Lowen P. C: Modulation of the Activities of Catalase-Peroxidase HPI of *Escherichia coli* by Site-Directed Mutagenesis: Biochemistry . 2000, 39:5868-5875.
60. Howard J. G., F.Y. Liew C. Hale, and S. Nicklin. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes:1984, 132:450-455.



61. Inaoka T., Matsumura Y., and Tsuchido T.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*: J. of Bacteriology. 1998, 180(14): 3697-3703.
62. Ito M., Suzuki H., Nakano N., Yamashita N., Sugiyama E., Maruyama M., Hocino K and Yano S: Superoxide anion and hydrogen peroxide release by macrophages from mice treated with *Nocardia rubra* cell-wall skeleton: inhibition of macrophage cytotoxicity by a protease inhibitor but not by superoxide dismutase and catalase: Gann. 1983, 74(1):128-136.
63. Jaber M., Rattan A., and Kumar R: Presence of katG gene in resistant *Mycobacterium tuberculosis*: J. Clinical Pathology. 1996, 49(11): 945-947.
64. Jacobs W.R., Tuckman M., and Bloom B.R: Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle plasmid: Nature 1987, 17(6122):532-535.
65. Jimenez. N. M., and., Zlotnik H: Acid phosphatase activity in *Nocardia brasiliensis* and *Nocardia asteroides*; PR Health Sci. J. 1988. 7(1):39-42.
66. Johnsson K., Froland W. A., and Schultz P.G: Overexpression, Purification, and Characterization of the Catalase-Peroxidase Kat-G from *Mycobacterium tuberculosis*: J. of Biological Chemistry. 1997,

67. Johnson S.R., Steiner B.M., Cruce D.D., Perkins G.H., and Arko R.J: Characterization of catalase-deficient strain of *Neisseria gonorrhoeae*. Evidence for the significance of catalase in the biology of *N. gonorrhoeae*: *Infection and Immunity* 1993, 61(4): 1232-1238.
68. Kagaya K. Miyakawa Y., Watanabe K., and Fukazawa Y: Antigenic role of stress-induced catalase of *Salmonella typhimurium* in cell-mediated immunity: *Infection and Immunity* 1992, 60(5): 1820-1825.
69. Khelef N., DeShazer D., Friedman R.L., and Guiso N: In vivo and in vitro analysis of *Bordetella pertussis* catalase and Fe-superoxide dismutase mutants: *FEMS Microbiol. Lett.* 1966, 142(2-3):231-235.
70. Klotz, M.G. Klassen G. R. and Lowen P.C: Phylogenetic relationships Among Prokaryotic and Eucaryotic Catalases: *Mol. Biol. Evol.* 1997, 14(9):951-958
71. Kelley.Li Z., CollinsF., Rouse D., and Morris S: Expression of katG in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs: *J. Infect. Dis.* 1998 Apr. 177(4):1030-1035.
72. Kenneth, S.W. and A.F. Mahmoud 1984. Tropical and geographical

---

La actividad de catalasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 como factor de virulencia en la inducción del micetoma experimental  
medicine. 1ª ed. Ed.Mc. Graw Hill, pp:934-941.

73. Krik J. And J.S. Remington: Resistance to infection with *Nocardia asteroides*: J. Infect. Dis.1975, 131:665-672.
74. Komaid A. Van Gelderen. Duran E.L: Acid and alkali as aids in differentiation of pathogenic *Nocardia* and for their isolation from clinical specimens. Mycophatologia 1991 Mar;113(3)133-137.
75. Laemlii, V.K: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4: Nature 1970. 227: 680-685.
76. Laurence M. J., M. D: Molecular mechanisms of virulence and immunity of selected bacterial pathogens: Medicine/Chaning Labs: Chapter 20 pp428-446.1998.
77. Lechavelieer H. A., N. S. Mair, and M.E. Sharpeand. 1986.Bergey`s manual of Systemic Bacteriology. 1ª ed. The Williams and Wilkins. 2: 1458.
78. Licon. T. A., Salinas M. C. Estudio de la inmunogenicidad de las proteasas de *Nocardia brasiliensis* y su efecto inductor de protección en el micetoma experimental en ratones BALB/c. 1997. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

79. López Martínez R., Méndez Tovar L. J., Lavalle P., Welsh O., Saul A., and Macotela Ruiz E: [Epidemiology of mycetoma in México of 2105 cases]: Gac. Med. Mex. 1992, 128(4):477-481.
80. Lowen P.C: Probing the structure of catalase HPII of *Escherichia coli*, a review: Gene . 1996, 179(1): 39-44
81. Lowen P.C., Switala J., and Triggees-Raine B.L.: Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently: Arch. Biochemical Biophysics. 1985, 23(1):144-149
82. Lugosi L., Jacobs W.R., and Bloom B.R.: Genetic transformation of BCG.: Tubercle. 1989, 70(3):159-170
83. Lygren S.T., Closs O., Bercouver H., and Wayne L.G: Catalase, peroxidases, and superoxide dismutase in *Mycobacterium leprae* and other mycobacteria studied by crossed immunoelectrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis: Infection and Immunity 1986, 54(3):666-672.
84. McFadden J: Recombination in *Mycobacterium*: Mol. Microbiol. 1996 , 21(2):205-211.

85. McManus D.C. and Josephy P.D: Superoxide dismutase protects *Escherichia coli* against killing by human serum: Arch. Biochem. Biophys. 1995, 317(1):57-61
86. Mahe A., Develoux M., Lienhardt C., Keita S., and Bobin P: Mycetomas in Mali: causative agents and geographic distribution: Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996, 54(1):77-79.
87. Mahgoue E. S: Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, nu/nu strain with mycetoma agents: Sabourodia. 1978, 16 : 211-216.
88. Mahgoue E.S. and I.G. Murray. 1973 Mycetoma . Heinemann. London.
89. Manca C., Paul S., Barry C.E., Freedman V.H., and Kaplan G: *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro: Infection and Immunity 1999, 67(1): 74-79.
90. Mariat F. P. Destombes and G. Segretain: The mycetoma: Clinical features, pathology, etiology and epidemiology: Contrib. Mycrob. Immunol. 1977, 4: 1-39
91. Marklund B.I., Mahenthalingam E., and Stokes R.W: Site-directed mutagénesis and virulence assessment of the katG gene of *Mycobacterium intracellulare*: Mol. Microbiol. 1998, 29(4): 999-

92. Martínez Rodríguez Herminia: Aislamiento de posibles mutantes "sin sentido" en una línea celular de mamífero. Tesis con opción al grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 1981.
93. Melendro, E. I., M. F. Contreras, C. Ximenez, A. M. García and L. Ortiz-Ortiz. 1978. Changes in host resistance caused by *Nocardia brasiliensis* in mice: cross protection against *Listeria monocytogenes*. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 57:74-81.
94. Mendez M.C., Ainsa J.A, Martin C., and Garcia M.J: katGI and katGII encode two different catalases-peroxidases in *Mycobacterium fortuitum*: J. Bacteriol. 1997,179( 22): 6880-6886,
95. Miller C.M., Kim Y.C., and Anderson A.J: Cloning and mutational analysis of the gene for the stationary-phase inducible catalase (catC) from *Pseudomonas putidia*: J. of Bacteriology. 1997, 179(16):5241-5245
96. Müller I.T., Pedrazzini, J.P. Farrell, and J. Louis. Ann. Rev. Immunol. 7: 561-578.
97. Mutho N., Nakagawa C.W., and Yamada K: The role of catalase in hydrogen peroxide resistance in fission yeast *Shizosaccharomyces pombe*: Can. J. Microbiology. 1999, 45:125-129.

98. Ndiaye B., Develoux M., Dieng M.T., Kane A., Nadir O., Raphenon G., and Huerre M: Aspects Actuels des Mycétomes au Sénégal a Propos de 109 case: J. Mycol. Med. 2000, 10:140-144.
99. Odenbreit S., B. Wieland and R. Haas: Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain: Abteilung Infektionsbiologie, Max-Planck-Intitut fur Biologie, Tubingen, Germany. 1998.
100. Ortiz-Ortiz,L.,D.E.Parks, J.Sullivan López, and W.O. Weigle. 1979: B-Lynfocyte activation with an extrac of *Nocardia brasiliensis*. Inf. And Immun. 25: 627-634.
101. Pei-jian Zou, Borovok I., Lucana D.O., Müller D., and Schrempf H: The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS: Microbiology. 1999, 145:549-559
102. Pfeifer C.G., Marcus S.L. Steele-Mortimer O., Knodler L.A., and Finaly B.B: *Salmonella typhimurium* Virulence Genes Are Induced upon Bacterial Invasion into Pathogenic and Nonphagocytic Cell: Infection and Immunity 1999, 67(11):5690-5698.
103. Pier A.C., D.V. M., J. R. Thurston. Larsen A. B, D. V. M., M. S: A diagnostic antigen for Nocardiosis: comparative test in cattle with

- Nocardiosis and Mycobacteriosis: Am. J. Vest. Res. 1968, 29(2):397-403.
104. Prieto-Alamo M.J., Abril N., and Pueyo C: Mutagénesis in *Escherichia coli* K-12 mutants defective in superoxide dismutase or catalase: Carcinogenesis. 1993, 14(2):237-244
105. Provost F., Polonelli L. Conti S., Fisicaro P., Gerloni M., and Boiron P: Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex: J. Clinical Microbiology. 1995, 33:8-10.
106. Pulverer G. SchÄtt-Gerowitt., and Schaal K.P: Bacteriophages of *Nocardia asteroides*: Med. Microbiol. Immunol. 1975, 161:113-122.
107. Raynaud C., Etienne G., Peyron P., Lanélle M-A., and Daffé M: Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*: Microbiology. 1998, 144:577-587.
108. Rico, G. R. Ochoa, A. Oliva, A . González-Mendoza, S. M. Walker, and L. Ortiz-Ortiz: Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen specific B-cell: J. Immunol. 1982. 129:1688-1693.
109. Rippon J. W. 1982. Mycetoma. Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. The W.B. Saunders Co. Philadelphia. Ch. 5 p:79-114.



110. Rivas M. C: Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto para la obtención de proteasa caseinolítica. Como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica. U.A.N.L. Septiembre de 1998.
111. Rivera-Marrero C.A., Burroughs M.A., Masse R.A., Vannberg F.O., Leimbach D.L., Roman J., and Murtagh Jr. J.J: Identification of genes differentially expressed in *Mycobacterium tuberculosis* by differential display PCR: *Microbial Pathogenesis*. 1998, 25:307-316.
112. Rocha E.R., and Smith C.J.: Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*: *J. Bacteriology*, Jun. 1995, 177(11):3111-3119.
113. Rood I. J: Virulence genes of *Clostridium perfringens*: *Annual Reviews Microbiology* 1998, 52:333-360.
114. Rosario Sanz, Irma Marín, José A. Ruiz-Quiteria, A. Orden, Dolores Cid, Rosa M. Díez, Silhadi K. S., Ricardo A., and Ricardo de la Fuente: Catalase deficiency in *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius* is associated with natural loss-of-function mutations within the structural gene: *Microbiology*. 2000, 146: 465-475.

115. Rouse D.A., and Morris S.L: Molecular mechanisms of isoniazida resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*: Infection and Immunity 1994, 63: 1427-1433.
116. Ruimy R., Rigel R., Carlotti A., Boiron P., Bernandin G., Monteli H., Wallace R.J., Christian R: *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. Nov., a new species of *Nocardia* which group bacterial strains previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive disease: Int. J. Syst. Bacteriology. 1996 , 46(1):259-264.
117. Saint-Joanis B., Souchon H., Wilming M., Johnsson K., Alzari M.P., and Cole S.T: Use of site-directed mutagénesis to probe the structure, function and isoniazida activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*: Biochemical J. 1999, 338:753-760.
118. Salinas-Carmona M.C., Perez L.I., Welsh O., M. Rodríguez, and Rinaldi M.G: Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis* : J.Mycol. Méd. 1992. 2:183-188.
119. Salinas-Carmona M.C., S.M. Casillas and O. Welsh. 1992. An ELISA for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* in clinical correlation of mycetoma infection: J. of Clinical Microbiology. 1993, 31(11):2901-2906.
120. Salinas-Carmona M.C. and Torres-López E: Role of Passive Humoral Immunity in Experimental Mycetom by *Nocardia brasiliensis*: Annals of the New York Academy of Science. 1996, 797: 263-265.

121. Salinas-Carmona M.C., Tores López E. , Ramos A.I., Licon-Trillo A., and González-Spencer D: Immune Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in an Experimental Model of Actinomycetom in BALB/c Mice: *Infection and Immunity*. 1999, 67: 2428-2432
122. Salinas-Carmona M.C., Vera.L. Welsh, O., and Rodríguez M.A., Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man: *Zbl. Bakt.*1992, 276:390-397.
123. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
124. Sandoval-H. Trujillo. *Actinomicetos Microorganismos de la luz: UAM Xochimilco* 1993.
125. Schnell S. and Steinman H.M: Function and Stationary-Phase Induction of Periplasmic Cooper-Zinc Superoxide Dismutase and Catalase/Peroxidase in *Caulobacter crescentus*: *J. of Bacteriology*. 1995, 177(20):5924-5929.
126. Serrato J. A. y Sandoval A. H. 1992: *Manual de laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos*. Universidad de los Andes, Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico,

127. Sharma A: Subcellular distribution of superoxide dismutase and catalase in human malarial parasite *Plasmodium vivax*: Indian J. Exp. Biol. 1993, 3183:275-277.
128. Shim T.S., Yoo C.G., Han S.K., Shim Y.S., and Kim Y.W: Isoniazid resistance and the point mutation of codon 463 of katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: J. Korean Med. Sci. 1997, 12(2):92-98.
129. Sher. I: CBA/N Immune defective mice; Evidence for the failure of the B cell subpopulation to be expressed: Immunological Rev. 1982. 64:117-136.
130. Sher. I., A.D. Steinberg , A.K. Bering, and W.E. Paul. 1975: X-linked B-lymphocytes immune defect in CBA/N mice: II. Studies of the mechanisms underlying the immune defect: J of Exper. Med. 142:637-650.
131. Sibley L. D., Lawson R., and Weider E: Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*: Mol. Biochem. Parasitol. 1986, 19(1): 83-87.
132. Steingrube V.A., Wilson R.W., Brown B.A., Jost K.C., Blacklock Z., and Wallace R.J: Rapid identification of clinically significant species

- and taxa of aerobic actinomycetes, including Actinomadura, Gordona, Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, and Tsukamurella isolates by DNA amplification and restriction endonuclease analysis: J. Clin. Microbiol. 1997, 35(4):817-822.
133. Steinman H.M., Fareed F., and Weinstein: Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: Function and role in stationary-phase survival: J. of Bacteriology. 1997, 179(21): 6831-6836.
134. Stent G. S: Genética Molecular. 1973, Ed. Omega S. A Barcelona.
135. Takayama K., Schnoes H.K., Armstrong E.L., and Boyle R.W: Site of inhibitory action of isoniazida in the synthesis of mycolic acid in *Mycobacterium tuberculosis*: J. Lipid. Res. 1975, 16(4): 308-317.
136. Tichy M., and Vermeas W: In vivo role of Catalase-Peroxidase in *Synechocystis sp.* Strain PCC 6803: J. of Bacteriology. 1999, 181(6):1875-1882.
137. Torres R.D., Oletta C.A. and Zlotnik H: A rapid and gentle method for isolation of genomic DNA from pathogenic *Nocardia spp*: Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1996 Sep; 3(5): 601-604.
138. Torres-López Ernesto MC: Estudio de la respuesta inmune humoral en el establecimiento y resolución del micetoma experimental: Tesis presentada a la Escuela de Graduados de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L, con poción al grado de Maestro en Ciencias con

Especialidad en Inmunología. 1995.

139. Triana B. G., Morales O. G., Hernández S. C., Fernández L. R., y Piñeiro G. J. C: Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido Dismutasas: Rev. Cubana Invest. Biomed. 14(1).
140. Touati D: The molecular genetics of superoxide dismutase in *E. coli*. Free Radic. Res. Commun. 1991, 12-13 pt (1):379-382.
141. Van-Gelderén de Komaid A: Physiological and pathogenic characteristics of *Nocardia brasiliensis* isolated from human mycetomas. Mycopathologia 1989 Feb;105(2):111-116.
142. Visick J.E., and Clarke S: Rpo-S and OxyR-Independent Induction of HPI Catalase at Stationary Phase in *Escherichia coli* and Identification of rpoS Mutations in Common Laboratory Strains: J. of Bacteriology. 1997, 179(13):4158-4163.
143. Visica C.A., and Beaman B.L: Pathogenic and virulence characterization of colonial mutants of *Nocardia asteroides* GUH-2: Canadian J. Microbiology. 1983, 29(9):1126-1135.
144. Vera-Cabrera L., Jonson W.M., Welsh O., Resendiz-Uresti F., and Salinas-Carmona M.C: Distribution of a *Nocardia brasiliensis*

- Catalase Gene Fragment in Members of the Genera *Nocardia*, *Gordona* and *Rhodococcus*: J. of Clinical Microbiology. 1999, 37(6):1971-1976.
145. Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M.C., Welsh O. And Rodríguez M: Isolation and purification of two immunodominant protein of *Nocardia brasiliensis*. J. Clin . Microbiology. 1992, 30:1183-1188.
146. Wayne L.G. and Diaz G.A: A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels: Anal. Biochem. 1986;157(1):89-92.
147. Welsh O: Mycetoma . Current Concept in Treatment. International J. of Dermatology. 1991, 30(6):387-398
148. Wilks K.E., Dunne K.L., Farrant J.L., Reddin K.M., Gorringer A.R., Langford P.R., and Kroll S: Periplasmic Superoxide Dismutase in Meningococcal Pathogenicity: Infection and Immunity 1998, 66(1):213-217.
149. Wilson T.M., de Lisle G.W., and Collins D.M: Effect of inhA and katG on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*: Mol. Microbiol 1995 Mar; 15(6).1009-1015.
150. Zhang Y. Garbe T., and Young D: Transformation with katG restores isoniazida-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates

resistance to a range of drug concentrations: *Molecular Microbiology*.

1993 , 8(3):521-524

151. Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., and Cole S: The catalase-  
peroxidase gene and isoniazida resistance of *Mycobacterium*  
*tuberculosis*: *Nature*. 1992, 358(6387):591-593

152. Zolg W.J., and Philippi-Schultz S: The superoxide dismutase gene, a  
target for detection and identification of *Micobacteria* by PCR: *J. of*  
*Clinical Microbiology*. 1994, 32:2801-2812.