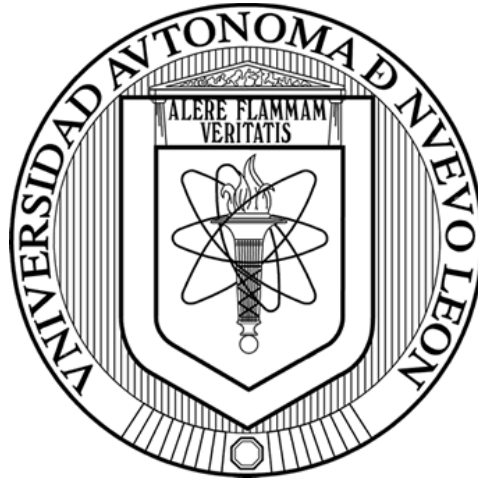


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**"CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE UNA CEPA ATENUADA DE**

***Nocardia brasiliensis* HUJEG-1"**

**Por**

**Q.B.P. Mayra Paola Campos Rivera**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería  
Genética**

**Diciembre, 2012**

**"CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE UNA CEPA ATENUADA DE  
*Nocardia brasiliensis* HUJEG-1"**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DR. C. LUCIO VERA CABRERA**  
Director de Tesis



---


**DRA. C. HERMINIA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Co-director



---

**DRA. C. ROCIO ORTÍZ LÓPEZ**  
Comisión de Tesis

---



---

**Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", y en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Lucio Vera Cabrera y la co-dirección de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindarme salud y la oportunidad de seguir creciendo en el campo profesional y personal.

A mi familia por ser mi principal sostén, por escucharme, quererme y confiar en todo lo que hago.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Dr. Lucio Vera Cabrera por sus consejos y todas sus enseñanzas a lo largo de estos años, gracias por alentarme a siempre mejorar y crecer.

A mi comisión de tesis: la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y la Dra. Rocío Ortiz López por sus comentarios, sugerencias al trabajo, y sus palabras de apoyo hacia mi persona.

Al Dr. Jorge Ocampo Candiani por el apoyo moral y económico para este proyecto y asistencia a congresos.

Finalmente de manera muy especial a mi familia del laboratorio: a las Químicas Wendy Escalante, Anabel Rocha y la Dra. Carmen Molina.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Juan Antonio y María Elena por su apoyo incondicional en mi vida profesional y personal.

A mis hermanos Lizeth y Daniel porque cada día es mejor a su lado, son mi alegría diaria.

A mi abuela, tíos, primos y sobrinos, por su amor, compañía y apoyo en momentos delicados de salud.

A mi pareja, por escucharme y animarme diariamente para cumplir mis metas.

A mi familia de laboratorio: Dr. Lucio Vera, Wendy, Anabel, Carmen, Fania, Alejandra González, Lorena, Irma, Silvia, Juany, Janeth, Carolina, Candelario, Alejandra Barba y mis amigas de CIPTIR: Ivone y Adis, por su amistad y respaldo durante este tiempo.

A mis compañeros del posgrado: Tanya, Grecia, Lizbeth, Martha, Maribel, Gabriela, Yadira, Marcela, Manuel y Sandra por convertirse en mis grandes amigos, gracias por todos los momentos dentro y fuera de clase, los quiero.

A mis profesores, por sus enseñanzas, sugerencias y comentarios para mejorar mi formación académica.

Al M.C. Alan Ipiña y al M.C. Antonio Alí Pérez por la ayuda académica y consejos para la realización de los experimentos del presente trabajo.

A Juany, Ariadna, Norma y Lupita por su amistad, sonrisa diaria, ayuda, con cariño quiero hacer un reconocimiento a su trabajo que es de gran apoyo para nuestra formación.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica por su amabilidad y buen trato, de todo corazón muchas gracias.

A mis compañeros del Servicio de Dermatología tanto administrativos, enfermería y residentes.

A la Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas por inculcarme el amor a la ciencia desde aquel lejano verano de investigación científica, usted es mi ejemplo a seguir.

## ÍNDICE

Contenido	Página
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>ABREVIATURAS</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Agente etiológico.....	2
1.2 Identificación.....	4
1.3 Mecanismos de patogenicidad y virulencia.....	4
1.4 Atenuación.....	5
<b>CAPÍTULO II. ANTECEDENTES DIRECTOS.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO IV. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>15</b>
4.1 Objetivos específicos.....	15
<b>CAPÍTULO V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
5.1 Microorganismo de estudio.....	16
5.2 Cultivo del microorganismo de estudio.....	16
5.3 Extracción del ADN.....	17
5.4 Diseño de iniciadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final.....	18
5.5 Realización de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final.....	19
5.6 Ensayo de Southern blot.....	21
5.7 Fijación del ADN a la membrana por enlaces covalentes.....	22

5.8 Preparación de las sondas por PCR.....	23
5.9 Marcaje de la sonda.....	23
5.10 Hibridación y detección.....	24
5.11 Diseño de iniciadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa tiempo real (qPCR).....	25
5.12 Extracción de ARN total.....	25
5.13 Retrotranscripción.....	26
5.14 qPCR.....	27
<b>CAPÍTULO VI. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
6.1 Detección de cambios en la secuencia nucleotídica de P. 200 en relación a P.0.....	29
6.2 Desarrollo de un método para amplificar por PCR los genes ausentes en P. 200 y presentes en P. 0.....	50
6.3 Determinación de RDNb1, RDNb2 y RDNb3 en los subcultivos (P.0, P.40, P.80, P.100, P.130 y P.200) de <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1 por medio de la técnica de PCR.....	52
6.4 Evaluación por Southern blot de la presencia de los genes en los subcultivos previos de <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1.....	57
6.5 Evaluación de la expresión de los genes de interés por PCR tiempo real.....	60
<b>CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO X. ANEXOS.....</b>	<b>78</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1	Lista de iniciadores utilizados para PCR de punto final..... 18
2	Programa para la reacción de PCR..... 20
3	Estandarización de condiciones para las reacciones de PCR..... 20
4	Programa de las reacciones de PCR para los ensayos de Southern blot..... 23
5	Condiciones de las reacciones de PCR en los ensayos de Southern blot..... 23
6	Iniciadores diseñados para los ensayos de qPCR..... 25
7	Programas para las reacciones de qPCR..... 28
8	Lista de genes pertenecientes al área perdida RDNb1..... 32
9	Lista de genes pertenecientes al área perdida RDNb2..... 36
10	Lista de genes pertenecientes al área perdida RDNb3..... 45
11	Lista de polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism, SNP's) en la secuencia de <i>N. brasiliensis</i> P. 200 con respecto a P.O..... 48

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Evolución natural de la infección por <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1 P. 0 y subcultivos P. 40, P. 80, P. 100 y P. 130 en ratones BALB/c.....	11
2	Mapa de la RDNb1.....	31
3	Ubicación de la delección RDNb2 en el genoma de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.....	34
4	Comparación de los genomas de <i>N. cyriacigeorgica</i> GUH-2 y <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 y su relación con RDNb2.....	34
5	Mapa de la RDNb2.....	35
6	Ubicación de la RDNb3 en el genoma de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.....	43
7	Comparación de los genomas de <i>N. cyriacigeorgica</i> GUH-2 y <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 y su relación con RDNb3.....	43
8	Mapa de la RDNb3.....	44
9	Genes seleccionados de RDNb1 para su amplificación por PCR.....	50
10	Genes seleccionados de RDNb2 para su amplificación por PCR.....	51
11	Genes seleccionados de RDNb3 para su amplificación por PCR.....	51
12	Análisis por PCR de los genes seleccionados de la RDNb1.....	52
13	Análisis por PCR de los genes seleccionados de la RDNb2.....	54
14	Análisis por PCR de los genes seleccionados de la RDNb3.....	55
15	Esquema de los resultados de PCR para las delecciones RDNb1, RDNb2 y RDNb3.....	56
16	Análisis por Southern blot de muestras de ADN de subcultivos de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 para demostrar la presencia del gen O3I_41375 (proteína hipotética) perteneciente a RDNb1.....	57
17	Análisis por Southern blot de muestras de ADN de subcultivos de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 para demostrar la presencia del gen O3I_021945 (catalasa) perteneciente a RDNb2.....	58
18	Análisis por Southern blot de muestras de ADN de subcultivos de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 para demostrar la presencia del gen O3I_006645 ( <i>mce</i> ) perteneciente a RDNb3.....	59
19	Esquema de los resultados obtenidos por PCR y Southern blot para las delecciones RDNb1, RDNb2 y RDNb3.....	59
20	Expresión del gen O3I_021945 (catalasa) en los subcultivos de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.....	60

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
cm	Centímetro
°C	Grados Celsius
dNTP	Dinucleótido trifosfato
Fig.	Figura
g	Gramos
h	Hora
<i>hsp</i>	Proteína de choque térmico
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
RD	Región de diferencia
RDNb1	Región de diferencia de <i>Nocardia brasiliensis</i> 1
RDNb2	Región de diferencia de <i>Nocardia brasiliensis</i> 2
RDNb3	Región de diferencia de <i>Nocardia brasiliensis</i> 3
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
seg	Segundo
SNP	Polimorfismos de nucleótido único
SSC	Buffer de citrato de sodio
TE	Buffer Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
V	Volts
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ M	Micromolar

## RESUMEN

### "CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE UNA CEPA ATENUADA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1"

**Nombre:** Q.B.P. Mayra Paola Campos Rivera.  
**Institución:** Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.  
**Fecha de titulación:** Diciembre del 2012.  
**Páginas en el estudio:** 78.

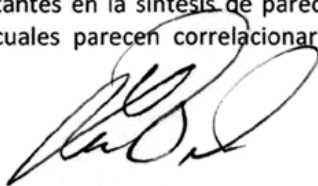
**Introducción:** *Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal de actinomicetoma en nuestro país, sus mecanismos de patogenicidad y virulencia no son del todo conocidos. En un trabajo previo, la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358) fue sometida a subcultivo continuo cada 72 h por 200 veces (P. 200), después de lo cual mostró cambios fenotípicos como disminución de la ácido-alcohol resistencia y producción de filamentos, además de un incremento en la tasa de crecimiento y una deficiencia de ácidos grasos en la pared celular. Se observó además una menor sobrevivencia frente a leucocitos polimorfonucleares humanos y una disminución en la virulencia en el modelo murino BALB/c. El genoma de P. 200 fue sometido a secuenciación en masa usando la plataforma Roche/454 GS (FLX Titanium). En este trabajo comparamos el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 (Número de acceso: NC\_018681.1) y P. 200, lo que nos permitió elucidar los cambios genéticos ocurridos como efecto del subcultivo.

**Objetivo:** Analizar los cambios genéticos asociados a la atenuación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.

**Materiales y métodos:** Se compararon las secuencias genéticas de *N. brasiliensis* P. 0 y P. 200 con el programa Sequencher 5.0 (Gene Codes, MI, EUA) y la herramienta BLAST del NCBI. Con el programa Oligo 6 (Primer Analysis Software Versión 6.40) se diseñaron iniciadores para amplificar algunos genes ausentes en P. 200 y presentes en P. 0; mediante PCR de punto final se determinó la presencia de estos genes en los subcultivos 40, 80, 100, 130, 180, 190 y 200. La presencia de los genes se demostró en los subcultivos también por Southern blot; finalmente se evaluó la expresión del gen O3I\_021945 (catalasa) mediante RT qPCR.

**Resultados:** Se identificaron 3 deleciones denominadas RDNb1, RDNb2 y RDNb3 de ~59.7-kb, ~216.3-kb y ~31.7-kb respectivamente. En conjunto estas deleciones representan una pérdida de 307,793-pb que incluyen 265 genes y equivale a una pérdida del 3.24% del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1. Se encontraron 119 SNP's de los cuales 27 posiblemente afectan genes. Mediante PCR de punto final y Southern blot se observó que la pérdida de RDNb1 ocurrió entre los subcultivos 75 y 80; para RDNb2 esto sucedió entre los subcultivos 155 y 200 y la eliminación de RDNb3 ocurrió entre los subcultivos 65 y 80. Entre los genes que fueron eliminados durante el subcultivo se encuentran el gen O3I\_021945 (catalasa) y un operón de la familia "mammalian cell entry proteins" (mce), ubicados en las deleciones RDNb2 y RDNb3 respectivamente. Estos genes se han asociado en la virulencia de otros microorganismos.

**Conclusiones:** El subcultivo de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 propició la pérdida gradual de fragmentos genéticos que incluyen genes importantes en la síntesis de pared celular, lípidos, así como proteasas, peptidasas, la catalasa y mce, los cuales parecen correlacionar con la pérdida de virulencia de *N. brasiliensis*.



Dr. C. Lucio Vera Cabrera

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El micetoma es una enfermedad infecciosa crónica de la piel que puede ser producida por hongos, o por actinomicetos filamentosos aerobios, en cuyo caso se denomina eumicetoma y actinomicetoma respectivamente. Entre las principales bacterias causales de micetoma se encuentran: *Nocardia brasiliensis*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura madurae* y *Actinomadura pelletieri* (Arenas, 2008, Welsh *et al.*, 2012). En México, los actinomicetos producen el 98% de los casos, de los cuales el 86% son producidos por *N. brasiliensis*, un microorganismo que vive como saprófito del suelo y que predomina en clima tropical húmedo con precipitación pluvial de 600 a 2000 milímetros. (López *et al.*, 1992, Ambrosioni *et al.*, 2010, Salinas-Carmona *et al.*, 2002,).

Los agentes causales del micetoma penetran en la piel, generalmente por inoculación traumática con espinas o astillas de leña, y producen una inflamación localizada que afecta sobre todo las extremidades. La infección por *N. brasiliensis* se localiza en la piel, en el tejido celular subcutáneo y llega a afectar los músculos, los huesos y los órganos adyacentes, aunque también pueden presentar infecciones pulmonares y sistémicas (Saubolle *et al.*, 2003, Young *et al.*, 2002).

La lesión inflamatoria aumenta de volumen en forma lenta pero continua hasta deformar el área afectada; después de meses o años se desarrollan abscesos, úlceras, y fístulas que drenan un material serosanguinolento que contiene microcolonias del agente infeccioso. A este conjunto de bacterias se le conoce como granos o gránulos (Arenas, 2008).

El diagnóstico de micetoma se basa en los signos clínicos descritos anteriormente y se confirma con el aislamiento e identificación del agente microbiano en muestras de cultivo tomadas de las lesiones (Saubolle *et al.*, 2003, Salinas-Carmona *et al.*, 2002).

### **1.1 AGENTE ETIOLÓGICO.**

Los miembros del género *Nocardia* se encuentran asociados a un grupo de microorganismos conocidos como actinomicetos aerobios.

El género *Nocardia* se encuentra distribuido mundialmente, son saprófitos y son un componente importante de la microflora normal del suelo donde tiene un papel importante en la descomposición de materia orgánica como plantas, detritos e insectos (McNeil *et al.*, 1994).

*Nocardia* es un bacilo aerobio, gram positivo, que forma ramificaciones las cuales se fragmentan en formas cocobacilares; es intracelular facultativo y

parcialmente ácido-alcohol resistente. Filogenéticamente se encuentra relacionado con los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Gordonia* y *Tsukamurella* entre otros (Rainey *et al.*, 1995, Goodfellow, 1973).

El género *Nocardia* tiene una pared celular tipo IV, caracterizada por peptidoglicano compuesto por ácido meso-diaminopimérico, arabinosa y galactosa. En *Nocardia asteroides* se ha estudiado la composición de la pared celular, encontrándose que posee 3 capas: la capa interna contiene peptidoglicano y azúcares, mientras que las capas externas poseen péptidos y lípidos (Beaman *et al.*, 1988).

La pared celular de *Nocardia* posee ácidos micólicos de 46-60 carbonos predominando los de 52 carbonos, además de glicolípidos y fosfolípidos. Los fosfolípidos más preponderantes son difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilinositol manósido; También presenta ácidos grasos ramificados y no ramificados, tales como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido heptadecanoico, ácido oleico y ácidos tuberculoesteáricos (Holt, 2000). Además contiene quinonas isoprénicas llamadas menaquinonas, una mezcla de tetrahidromenaquinonas de 6 y 8 unidades isoprénicas (Pumarola *et al.*, 1987).

## **1.2 IDENTIFICACIÓN.**

*Nocardia* crece en 2 a 7 días en agar sangre al 5%, agar chocolate ó agar infusión cerebro corazón; así mismo también pueden usarse medios para crecimiento micológico, como el Mycosel que contiene cicloheximida para su primoaislamiento. La identificación presuntiva se obtiene al realizar la tinción de Kinyoun. Se utilizan pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de *Nocardia* y éstas se basan en la hidrólisis de la caseína, tirosina, xantina e hipoxantina (McNeil *et al.*, 1994, Saubolle *et al.*, 2010).

Los métodos moleculares se utilizan exitosamente para identificar especies de *Nocardia* y entre estos se encuentran el análisis con endonucleasas de restricción del gen ARNr 16S, RFLP del gen *hsp* y los métodos de secuenciación, principalmente del ARNr 16S (Alfaresi *et al.*, 2006).

## **1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA.**

Se han descrito algunos mecanismos de patogenicidad y virulencia en el género *Nocardia*, en 1978 se sugirió que la virulencia de *N. asteroides* es mayor en la fase de crecimiento exponencial, cuando abundan los filamentos, que en la fase estacionaria donde se presentan células cocoides (Beaman y Maslan, 1978). Así mismo la respuesta inmunitaria innata del hospedero probablemente contribuye a la eliminación de la bacteria cuando ha invadido los tejidos, por lo que muchas personas infectadas no desarrollan micetomas (Beaman *et al.*, 1988, Salinas-Carmona *et al.*, 2002).



Algunas enzimas se han descrito como mecanismos de virulencia, por ejemplo: la superóxido dismutasa y la catalasa que protegen a los microorganismos de los efectos tóxicos de los radicales del oxígeno que producen neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos como parte de sus mecanismos microbicidas (Beaman *et al.*, 1983, Beaman *et al.*, 1985).

Entre las características que se observan en el micetoma se encuentran la inflamación persistente y el daño tisular, los cuales han sido atribuidos a los ácidos micólicos, ácidos grasos, lipoproteínas y peptidoglicano de la pared celular y a una glicoproteína de 24 kDa de *N. brasiliensis* ATCC 700358 (McNeil *et al.*, 1994, Salinas-Carmona *et al.*, 2002).

El bloqueo de la acidificación de los fagosomas y la utilización de la fosfatasa ácida por *N. asteroides* también se mencionan como elementos importantes en la patogenicidad (Black *et al.*, 1986).

#### **1.4 ATENUACIÓN.**

Se ha observado que el pasaje *in vitro* de microorganismos puede producir cambios importantes en las características fenotípicas, incluyendo la eliminación de uno o más factores de virulencia. Entre los microorganismos atenuados obtenidos de esta manera se encuentran el virus de la rabia, los poliovirus, el virus del

sarampión y *M. bovis* BCG (Basombrío *et al.*, 2000, González-Garza *et al.*, 2000, Ebert, 1998).

El efecto del subcultivo se ha estudiado, entre otros, en *Streptococcus pneumoniae*, un patógeno humano facultativo asociado con enfermedades como neumonía, meningitis, sepsis y otitis media, los factores implicados en la colonización inicial, sobrevivencia y etiología de esta bacteria no son del todo conocidos. *S. pneumoniae* 6304 se subcultivó durante 100 veces y se identificaron alteraciones en los perfiles de transcripción global de la cepa sin subcultivar (P. 1), la cepa subcultivada 50 veces (P. 50) y 100 veces (P. 100) encontrándose que conforme aumentaba el número de subcultivos, se mostraba una mayor alteración de genes expresados. Setecientos seis genes de P. 100 contra 113 genes de P. 50; entre los genes diferencialmente expresados se encuentran genes asociados con transporte y unión de proteínas, pared celular, energía y metabolismo, síntesis de proteínas, proteínas hipotéticas y asociados a virulencia tales como: neumolisina, transporte de hierro y genes de la Región de Diversidad 10 (RD10) los cuales son necesarios durante la infección en el torrente sanguíneo (Pandya *et al.*, 2009).

Otro microorganismo en el que se ha estudiado la atenuación por subcultivo es *Staphylococcus aureus*, el cual posee un amplio repertorio de factores de virulencia ya conocidos, incluyendo cuatro hemolisinas, dos lipasas, varias proteasas, exotoxinas y enterotoxinas (Franklin y Lowy, 1998, Bien *et al.*, 2011). La producción de algunos factores de virulencia es regulada por el operon *agr* el cual

codifica para dos ARNm designados ARNII y ARNIII. La cepa *S. aureus* SA564 fue utilizada para hacer pasajes seriados diarios durante 6 semanas y se observó que conforme avanzaban los pasajes disminuyó la actividad de aconitasa, la cual es una enzima del ciclo del ácido cítrico que afecta la síntesis de varios factores de virulencia y la expresión de los genes reguladores *sarA* y ARNIII, reportándose una disminución de la actividad de la aconitasa del 38% a la sexta semana (Somerville G. *et al.*, 2002).

Un ejemplo clásico de atenuación por subcultivo es el del Bacilo Calmette-Guérin (BCG), un mutante obtenido de *Mycobacterium bovis* atenuado después de 230 subcultivos seriados en medio de cultivo que contenía bilis de buey, realizado por Albert Calmette y Jean Marie Camille Guérin entre 1908 y 1921 (Calmette *et al.*, 1909). La cepa resultante era incapaz de matar animales experimentales, y mostró no tener reversión a su estado original. Se han obtenido varias cepas derivadas que han sufrido hasta la fecha más de 1000 pasajes desde que se prepararon los stocks liofilizados en 1960 (Brosch *et al.*, 2007). Esto ha resultado en muchas diferencias fenotípicas las cuales pudieron haber sido causadas por cambios genéticos ocurridos en las cepas bacterianas durante el paso del tiempo, además de las diferencias en las técnicas de producción (Behr *et al.*, 1999, Clemens *et al.*, 1983).

La cepa BCG Pasteur no solo carece de RD1 sino que también ha incurrido otras mutaciones, incluyendo la región de diferencia 2 (RD2), perdida durante los años de 1927 y 1931. Para evaluar el papel de RD2 asociada a la virulencia, se

construyó en el 2010 un "knock-out" dirigido en la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y se condujo una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* demostrando que la pérdida de RD2 conduce a la reducción de la virulencia, proporcionando evidencia de que el perfil de seguridad de la BCG Pasteur resulta a partir del efecto acumulativo de múltiples mutaciones atenuantes (Kozak *et al.*, 2010).

Otro ejemplo de atenuación *in vitro* ha sido descrito recientemente para el aislado clínico *M. tuberculosis* MT103 (Cardona *et al.*, 2006), esta cepa perdió su virulencia después de 18 meses de pasaje continuo en medio de cultivo. La atenuación fue relacionada con un resultado negativo en un indicador de virulencia como lo es la reacción del rojo neutro (NR-) y a su deficiencia en la síntesis de pthiocerol dimycocerosates (PDIMs), un lípido asociado a virulencia .

Una cepa atenuada en el laboratorio es *M. tuberculosis* H37Ra (avirulenta) obtenida en 1934 por pasaje seriado de un aislamiento clínico de MTB, originalmente aislado de un paciente con tuberculosis en 1905 y designada como H37. La cepa H37Ra ha sido estudiada mediante análisis de microarreglos y se han identificado genes que se encuentran subexpresados en H37Ra comparados con H37Rv (virulenta) (Gao *et al.*, 2004 y Mostowy *et al.*, 2003). Recientemente se ha publicado que una mutación puntual en el regulador transcripcional *phoP*, se encuentra implicada en la atenuación de H37Ra, debido a que tiene impacto en la secreción del antígeno ESAT-6 (Frigui *et al.*, 2008). Además, dicha mutación en *phoP*

en H37Ra es responsable de la pérdida de producción de policétido derivado de aciltrehalosa también conocidos como sulfolípidos (SL), diacil-trehalosas (DAT) y poliacil-trehalosas (PAT), los cuales se encuentran implicados en inmunoregulación (Chesne-Seck *et al.*, 2008).

Por lo anterior y tomando en cuenta que en *Nocardia brasiliensis* no son bien conocidos los mecanismos de patogenicidad y virulencia, se considera que lograr la atenuación de *Nocardia brasiliensis* hará factible dilucidar cuáles son los mecanismos de virulencia de este microorganismo.

## CAPÍTULO II

### ANTECEDENTES DIRECTOS

En el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (LIID) del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, UANL, se ha estudiado el efecto del subcultivo en una cepa de *Nocardia brasiliensis*. La cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358) fue sometida a subcultivo cada 72 horas en Caldo Infusión Cerebro Corazón en condiciones de agitación de 110 rpm y temperatura de 37°C, esto durante 200 veces, almacenándose alícuotas cada 10 subcultivos.

Se procedió a probar la virulencia de la cepa sin subcultivar (P. 0) comparada con los subcultivos 40, 80, 100, 130 en el cojinete plantar de ratones hembra BALB/c (González-Carrillo, 2010). En la figura 1 se muestra la evolución de la infección natural en ratones BALB/c cuando se inoculó con las bacterias de los subcultivos 40, 80, 100 y 130 comparadas con el control (P. 0). Los animales inoculados con P. 0 presentaron inflamación debido a una intensa estimulación antigénica producida por el inóculo, seguido de una disminución del grosor del cojinete plantar. Los micetomas aparecieron después de 5 a 6 semanas de la infección, y a las 12 semanas se presentó un considerable incremento en el tamaño de los cojinetes plantares de los ratones caracterizado por presencia de abscesos y fístulas.

Cuando se inocularon los subcultivos de *N. brasiliensis* se obtuvo un comportamiento diferente. Después de una respuesta inflamatoria inicial, el grosor de los cojinetes plantares de los ratones BALB/c disminuyeron después de las 5 semanas post-inoculación en todos los casos. La formación de lesiones de micetoma a la semana 12 se observaron en un 10, 5, 0, 0 por ciento de los animales inoculados con P. 40, P. 80, P. 100 y P. 130 respectivamente. Mientras que los controles produjeron micetoma en un 80, 80, 70 y 60% de los animales inoculados analizados a las doce semanas. Se comparó el desarrollo de lesiones en los grupos inoculados con los subcultivos contra el grupo control (inoculados con P. 0) y se analizaron con la prueba ANOVA, observándose una diferencia significativamente estadística ( $P < 0.001$ ) (Almaguer *et al.*, 2011).

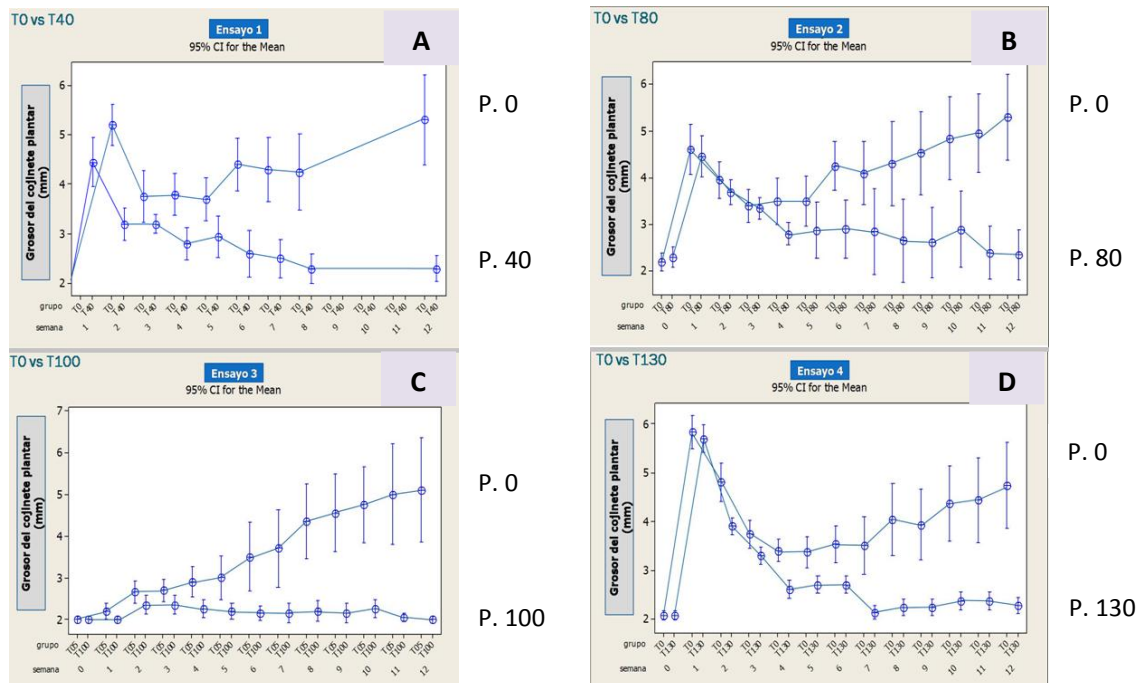


Fig. 1 Evolución natural de la infección por *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 y subcultivos P. 40, P. 80, P. 100 y P. 130 en ratones BALB/c.

**A)** P.0 vs P. 40 , **B)** P. 0 v s P. 80, **C)** P. 0 vs P. 100 y **D)** P.0 vs P. 130.

Posteriormente González-Carrillo, 2010, procedió a analizar la virulencia de la cepa sin subcultivar (P. 0) comparada con la cepa subcultivada 200 veces (P. 200) con el modelo murino BALB/c. En el grupo control se observó un aumento en el grosor del cojinete plantar de los ratones y el desarrollo de lesiones, abscesos y fístulas en los ratones, mientras que en los ratones inoculados con la cepa P. 200 se presentó una disminución en el alto y ancho del cojinete plantar de los ratones BALB/c.

Además de las infecciones experimentales se realizaron ensayos para medir la sobrevivencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 frente a leucocitos polimorfonucleares humanos, observándose una menor sobrevivencia de *N. brasiliensis* P. 200 en comparación con la cepa sin subcultivar (P. 0) (González-Carrillo, 2010).

Así mismo González-Carrillo, 2010, observó otras diferencias en *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 200 respecto a la cepa parental P.0, entre ellas: una disminución de la ácido alcohol-resistencia y producción de filamentos, las cuales son características del género *Nocardia* (Wilson J., 2012 ), un incremento en la tasa de crecimiento de P. 200, y una deficiencia de los ácidos grasos de la pared celular.

Recientemente se ha publicado la secuencia del genoma de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, el cual está constituido de 53 contigs, una longitud de



9; 489,024-pb, contenido de G+C del 68% y 3 copias de los genes ARNr 5S, 16S y 23S (Vera-Cabrera *et al.*, 2012).

Asimismo se llevó a cabo la secuenciación del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 subcultivo 200, lo cual nos permite hacer una comparación entre los genomas de P. 0 vs P. 200, con el fin de elucidar los cambios genéticos que pudieron propiciar la disminución de virulencia, menor sobrevivencia a leucocitos polimorfonucleares humanos y el cambio en el patrón de expresión de proteínas mencionados anteriormente para el subcultivo 200.

## **CAPÍTULO III**

### **JUSTIFICACIÓN**

El estudio de los cambios genéticos producidos durante el subcultivo de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 nos pueden indicar los genes involucrados en la virulencia de este microorganismo, y por ende las propiedades biológicas perdidas durante este evento.

## CAPÍTULO IV

### OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios genéticos asociados a la atenuación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar cambios en la secuencia nucleotídica de P. 200 en relación a P.0.
2. Desarrollar un método para amplificar los genes ausentes en P. 200 y presentes en P. 0.
3. Determinar la presencia de los genes en los subcultivos (P.0, P.40, P.80, P.100, P.130 y P.200) de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 por medio de la técnica de PCR.
4. Evaluar por Southern blot la presencia de los genes en los subcultivos previos de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.
5. Evaluar la expresión de los genes de interés por PCR tiempo real.

## CAPÍTULO V

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1 Microorganismo de Estudio.

Para este proyecto se utilizaron tanto la cepa parental (P. 0) así como los subcultivos de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358) realizados por Almaguer, 2011 y González-Carrillo, 2010.

#### 5.2 Cultivo del Microorganismo de Estudio.

Para la extracción de ADN genómico, la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 sin subcultivar (P. 0), así como los subcultivos, se sembraron en Agar Infusión Cerebro Corazón (Bioxon, BD, México) a 37° C por 5-7 días, hasta obtener suficiente crecimiento.

Para la extracción de ARN total, se inoculó 0.1 ml de una suspensión 1 McFarland de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 y los distintos subcultivos en matraces de 125 ml que contenían 33 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón estéril (Bioxon, BD, México).

### 5.3 Extracción del ADN.

El ADN se extrajo mediante la técnica de CTAB-NaCl con las modificaciones mencionadas a continuación (Wilson, 1987). A partir de un cultivo joven en medio sólido Agar Infusión Cerebro Corazón, se recolectaron las bacterias con un asa estéril en un tubo de micro-centrífuga conteniendo 500  $\mu$ l de solución TE1X y se calentaron por 30 min a 80° C para inactivarlas. Se añadieron 10  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) (Promega, Madison, WI, USA) y 50  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MI, EUA) y se incubaron a 37° C durante 2 horas. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de SDS 10% y 10  $\mu$ l de proteinasa K y se incubó 15 minutos a 65°C; al término se adicionaron 100  $\mu$ l de NaCl 5M (Sigma) y se mezcló por inversión (20 veces), agregando después 80  $\mu$ l de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). La mezcla se agitó en un vórtex hasta que la suspensión se observó lechosa, se incubó a 65° C por 10 min. Se añadió un volumen igual de (0.7 ml) una mezcla (24:1) de cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se agitó en un vórtex por 10 segundos, se centrifugó a temperatura ambiente por 5 min a 12, 000 xg y la capa acuosa fue transferida a un nuevo tubo de micro-centrífuga con una micropipeta. Se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); después de agitar levemente los tubos se dejaron a -20° C por lo menos 1 hora, se centrifugó por 15 min a temperatura ambiente a 12 000 xg y el sobrenadante fue descartado. La pastilla de ADN se lavó con 1 ml de etanol frío para remover el CTAB residual y el isopropanol.

Los tubos fueron centrifugados por 5 min a temperatura ambiente a 12, 000 xg, se descartó el sobrenadante y la pastilla de ADN se dejó secar al aire. El ADN se disolvió en aproximadamente 25 µl de buffer TE 1X, y se dejó en incubación a 37° C por 30-60 min para disolver el ADN. Para evaluar la cantidad y la calidad del ADN se utilizó el aparato Nanodrop 2000 (Spectrophotometer, ThermoScientific) y se almacenó a 4° C hasta su uso.

#### 5.4 Diseño de iniciadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final.

Con el programa Oligo 6 (Primer Analysis Software Versión 6.40) se diseñaron los iniciadores de algunos genes presentes en las secuencias de delección encontradas mediante la comparación del alineamiento entre la secuencia de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 P. 0, P. 200.

**Tabla 1. Lista de iniciadores utilizados para PCR de punto final**

<b>RDNb1</b>				
Número de gen	Producto	Localización	Secuencias de los iniciadores	Tamaño del producto
O3I_41375	Proteína hipotética	11176-11717	5'-ACATAGATCCAGCCGTTCC -3' 5'-GAGATGACCAAGTTCGTTG -3'	542-pb
O3I_41150	Proteína hipotética	55017-55510	5'-GAAGGAGACACAATGAGAC -3' 5'-AGCTCGAACTGATCCAC -3'	494-pb
<b>RDNb2</b>				
Número de gen	Producto	Localización	Secuencias de los iniciadores	Tamaño del producto
O3I_021960	Propionil-CoA	4985649- 4986036	5'-CGGTGTCACATCGGATAC -3' 5'-TCATCAATCTCGTGGTGC -3'	388-pb
O3I_021945	Catalasa	4979759- 4980244	5'-CTGTTTGATCGCCTTCTC -3' 5'-AACCCGACCAACTATTTCC -3'	486-pb
O3I_021900	Neurolisina	4969478- 4969920	5'-GTTGTCACGCTGTTCCA -3' 5'-AGGCTCCAGAGATAGGTG -3'	443-pb
O3I_021780	Co-A Transferasa B	4947500 - 4947846	5'-ACCTGGTGCTGATCTATG -3' 5'-GGTGACGAAATCGACTC -3'	347-pb
O3I_021610	Adenosilhomocis-	4914458- 4914928	5'-GTCGCCCTATCGTCAGTAC -3'	471-pb

O3I_021295	teinasa Oxidoreductasa dependiente del NADP	4812621- 4812991	5' -CGTCGAGCAGCATGTTC -3' 5'-AGGCGAGCACATACTTG -3' 5'-GAGATCCCCCTATGACCTAC -3'	371-pb
O3I_021260	Transportador de ácidos grasos de cadena corta	4807425- 4807768	5'-AAGATGAACTGCAGGAAC -3' 5'-CTCACCAAAGCGAAAG -3'	344-pb
O3I_021250	Amidotransferasa	4803119- 4803708	5'-CGAGGACCTGCTTGATC -3' 5'-GTCGCTCTATCTGCTGTTC -3'	590-pb
<b>RDNb3</b>				
Número de gen	Producto	Localización	Secuencias de los iniciadores	Tamaño del producto
O3I_006630	Transportador	1519740- 1520103	5'-ATGGTCAGGCCGATAC -3' 5'-GGTTGTTTCGTCATGGTG -3'	364-pb
O3I_006635	<i>yrbE</i>	1521271- 1521655	5'-CGATAGAACCGGGAGAG -3' 5'-TCAACATCCTCATCATCTTC -3'	385-pb
O3I_006645	<i>mce</i>	1522606- 1523165	5'-GCTTACAGATCACGTTG -3' 5'-CACCATCAGTTCGTTG -3'	560-pb
	Control positivo			
O3I_Or42275		1448354- 1448587	5'-ACGGGTGAGTAACACGTG -3'	234-pb
O3I_Or42277	16S	2272059- 2272292	5'-AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC-3'	
O3I_Or42279		3902317- 3902550		

### 5.5 Realización de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.

A partir del diseño de iniciadores se procedió a estandarizar las condiciones de temperatura de desnaturalización, alineamiento así como su duración, además de la concentración de iniciadores para la amplificación de los genes seleccionados.

Se prepararon reacciones de 25 µl utilizando una concentración de 20 ng de ADN de la cepa HUJEG-1 (P. 0) y GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, WI, USA) (Buffer de Reacción pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP y 400 µM dTTP Y 3 mM MgCl<sub>2</sub>), y; el volumen se ajustó con agua milliQ estéril. Los

tubos fueron colocados en el termociclador (PTC-200 MJ Research) y la reacción de PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones:

**Tabla 2. Programa para la reacción de PCR**

1.	96°C	1 min	5.	Ir al paso 2	29 veces
2.	92°C	40 seg	6.	72°C	10 min
3.	Tm	1 min	7.	4°C	FIN
4.	72°C	1min			

**Tabla 3. Estandarización de condiciones para las reacciones de PCR**

Gen	Concentración de ADN	Concentración de los iniciadores	Tm
Proteína hipotética O3I_41375	20 ng	0.25 µM	57°C
Proteína hipotética O3I_41150	20 ng	0.25 µM	53°C
Transportador	20 ng	0.5 µM	52°C
<i>yrbE</i>	20 ng	0.5 µM	55°C
<i>mce</i>	20 ng	1 µM	47.5°C
Propionil-CoA	20 ng	0.25 µM	55°C
Catalasa	20 ng	0.25 µM	57°C
Neurolisina	20 ng	0.25 µM	52°C
Co-A Transferasa B	20 ng	0.25 µM	54°C
Adenosilhomocisteinasa	20 ng	0.25 µM	59°C
Oxidorreductasa dependiente del NADP	20 ng	0.25 µM	55°C
Transportador de ácidos grasos de cadena corta	20 ng	0.25 µM	53°C
Amidotransferasa	20 ng	0.25 µM	57°C
Control positivo 16S	20 ng	0.25 µM	55°C



## 5.6 Ensayo de Southern blot.

Se digirieron aproximadamente 4  $\mu\text{g}$  de ADN genómico con la enzima *Bam*HI (Promega, Madison, WI, USA) en un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  en un tubo de microcentrífuga, se centrifugaron los tubos por 5 seg a 12,000 xg y se incubaron durante 4 h a 37°C.

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en solución TE 1X adicionado con 5  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se montó en una cámara de electroforesis utilizando la misma solución para el corrimiento. Se aplicaron 25  $\mu\text{l}$  de las muestras mezcladas con solución de carga 5X a los pozos del gel así como también 3  $\mu\text{l}$  del marcador de 1 kb (Gibco, Invitrogen, Grand Island, N.Y, USA) en los carriles de los extremos. Se inició la electroforesis a 100 V por 10 min y posteriormente se decreció el voltaje a 35 V y se corrió toda la noche hasta lograr una buena migración de los fragmentos.

Después de la electroforesis se desmontó el gel y se colocó por 20 min en 300 ml de solución desnaturizante (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M) y se lavó con agua destilada. Posteriormente se colocó en 300 ml de solución desnaturizante (NaCl 0.5M, Tris-base 0.5M pH 7.5) por otros 20 min y se lavó finalmente con agua destilada. Se procedió a la transferencia del ADN por el método capilar como se detalla a continuación: se colocó un molde para geles boca abajo en una bandeja, se

cubrió el molde con un pedazo de papel filtro Whatman poro abierto (20  $\mu\text{m}$ ) ajustando al tamaño del molde.

Cuidadosamente se empapó con solución de transferencia SSC 20X y se removieron las burbujas de aire. Se colocó el gel sobre el papel Whatman poro abierto (20  $\mu\text{m}$ ) de tal forma que se ajustó exactamente sobre el molde para geles, se situó encima del gel la membrana de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK) y después se colocaron 3 filtros gruesos Whatman sobre la membrana. Finalmente se puso una pila de papel absorbente de aproximadamente 5 cm y sobre éstos se colocó un objeto de aproximadamente 1 kg de peso. Se rellenó la bandeja con solución SSC 20X y se llevó a cabo la transferencia durante 4 h a temperatura ambiente.

### **5.7 Fijación del ADN a la Membrana por Enlaces Covalentes.**

Al finalizar la electroforesis se sacó la membrana de nylon con mucho cuidado y se anotaron los datos en la esquina superior derecha, se dejó secar en papel filtro por 15 min. Con la finalidad de unir el ADN a la membrana de nylon, por medio de enlaces covalentes, se sometió la membrana a una exposición en luz ultravioleta utilizando el aparato Crosslinker (UVP, Upland, CA, USA).

## 5.8 Preparación de las Sondas por PCR.

Se prepararon reacciones de 50 µl utilizando 100 ng del templado de ADN de la cepa HUJEG-1 (P. 0) y GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, WI, USA) (Buffer de Reacción pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP y 400 µM dTTP Y 3 mM MgCl<sub>2</sub>), y el volumen se ajusta con agua milliQ estéril. Los tubos fueron colocados en el termociclador (PTC-200 MJ Research) con el siguiente programa:

Tabla 4. Programa de las reacciones de PCR para los ensayos de Southern blot			Tabla 5. Condiciones de las reacciones de PCR en los ensayos de Southern blot		
1.	96°C	1 min	Gen	Concentración de los iniciadores	Tm
2.	92°C	40 seg			
3.	Tm	1 min	Proteína hipotética	0.25 µM	57°C
4.	72°C	1min			
5.	Ir al paso 2	29 veces			
6.	72°C	10 min	Catalasa	0.25 µM	57°C
7.	4°C	Fin	<i>mce</i>	1 µM	47.5°C

Los fragmentos obtenidos se purificaron utilizando el kit de purificación de ADN Wizard Genomic A2180 (Promega, Madison, WI, USA).

## 5.9 Marcaje de la sonda.

Se preparó una solución conteniendo 600 ng del amplicón en 20 µl de agua milliQ. El tubo con la sonda se colocó en agua hirviendo por 5 min, se retiró inmediatamente y se pasó a un baño de hielo por 5 min. Se centrifugó por 30 seg a 10, 000 xg y se agregó un volumen igual de reactivo de marcaje ECL RPN3005 (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK), se mezcló cuidadosamente y se

añadió la misma cantidad de glutaraldehído (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK). Se incubó a 37°C por 1 h quedando así lista la sonda para el experimento de hibridación.

#### **5.10 Hibridación y Detección.**

La membrana fue humedecida en solución SSC 2X y se pasó a una malla de polietileno para colocarse en el tubo de hibridación utilizando 80 ml de solución SSC 2X para adherir la malla al tubo. Se retiraron los 80 ml de solución y se agregaron 10 ml de solución de hibridación precalentado a 42°C. Se pre-hibridó la membrana por 3 h a 42°C en un horno de hibridación con movimiento de rotación constante. Después de este tiempo se retiró la solución de hibridación y se agregó a éste la sonda marcada, se devolvió la solución de hibridación al tubo con la membrana y se dejó incubando toda la noche. Al siguiente día se precalentó la solución de lavado primario 2X a 55°C y utilizando 50-80 ml, se procedió a hacer un lavado de 5 min, posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con la solución de lavado primario a una concentración de 0.5X. Se sacó la membrana con la malla y en un recipiente de plástico se hicieron dos lavados a temperatura ambiente con la solución de lavado secundario por 5 min. Se retiró el exceso de solución de lavado secundario y utilizando un recipiente limpio se agregaron sobre la membrana 10 ml de reactivo de detección (Ver Anexos). El reactivo de detección fue dispersado por toda la membrana rotando el recipiente por 1 min. La membrana fue retirada del recipiente y se colocó sobre un papel filtro Whatman para quitar el exceso de reactivo de detección, posteriormente se colocó la membrana entre 2 acetatos en

el interior del cassette de detección con el lado del ADN hacia arriba, se colocó un film para autorradiografía sobre la membrana, se cerró el cassette durante 1 h y media.

Posteriormente se sacó el film del cassette y fue colocado en reactivo de revelado por 20 seg, se enjuagó el film con agua corriente y se colocó en el recipiente del reactivo fijador por 5 min. Finalmente se sacó el film y se dejó secar a temperatura ambiente.

### 5.11 Diseño de los iniciadores para el ensayo de PCR tiempo real (qPCR).

Con el programa Oligo 6 (Primer Analysis Software Versión 6.40) se diseñaron los iniciadores del gen Catalasa perteneciente a la delección RDNb2 y el gen 16S utilizado como gen normalizador.

**Tabla 6. Iniciadores diseñados para los ensayos de qPCR**

Gen	Secuencia de los iniciadores	Localización
Catalasa	5'-AATGTATTGCGGTCTG -3'	4979859-4979990
	5'-GCCTGTTCTCCTATCTG -3'	1448806-1448987
16S	5'-CTCAGCGTCAGTTACTTC-3'	2272511-2272692
	5'-TTGTAGGCGGTTTGTC -3'	3902769-3902950

### 5.12 Extracción de ARN total.

A partir de un cultivo de 72 h de *N. brasiliensis* HUJEG-1 de P. 0 y los subcultivos 40, 80, 100, 130, 190 y 200 en caldo Infusión Cerebro Corazón a 37°C y 110 rpm, se realizó la extracción de ARN por el método de Trizol.

Los cultivos se lavaron 3 veces con solución salina estéril al 0.9% y se maceraron durante 15 seg en hielo, se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l y se les adicionó 1 ml de Trizol (Ambion, Invitrogen, EUA) a 4°C. Posteriormente las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas, y después se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo frío a cada muestra y se mezcló por inversión durante 15 seg. Los tubos se incubaron en hielo por 3 min y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C para luego recuperar la fase acuosa y adicionarle 500  $\mu$ l de isopropanol frío, se volvieron a incubar una hora a 80°C y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C, después se retiró el sobrenadante de las muestras, se removió el sobrenadante, se lavaron las pastillas con 1 ml de etanol frío, se mezcló con vórtex y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente se retiró el etanol con una puntilla sin tocar la pastilla y se aplicó un pequeño spin a temperatura ambiente para poder eliminar los restos de etanol en el tubo con ayuda de una puntilla de 10  $\mu$ l. Finalmente la pastilla se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua libre de ARNasas más un 1  $\mu$ l de RNAout (40 U/ $\mu$ l) (Invitrogen, EUA) y se midió la concentración en un equipo Nanodrop 2000 (Spectrophotometer Thermo Scientific).

### **5.13 Retrotranscripción.**

Después de la extracción de ARN total se procedió a eliminar el ADN genómico remanente, para ello en tubos de micro-centrífuga de 1 ml libres de ARNasas se adicionaron 8  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ l de buffer de reacción

10X y 1  $\mu$ l de ADNasa I (Amplification Grade, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA), se mezclaron e incubaron 15 min a temperatura ambiente, se adicionó 1  $\mu$ l de la solución de stop y se calentaron a 70°C durante 10 min y finalmente se incubaron en hielo.

Para las reacciones de retrotranscripción se utilizó el siguiente protocolo: se agregó 1  $\mu$ l de iniciadores al azar (3  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Invitrogen, EUA), 1  $\mu$ g de ARN total en un volumen de 7  $\mu$ l, 1  $\mu$ l de dNTPs (10mM c/u) y agua libre de nucleasas para completar un volumen de 12  $\mu$ l, se mezclaron y calentaron a 65°C durante 5 min y se incubaron en hielo.

Luego se procedió a dar un spin en la micro-centrífuga y se añadieron 4  $\mu$ l de "Buffer First-Strand" 5X, 2  $\mu$ l de DTT 0.1M y 1  $\mu$ l de RNase out, se mezclaron y se incubaron a 25°C por 2 minutos y se añadió 1  $\mu$ l (200 unidades) de la enzima Superscript II RT (Invitrogen, EUA) y se incubó a 25°C por 10 min. Se incubó a 42°C durante 50 min, posteriormente se inactivó a 70°C por 15 min, las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

#### **5.14 qPCR.**

Las muestras de ADNc de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 y los subcultivos 40, 80, 100, 130, 190 y 200 fueron utilizados para analizar la expresión del gen O3I\_021945 (catalasa) perteneciente a RDNb2 y se empleó como normalizador un fragmento del gen 16S. Se realizó la detección con Fast SYBR® Green Master (Applied Biosystems, CA, EUA), se prepararon reacciones de 10  $\mu$ l. Los ADNc fueron

ajustados a una concentración de 40 ng/μl para el gen catalasa y a 20 ng/μl para el normalizador, se emplearon los iniciadores diseñados a una concentración final de 0.25 μM, y finalmente se ajustó con agua libre de nucleasas. Los experimentos se realizaron tres veces por triplicado. Se utilizó el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystem, CA, EUA. Los datos obtenidos fueron analizados con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al.*, 2001).

**Tabla 7. Programas para las reacciones de qPCR**

Catalasa	16S
1. 50°C 20 seg	1. 50°C 20 seg
2. 95°C 10 min	2. 95°C 10 min
3. 95°C 15 seg	3. 95°C 15 seg
4. 50°C 45 seg	4. 50°C 1 min
5. 60°C 1 min	5. 95°C 15 seg
6. Ir al paso 3 (39 veces)	6. Ir al paso 4 (39 veces)
7. 95°C 30 seg	7. 95°C 30 seg
8. 50°C 15 seg	8. 50°C 15 seg
9. 60°C 15 seg	9. Fin
10. Fin	



## CAPÍTULO VI

### RESULTADOS

#### 6.1 Detección de cambios en la secuencia nucleotídica de P. 200 en relación a P.0.

Con el fin de detectar los cambios genéticos en P. 200, a la cepa de *N. brasiliensis* subcultivada 200 veces en Caldo Infusión Cerebro Corazón, se le realizó extracción de ADN, el cual fue sometido a secuenciación en masa usando la plataforma Roche/454 GS (FLX Titanium) librería de 8-kb. Las lecturas de Roche/454 GS fueron ensambladas usando el software Newbler 2.5.3 (Roche Diagnostics, Branford, CT). Los contigs obtenidos fueron comparados contra la secuencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 ya publicada en el GenBank (Número de acceso: NC\_018681.1) y la presencia de cambios genéticos fue analizada mediante el programa Sequencher 5.0 (Gene Codes, MI) y la herramienta BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La comparación entre la secuencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 vs P. 200 dio como resultado 3 deleciones y la presencia de 119 SNP's presentes en la cepa subcultivada 200 veces. Las 3 deleciones fueron nombradas RDNb1, RDNb2 y RDNb3. La deleción RDNb1 consta de 59, 711-pb e incluye 61 genes y corresponde a la secuencia del contig 25 de la secuencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0. Este contig no se ubica dentro del ensamblaje del genoma de *N. brasiliensis*, por lo cual se considera ADN extra cromosómico. RDNb2 comprende una pérdida de 216, 371-pb

en donde se encuentran 172 genes y su secuencia corresponde a la región del nucleótido 4;795,938 al 5;012,299-pb en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ATCC 700358 (Número de acceso: NC\_018681.1). RDNb3 corresponde a una región de 31,711-pb que comprende 32 genes y su secuencia abarca del nucleótido 1;501,900 al 1;533,611-pb del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (Número de acceso: NC\_018681.1). Como efecto del subcultivo realizado 200 veces en la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 se produjo una pérdida en total de 307,793-pb derivadas de las 3 deleciones mencionadas anteriormente, donde se incluyen 265 genes y representa una pérdida del 3.24% del genoma de *N. brasiliensis* P. 0.

Los genes que se sitúan en las deleciones encontradas fueron clasificados de acuerdo al Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs) el cual se proporciona en la descripción del gen de interés en la base de datos del NCBI. La herramienta COGs también perteneciente al NCBI cataloga según la función, encontrándose las siguientes categorías principales: información de almacenamiento y procesamiento, procesos celulares, metabolismo y pobremente caracterizadas, las cuales a su vez también poseen subdivisiones.

Basándose en la clasificación aplicada con la herramienta COGs y con la ayuda del programa Serial Cloner 2.5 (Serial Basics) se construyeron mapas para representar las deleciones RDNb1, RDNb2 y RDNb3, así como los genes que contienen en ellas, asignando un color según la función basada en la clasificación previamente mencionada.

### Mapa RDNb1

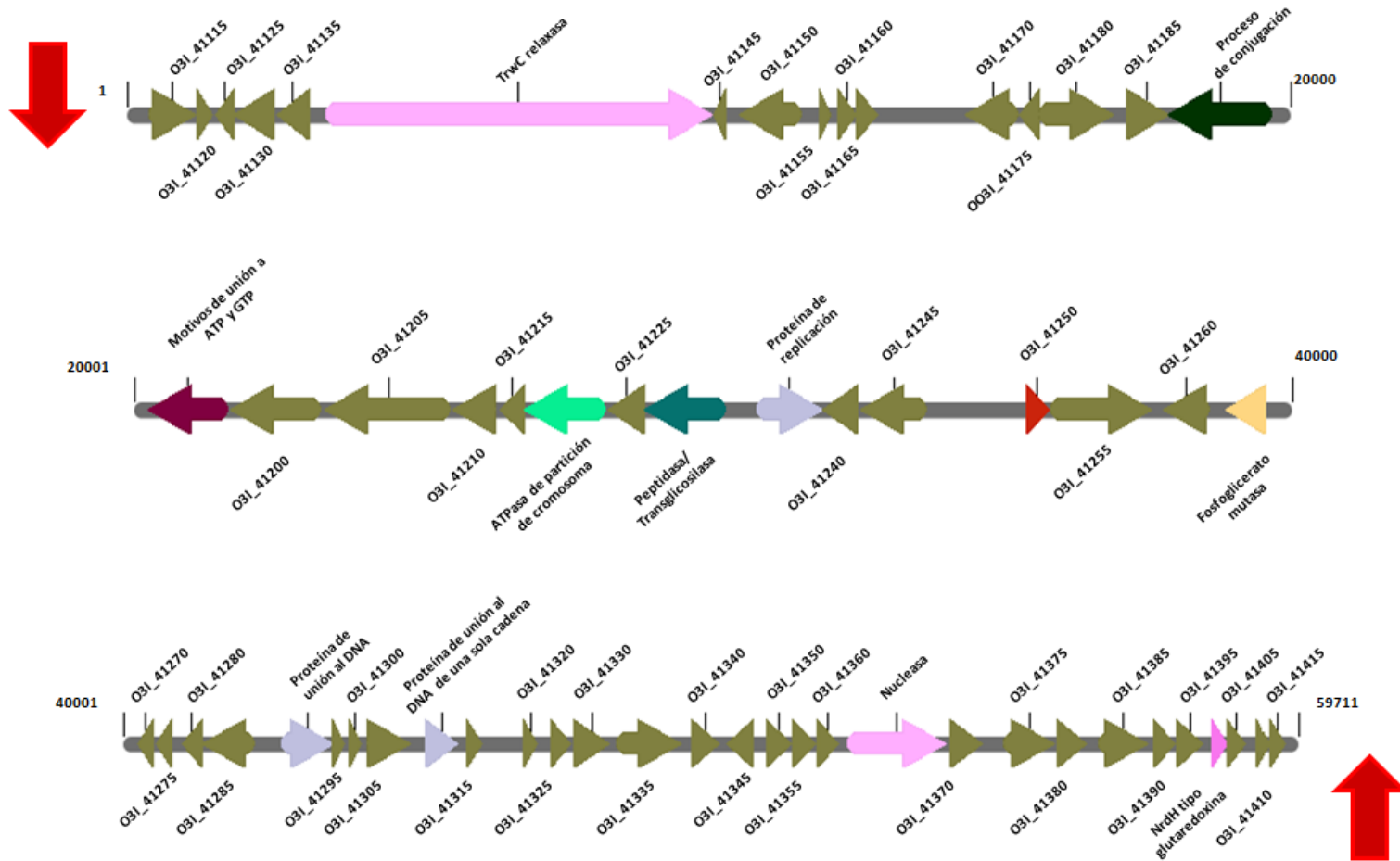




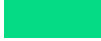






Fig. 2 Mapa de la RDNb1. La cual comprende una pérdida de 59, 711-pb e incluye 61 genes, se indica con flechas rojas el inicio y fin de la deleción.

**Tabla 8. Lista de genes pertenecientes al área perdida RDNb1**

<b>Información de almacenamiento y procesamiento</b>	<b>Metabolismo</b>
 Transcripción	 Transporte de carbohidratos y metabolismo
O3I_41140 TrwC relaxasa	O3I_41265 Fosfoglicerato mutasa
O3I_41365 Nucleasa	
 Recombinación, replicación y reparación	 <b>Oxidorreductasas</b>
O3I_41235 Proteína de replicación	O3I_41195 Proteína que contiene motivos de unión a ATP y GTP
O3I_41290 Proteína de unión al DNA	
O3I_41310 Proteína de unión al DNA de una sola cadena	
<b>Procesos celulares</b>	
 División celular y división cromosómica	 Biogénesis celular, membrana externa
O3I_41220 ATPasa de partición de cromosoma	O3I_41230 Peptidasa/Transglicosilasa
 Modificación post traduccional, chaperonas	 Motilidad celular y secreción
O3I_41400 Proteína NrdH tipo glutaredoxina	O3I_41190 Complejo proteico que interviene en el proceso de conjugación
 Transporte de iones inorgánicos y metabolismo	
O3I_41250 Proteína hipotética	

## Hipotéticas

O3I_41115	Proteína hipotética	O3I_41300	Proteína hipotética
O3I_41120	Proteína hipotética	O3I_41305	Proteína hipotética
O3I_41125	Proteína hipotética	O3I_41315	Proteína hipotética
O3I_41130	Proteína hipotética	O3I_41320	Proteína hipotética
O3I_41135	Proteína hipotética	O3I_41325	Proteína hipotética
O3I_41145	Proteína hipotética	O3I_41330	Proteína hipotética
O3I_41150	Proteína hipotética	O3I_41335	Proteína hipotética
O3I_41155	Proteína hipotética	O3I_4134	Proteína hipotética
O3I_41160	Proteína hipotética	O3I_41345	Proteína hipotética
O3I_41165	Proteína hipotética	O3I_41350	Proteína hipotética
O3I_41170	Proteína hipotética	O3I_41355	Proteína hipotética
O3I_41175	Proteína hipotética	O3I_41360	Proteína hipotética
O3I_41180	Proteína hipotética	O3I_41370	Proteína hipotética
O3I_41185	Proteína hipotética	O3I_41375	Proteína hipotética
O3I_41200	Proteína hipotética	O3I_41380	Proteína hipotética
O3I_41205	Proteína hipotética	O3I_41385	Proteína hipotética
O3I_41210	Proteína hipotética	O3I_41390	Proteína hipotética
O3I_41215	Proteína hipotética	O3I_41395	Proteína hipotética
O3I_41225	Proteína hipotética	O3I_41400	Proteína hipotética
O3I_41240	Proteína hipotética	O3I_41410	Proteína hipotética
O3I_41245	Proteína hipotética	O3I_41415	Proteína hipotética
O3I_41255	Proteína hipotética	O3I_41285	Proteína hipotética
O3I_41260	Proteína hipotética	O3I_41295	Proteína hipotética
O3I_41270	Proteína hipotética	O3I_41275	Proteína hipotética
		O3I_41280	Proteína hipotética

## RDNb2

La deleción RDNb2 que comprende una pérdida de 216, 371-pb, se ubica en la posición 4;795,938 - 5;012,299 del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0. La RDNb2 se sitúa en una región no conservada del genoma del género *Nocardia*, lo cual es posible apreciar con una comparación entre los genomas de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 (Número de acceso: NC\_016887.1) y *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358; Número de acceso: NC\_018681.1) con la herramienta SynMap de la base de datos Accelerating Comparative Genomics (COGE <http://www.genomevolution.org>), donde puede apreciarse la falta de sintenia de la región donde ocurrió la deleción entre la secuencia genética de ambas cepas de *Nocardia*.

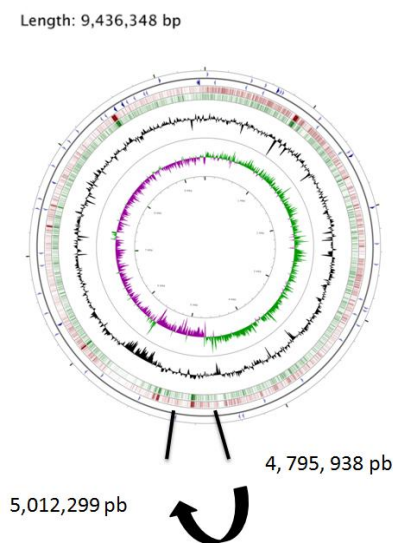


Fig. 3 Ubicación de la deleción RDNb2 en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

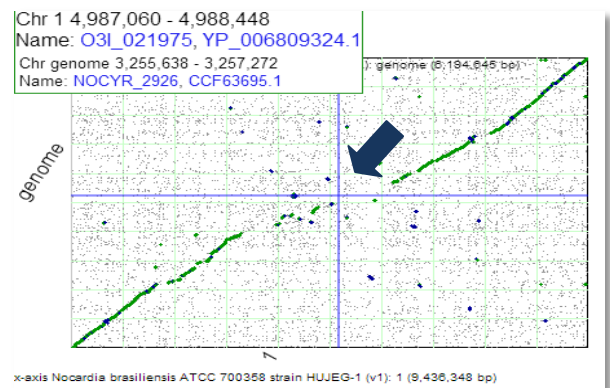
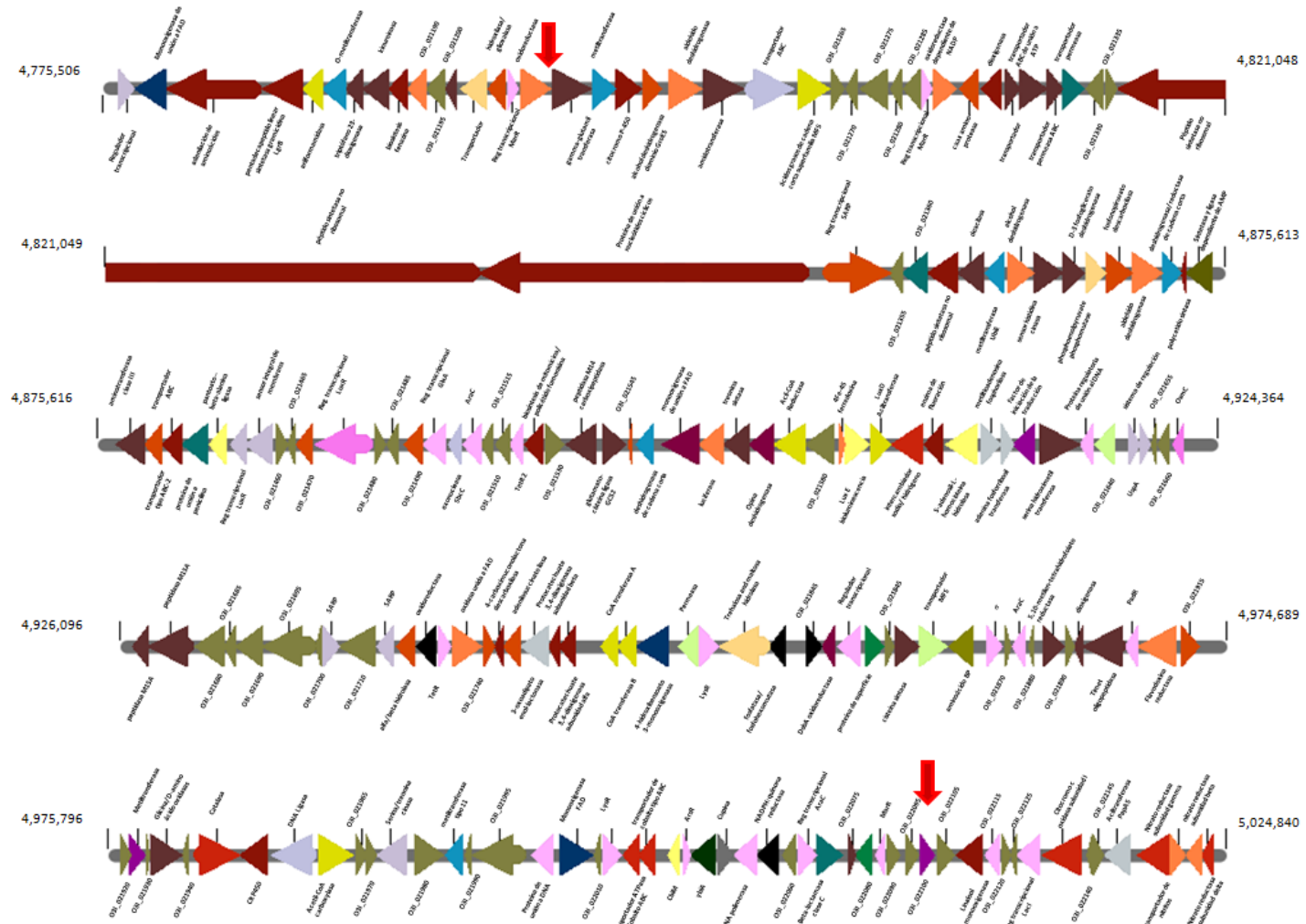


Fig. 4 Comparación de los genomas de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 y *N. brasiliensis* HUJEG-1 y su relación con RDNb2.

Se indica con una flecha la falta de sintenia en la región donde se encuentra la deleción RDNb2.

## Mapa RDNb2



**Tabla 9. Lista de genes pertenecientes al área perdida RDNb2**

**Información de almacenamiento y procesamiento**

Transcripción			
O3I_022085	Proteína regulatoria MarR	O3I_021835	Regulador transcripcional
O3I_022065	Regulador transcripcional familia AraC	O3I_021800	Regulador transcripcional familia LysR
O3I_022050	ARN Polimerasa factor sigma 70	O3I_021730	Regulador transcripcional familia TetR
O3I_022035	Regulador transcripcional familia ArsR	O3I_021635	Proteína reguladora de unión al ADN
O3I_022015	Regulador transcripcional familia LysR	O3I_021520	Regulador transcripcional putativo TetR
O3I_022000	Proteína de unión al ADN	O3I_021505	Proteína que contiene el dominio hélice-giro-hélice
O3I_021905	Regulador transcripcional familia parecido a PadR	O3I_021495	Regulador transcripcional GlxA parecido a HTH
O3I_021875	Proteína hipotética	O3I_021290	Regulador transcripcional familia MarR
O3I_021865	Factor sigma		
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis			
O3I_022100	Proteína hipotética	O3I_021625	Factor de inicio de la traducción, proteína de la familia aIF-2BI
O3I_021925	Metiltransferasa		
Replicación de ADN, recombinación y reparación			
O3I_021955	ADN ligasa	O3I_021500	Exonucleasa SbcC
O3I_021255	Transportador ABC		



## Procesos celulares

	Modificación post-traduccional, regulación de proteínas, chaperonas		
O3I_021475	Regulador transcripcional familia LuxR	O3I_021665	Proteína OsmC
	Pared celular/ membrana / biogénesis de la envoltura celular		
O3I_022080	Proteína hipotética	O3I_021840	Proteína de superficie celular
	Biogénesis de la envoltura celular/ membrana externa		Motilidad celular y secreción
O3I_022070	Hidrolasa	O3I_022040	Proteína de motilidad ybiA
O3I_021440	Proteína de unión a penicilina		
O3I_021325	Transportador permeasa		
	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos		
O3I_022025	Transportador permeasa ABC	O3I_021945	Catalasa
O3I_022020	Cobalto ABC transportador ATPasa	O3I_021600	Intercambio de sodio e hidrógeno
	Mecanismos de transducción de señales		
O3I_021975	Proteína serina/treonina cinasa	O3I_021705	Regulador transcripcional familia SARP
O3I_021715	Regulador transcripcional familia SARP	O3I_021650	Proteína de estrés universal UspA
O3I_021455	Sensor integral de membrana de transducción de señal de histidina cinasa		

## Metabolismo

### Producción de energía y conversión

O3I_021910	Ferredoxina	O3I_021405	Aldehído deshidrogenasa
O3I_021735	Proteína que contiene dominios oxidasa unidos a FAD	O3I_021380	Alcohol deshidrogenasa
O3I_021585	Proteínas que contienen dominios unidos a 4Fe-4S ferredoxina hierro-azufre	O3I_021295	Proteína que contiene dominios oxidoreductasa dependientes de NADP
O3I_021560	Luciferasa	O3I_021245	Aldehído deshidrogenasa

### Metabolismo y transporte de carbohidratos

O3I_021805	Glicosidasa	O3I_021395	Fosfoenolpiruvato fosfomutasa
------------	-------------	------------	-------------------------------

### Metabolismo y transporte de aminoácidos

O3I_022075	Proteína hipotética	O3I_021895	Glioxalasa/ proteína de resistencia a bleomicina/dioxigenasa
O3I_021935	Oxidoreductasa	O3I_021885	5,10-metilentetrahidrofolato reductasa
O3I_021900	Timet oligopeptidasa	O3I_021850	Cisteína sintasa
O3I_021630	Serina hidroximetiltransferasa	O3I_021370	Succinil-diaminopimelato desuccinilasa
O3I_021565	Piridoxal-5'-fosfato dependiente de la subunidad beta	O3I_021320	Permeasa transportador ABC
O3I_021540	Glutamato-cisteína ligasa GCS2	O3I_021315	Transportador ABC de unión a ATP
O3I_021535	Peptidasa M14 carboxipeptidasa	O3I_021310	Transportador
O3I_021425	Aminotransferasa clase III	O3I_021250	Amidotransferasa

O3I_021390	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	O3I_021225	Gamma-glutamyltransferasa
O3I_021385	Sensor histidina cinasa		

#### Peptidasas

O3I_021675	Peptidasa M15A	O3I_021670	Peptidasa M15A
------------	----------------	------------	----------------

#### Metabolismo y transporte de nucleótidos

O3I_021755	3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerasa	O3I_021615	Metiltioadenosina fosforilasa
O3I_021620	Adenina fosforribosiltransferasa		

#### Metabolismo de coenzimas

O3I_022030	Proteína de biosíntesis de cobalamina CbiM	O3I_021590	Proteína de bioluminiscencia LuxE
O3I_021610	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa	O3I_021445	Pantoato-beta-alanina ligasa

#### Metabolismo y transporte de lípidos

O3I_021960	Propionil-CoA carboxilasa cadena beta (PCCase)	O3I_021785	CoA transferasa subunidad A
O3I_021595	Aciltransferasa	O3I_021780	CoA transferasa subunidad B
O3I_021575	Acil-CoA reductasa	O3I_021260	Súper familia de proteínas de ácidos grasos de cadena corta MFS



#### Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo

O3I_021950	Citocromo P450 monooxigenasa	O3I_021415	Policétido sintasa
O3I_021765	Protocatechuate 3,4-dioxigenasa, subunidad beta	O3I_021365	Péptido sintetasa no ribosomal
O3I_021760	Protocatechuate 3,4-dioxigenasa, subunidad alfa	O3I_021345	Proteína de unión a nucleótidos cíclicos
O3I_021745	4-carboximuconolactona descarboxilasa	O3I_021340	Péptido sintetasa no ribosomal


O3I_021605	Enzima involucrada en fluoración	O3I_021305	Dioxigenasa
O3I_021525	Proteína hipotética	O3I_021235	Citocromo P-450
O3I_021435	Proteína transportadora tipo ABC		

### Involucradas en más de 1 función


	Producción de energía y conversión/ Predicción de función general		
O3I_022055	NADPH: quinona reductasa y oxidorreductasa dependiente de Zn	O3I_021725	Oxidorreductasa
	Metabolismo de coenzimas/ Producción de energía y conversión		
O3I_022005	Monooxigenasa de unión a FAD	O3I_021790	4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa
	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo/ Predicción de función general		
O3I_021985	Metiltransferasa tipo 11	O3I_021375	Metiltransferasa , familia UbiE/COQ5
O3I_021550	Deshidrogenasa de cadena corta	O3I_021230	Metiltransferasa
O3I_021410	Deshidrogenasa de cadena corta/ reductasa SDR		
	Mecanismos de transducción de señales/ transcripción		
O3I_021645	Sistema de dos componentes reguladores de respuesta	O3I_021450	Regulador transcripcional familia LuxR
O3I_022045	Cupina		Transporte y metabolismo de carbohidratos/ Predicción de función general
O3I_021855	Transportador putativo MFS		Transporte y metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y iones inorgánicos
O3I_021640	Proteína hipotética		Transporte y metabolismo de carbohidratos, aminoácidos/ Predicción de función general
O3I_021795	Transportador transmembrana		Transporte y metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y iones inorgánicos/ Predicción de función general

O3I_021420	Sintetasa y ligasa dependiente de AMP		Metabolismo de lípidos/ Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo
O3I_021360	Proteína hipotética		Biogénesis de la envoltura celular, membrana externa/ metabolismo y transporte de carbohidratos

### Pobremente caracterizadas

	Predicción de función general		
O3I_021915	Proteína hipotética	O3I_021490	Dominio ThiJ/Pfpl
O3I_021825	Proteína hipotética	O3I_021470	Proteína hipotética
O3I_021810	Hidrolasa	O3I_021430	Transportador tipo ABC-2
O3I_021750	3-oxoadipato enol-lactonasa	O3I_021400	Fosfonopiruvato descarboxilasa
O3I_021740	Proteína hipotética	O3I_021350	Regulador transcripcional familia SARP
O3I_021720	Alfa/beta hidrolasa	O3I_021300	Proteína de infección abortiva
O3I_021545	Proteína hipotética	O3I_021240	Alcohol deshidrogenasa dominio GroES


### Oxidorreductasas

	O3I_021830	DsbA oxidorreductasa	O3I_021555	Monooxigenasa de unión a FAD
	O3I_021570	Opina deshidrogenasa		

### Transportador general

	O3I_021860	Proteína de unión a aminoácidos
---	------------	---------------------------------

### Hipotéticas

	O3I_022095	Proteína hipotética	O3I_021870	Proteína hipotética
	O3I_022090	Proteína hipotética	O3I_021845	Proteína hipotética
	O3I_022060	Proteína hipotética	O3I_021710	Proteína hipotética
	O3I_022010	Proteína hipotética	O3I_021700	Proteína hipotética
	O3I_021995	Proteína hipotética	O3I_021695	Proteína hipotética

O3I_021990	Proteína hipotética	O3I_021690	Proteína hipotética
O3I_021980	Proteína hipotética	O3I_021685	Proteína hipotética
O3I_021970	Proteína hipotética	O3I_021680	Proteína hipotética
O3I_021965	Proteína hipotética	O3I_021660	Proteína hipotética
O3I_021940	Proteína hipotética	O3I_021655	Proteína hipotética
O3I_021930	Proteína hipotética	O3I_021580	Proteína hipotética
O3I_021920	Proteína hipotética	O3I_021530	Proteína hipotética
O3I_021890	Proteína hipotética	O3I_021515	Proteína hipotética
O3I_021510	Proteína hipotética	O3I_021265	Proteína hipotética
O3I_021485	Proteína hipotética	O3I_021465	Proteína hipotética
O3I_021480	Proteína hipotética	O3I_021330	Proteína hipotética
O3I_021460	Proteína hipotética	O3I_021285	Proteína hipotética
O3I_021465	Proteína hipotética	O3I_021280	Proteína hipotética
O3I_021460	Proteína hipotética	O3I_021275	Proteína hipotética
O3I_021355	Proteína hipotética	O3I_021270	Proteína hipotética
O3I_021335	Proteína hipotética		

## RDNb3

La deleción RDNb3 que comprende una pérdida de 31,711-pb, se ubica en la posición 1;501,900 - 1;533,611-pb del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P.O. A diferencia de RDNb2, la RDNb3 se sitúa en una región conservada del genoma del género *Nocardia*, lo cual es posible observar con la comparación entre los genomas de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 (NC\_016887.1) y *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358; NC\_018681.1) con la herramienta SynMap de la base de datos Accelerating Comparative Genomics (COGE), donde puede distinguirse la sintenia de la región donde ocurrió la deleción entre las secuencias genéticas de ambas cepas de *Nocardia*.

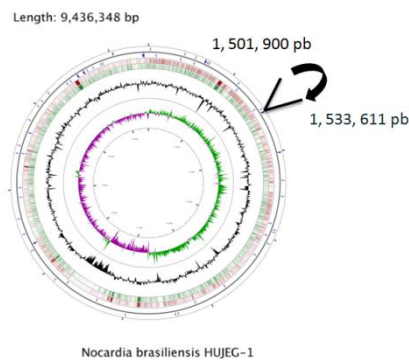


Fig. 6 Ubicación de la RDNb3 en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

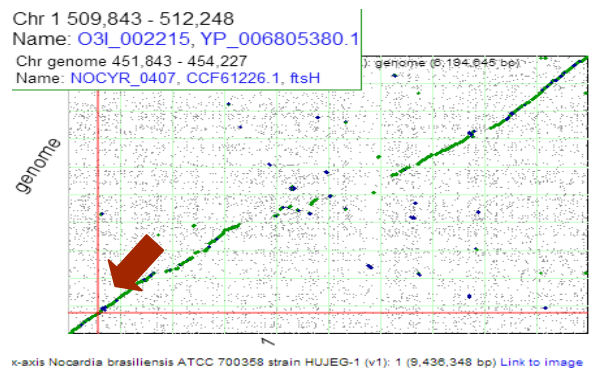


Fig. 7 Comparación de los genomas de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 y *N. brasiliensis* HUJEG-1 y su relación con RDNb3.

Se indica con una flecha la sintenia entre los genes en la región donde se encuentra la deleción RDNb3.

### Mapa RDNb3



Fig. 8 Mapa de la RDNb3. La cual comprende 31,711-pb donde se encuentran 32 genes, se indica con flechas rojas el inicio y fin de la deleción.



**Tabla 10. Lista de genes pertenecientes al área perdida RDNb3**

**Información de almacenamiento y procesamiento**

	Transcripción		
O3I_006550	Regulador transcripcional	O3I_006595	Factor sigma-70 familia RNA polimerasa
O3I_006570	Regulador transcripcional familia LysR	O3I_006605	Regulador transcripcional
O3I_006575	Regulador transcripcional familia XRE		




**Procesos celulares**

	Transporte de iones inorgánicos y metabolismo		
O3I_006600	Transportador C4-dicarboxilato / Proteína de transporte ácido málico	O3I_006620	Intercambio Na-Ca /integrina-beta 4
O3I_006610	Proteína hipotética	O3I_006630	Transportador

	Mecanismos de transducción de señales		Mecanismos de transducción de señales/ Transcripción
O3I_006695	Transducción de señal de histidina quinasa	O3I_006700	Regulación transcripcional familia LuxR

**Metabolismo**

O3I_006665	Proteína de la familia Mce		Producción de energía y conversión
O3I_006615	Proteína que contiene el dominio transglutaminasa		Transporte de aminoácidos y metabolismo

O3I_006555	Monooxigenasa	 Metabolismo de coenzimas / Producción de energía y conversión
O3I_006690	Deshidrogenasa de cadena corta / reductasa SDR	 Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo/ Predicción de función general
O3I_006545	Transportador	 Transporte y metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y iones inorgánicos/ Predicción de función general

 Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo

O3I_006560	Transporte de proteínas NatA de unión a ATP	O3I_006685	Aminoglucósido O-fosfotransferasa
------------	---	------------	-----------------------------------

### Pobremente caracterizadas

 Predicción de función general

O3I_006590	Haloalcano deshalogenasa	O3I_006635	Proteína de la familia YrbE
O3I_006625	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa relacionada con la proteína de unión a FMN	O3I_006640	Proteína de la familia YrbE
O3I_006645	Proteína de la familia Mce	O3I_006660	Proteína de la familia Mce
O3I_006650	Proteína de la familia Mce	O3I_006670	Proteína de la familia Mce
O3I_006655	Proteína de la familia Mce		



### Hipotéticas

O3I_006580	Proteína hipotética	O3I_006675	Proteína hipotética
O3I_006585	Proteína hipotética	O3I_006680	Proteína hipotética

También al hacer una comparación entre las secuencias de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P.0 y P.200 se encontraron 119 SNP's, de los cuales solo 27 posiblemente afectan genes.

De los 27 SNP's mencionados anteriormente, 13 de ellos se ubican en genes que codifican para proteínas hipotéticas, 4 a genes que participan en procesos de transcripción, 9 a genes de metabolismo de lípidos y aminoácidos y 1 a una proteasa.

A continuación se muestran los 27 SNP's y el gen sobre el que se ubican:

<b>Tabla 11. Lista de polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism, SNP's) en la secuencia de <i>N. brasiliensis</i> P. 200 con respecto a P.0</b>							
Ubicación	Posición de inicio	Posición de fin	Nucleótido de referencia	Nucleótido variante	Aminoácido de referencia	Aminoácido variante:	Nombre
contig00007	4822119	4822119	C	G	P	P	Proteína hipotética O3I_21875
contig00007	4822107	4822108	AT	-	D	CML	Proteína hipotética O3I_21875
contig00007	4822113	4822116	TTT	CTG	K	Q	Proteína hipotética O3I_21875
contig00007	4822106	4822106	T	GGC	K	CML	Proteína hipotética O3I_21875
contig00021	8842382	8842382	G	A	*2	*2	Proteína hipotética O3I_39728
contig00021	8842383	8842383	C	T	*2	*2	Proteína hipotética O3I_39728
contig00021	8842377	8842377	C	T	R	H	Proteína hipotética O3I_39728
contig00014	7586681	7586681	C	G	V	V	Oxidorreductasa dependiente de FAD
contig00001	580016	580016	T	G	M	L	Regulador transcripcional de la familia PaaX
contig00001	717678	717678	G	T	I	I	Regulador transcripcional de la familia GntR
contig00003	2198451	2198451	C	T	W	Alto	Proteína hipotética O3I_10119
contig00003	1937033	1937033	T	C	S	G	Proteína hipotética O3I_08919

contig00004	3058134	3058134	G	A	M	I	Proteína hipotética O3I_14189
contig00004	3395656	3395656	C	A	V	F	O-demetilpuromicina O- metiltransferasa
contig00006	4259234	4259234	G	A	A	V	Proteasa
contig00006	4367152	4367152	G	-	Q	CML	Proteína hipotética O3I_19830
contig00006	4411179	4411179	G	A	R	H	Proteína hipotética O3I_20030
contig00006	4231530	4231530	T	C	M	V	DNA topoisomerasa I sub unidad omega
contig00007	5156660	5156660	G	C	G	G	C-5 esterol desaturasa
contig00008	5496287	5496287	G	T	E	Alto	Regulador transcripcional
contig00009	5693017	5693017	G	A	A	V	Homoserin cinasa
contig00009	5881261	5881261	A	T	E	D	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa
contig00009	5907776	5907776	C	T	R	W	Homoserin O- acetiltransferasa
contig00011	6854030	6854030	G	A	A	A	Péptido sintetasa no ribosomal
contig00014	7793843	7793843	G	A	S	F	Dominio Acil-CoA deshidrogenasa
contig00017	8338850	8338850	C	T	P	L	Proteína hipotética O3I_37421
contig00019	8644621	8644621	C	T	D	N	Alfa-cetoglutarato descarboxilasa
<p><b>*2 = Las 2 mutaciones (G8842382A y C8842383T) generan un cambio de R a H en los aminoácidos.</b>  <b>CML = Cambio en el marco de lectura.</b></p>							

## 6.2 Desarrollo de un método para amplificar por PCR los genes ausentes en P. 200 y presentes en P. 0.

A partir de la identificación de las deleciones que ocurrieron en *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 200, así como su ubicación en el genoma de P. 0 y los genes que comprenden, se procedió a diseñar pares de iniciadores de algunos genes, la selección se basó en su función metabólica y su ubicación en la deleción, cubriendo así diferentes puntos de la misma con la intención de posteriormente analizar en que tiempo del subcultivo sucedieron las pérdidas genómicas y si se llevaron a cabo de manera uniforme.

A continuación se muestran esquemas de los genes seleccionados para su posterior amplificación.



Fig. 9 Genes seleccionados de la RDNb1 para su amplificación por PCR. Se diseñaron iniciadores en los genes O3I\_41150 y O3I\_41375 pertenecientes a la RDNb1, los cuales codifican para proteínas hipotéticas.

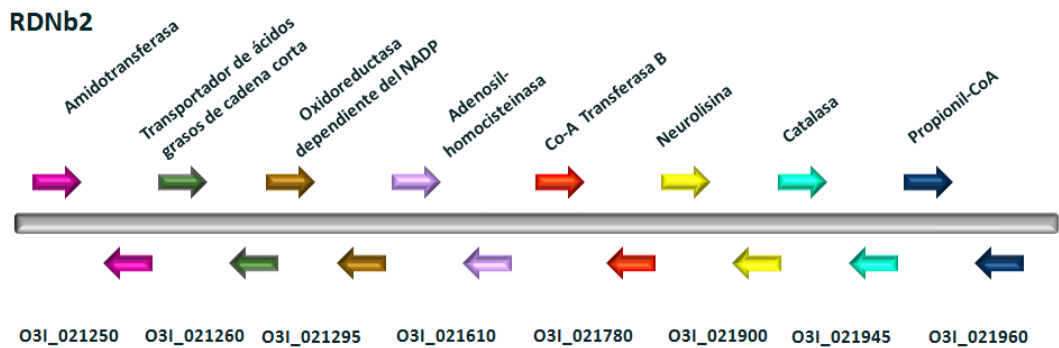


Fig. 10 Genes seleccionados de la RDNb2 para su amplificación por PCR. Se diseñaron iniciadores para ocho genes ubicados en la RDNb2, cubriendo así diferentes puntos de la delección.

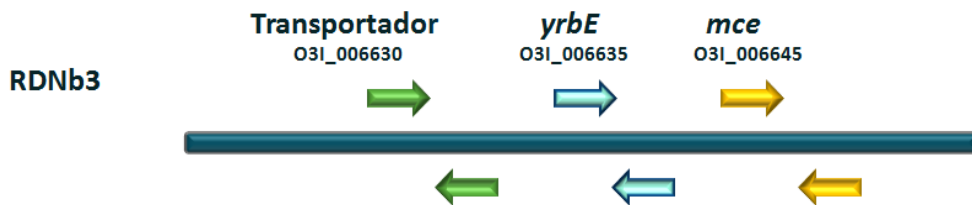


Fig. 11 Genes seleccionados de la RDNb3 para su amplificación por PCR. Los iniciadores se diseñaron en tres genes ubicados en RDNb3: O3I\_006630 con función de transportador, O3I\_006635 y O3I\_006645 que codifican para *yrbE* y *mce*, los cuales son miembros de un operón que se encuentra asociado a virulencia en otros microorganismos.

### 6.3 Determinación de RDNb1, RDNb2 y RDNb3 en los subcultivos (P.0, P.40, P.80, P.100, P.130 y P.200) de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 por medio de la técnica de PCR.

Para analizar cuando ocurrieron las deleciones encontradas, se empleó la técnica de PCR punto final. A partir de los iniciadores diseñados, junto con *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 0 y los subcultivos 0, 40, 80, 100, 130, 180, 190 y 200 se amplificaron los genes seleccionados, empleándose un control positivo que corresponde a un fragmento de 246-pb del gen 16S y como un control adicional el subcultivo 250 de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

En el caso de RDNb1, los 2 genes seleccionados que codifican para proteínas hipotéticas amplificaron hasta el subcultivo número 40, y no se observó su presencia en los subcultivos posteriores.

#### RDNb1

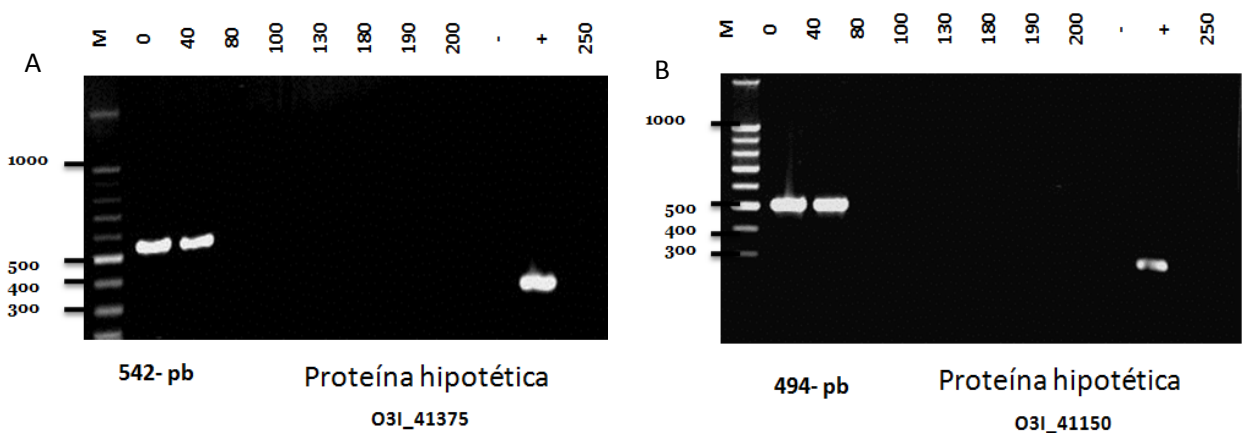
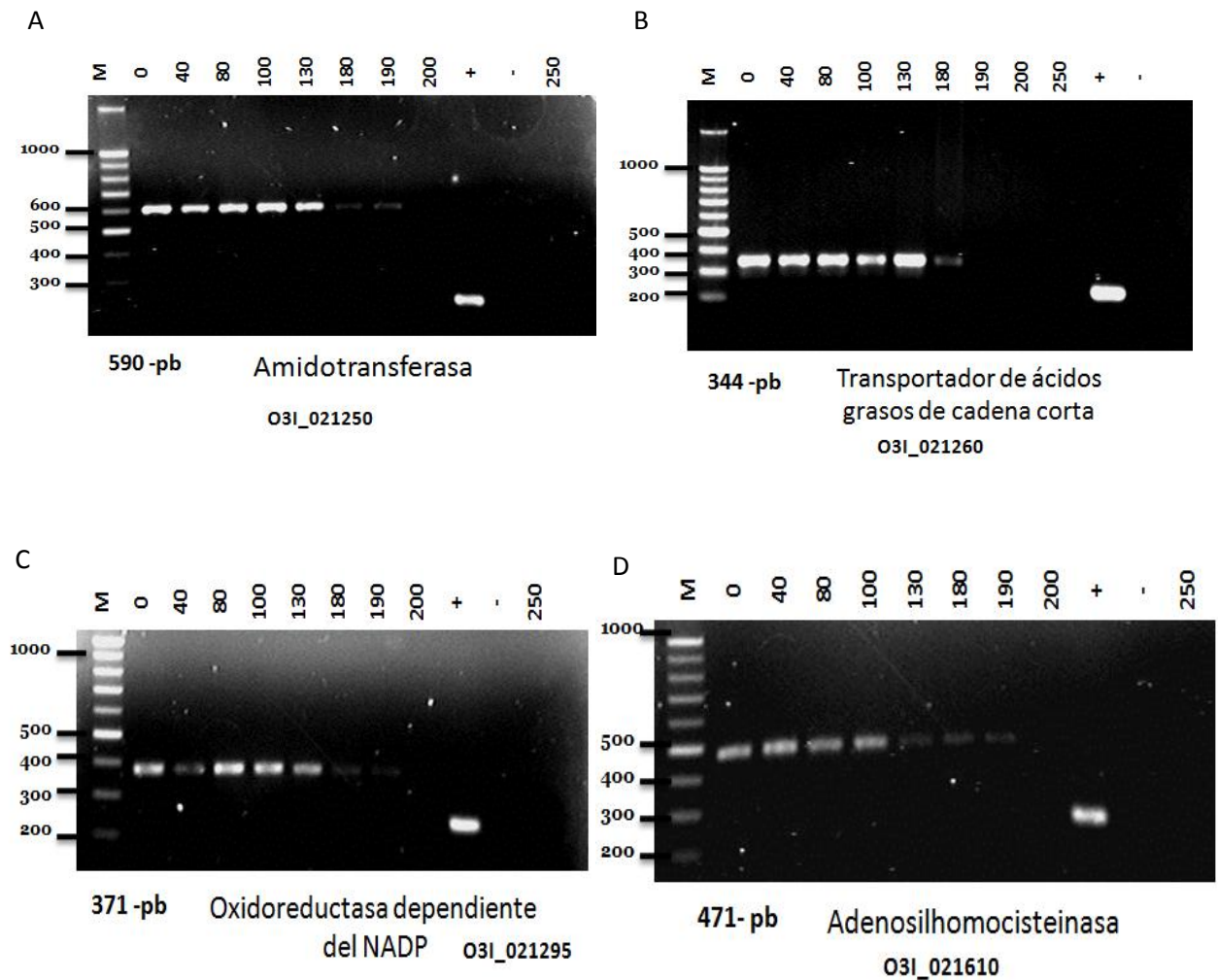


Fig. 12 (A -B) Análisis por PCR de los genes seleccionados de la RDNb1. Los carriles corresponden a los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se muestra la amplificación de dos genes que codifican para proteínas hipotéticas hasta el subcultivo 40. Carril M: marcador de 100-pb. Carril +: control positivo 16S de 234-pb.



Por su parte, de los 8 genes seleccionados de la RDNb2, los genes que codifican para un transportador de ácidos grasos de cadena corta (O3I\_021260) y propionil-coA (O3I\_021960) se detectaron hasta el subcultivo 180, mientras que el resto de los 6 genes analizados amplificaron al subcultivo 190, lo cual puede apreciarse en las siguientes figuras.

## RDNb2



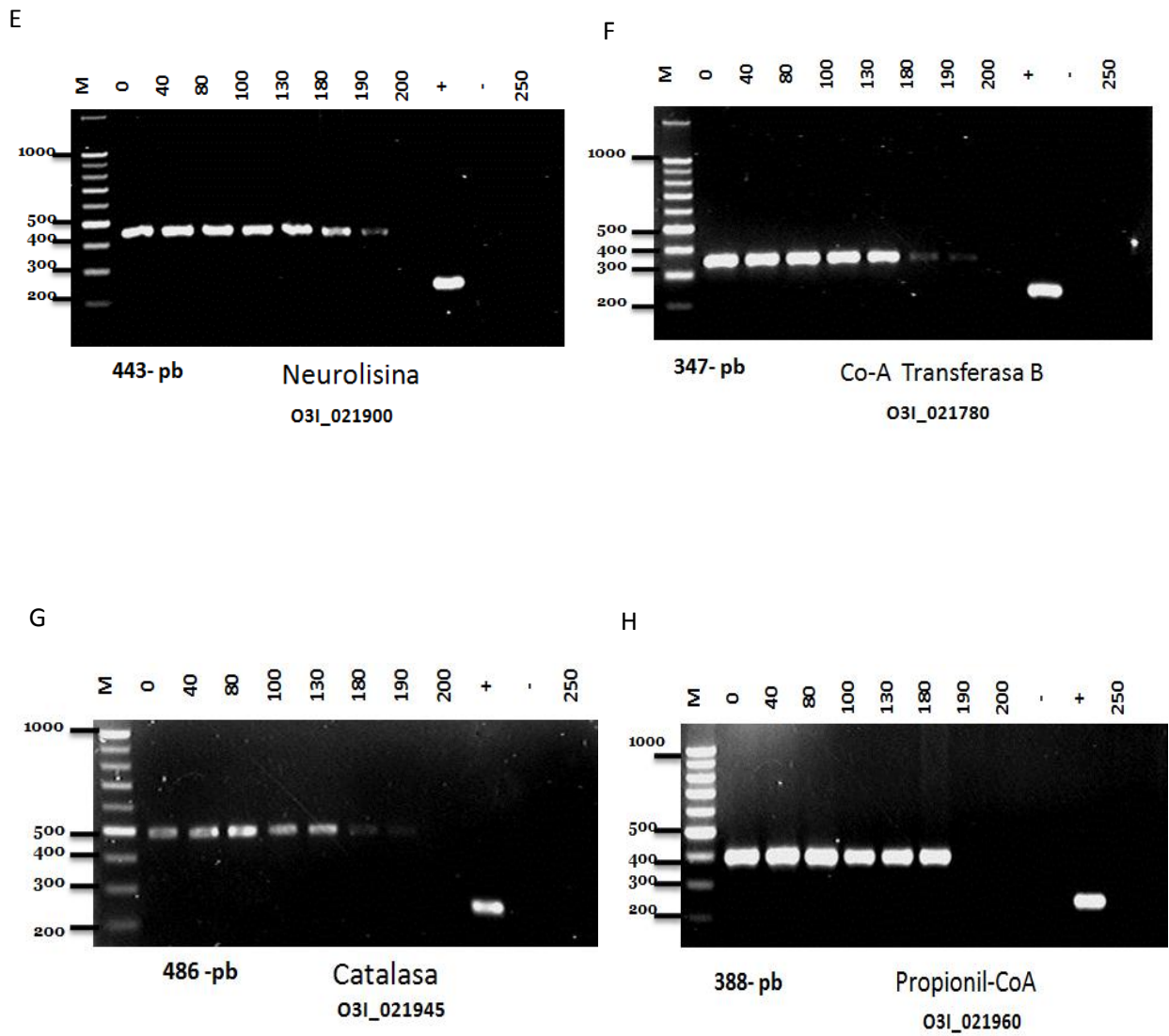


Fig. 13 (A-H) Análisis por PCR de los genes seleccionados de la RDNb2. Los carriles corresponden a los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se muestra la amplificación de ocho genes situados en RDNb2 hasta los subcultivos 180 y 190. Carril M: marcador de 100-pb. Carril +: control positivo 16S de 234-pb.

## RDNb3

Finalmente en la RDNb3, los 3 genes estudiados se visualizó la presencia de su amplificación hasta el subcultivo 40.

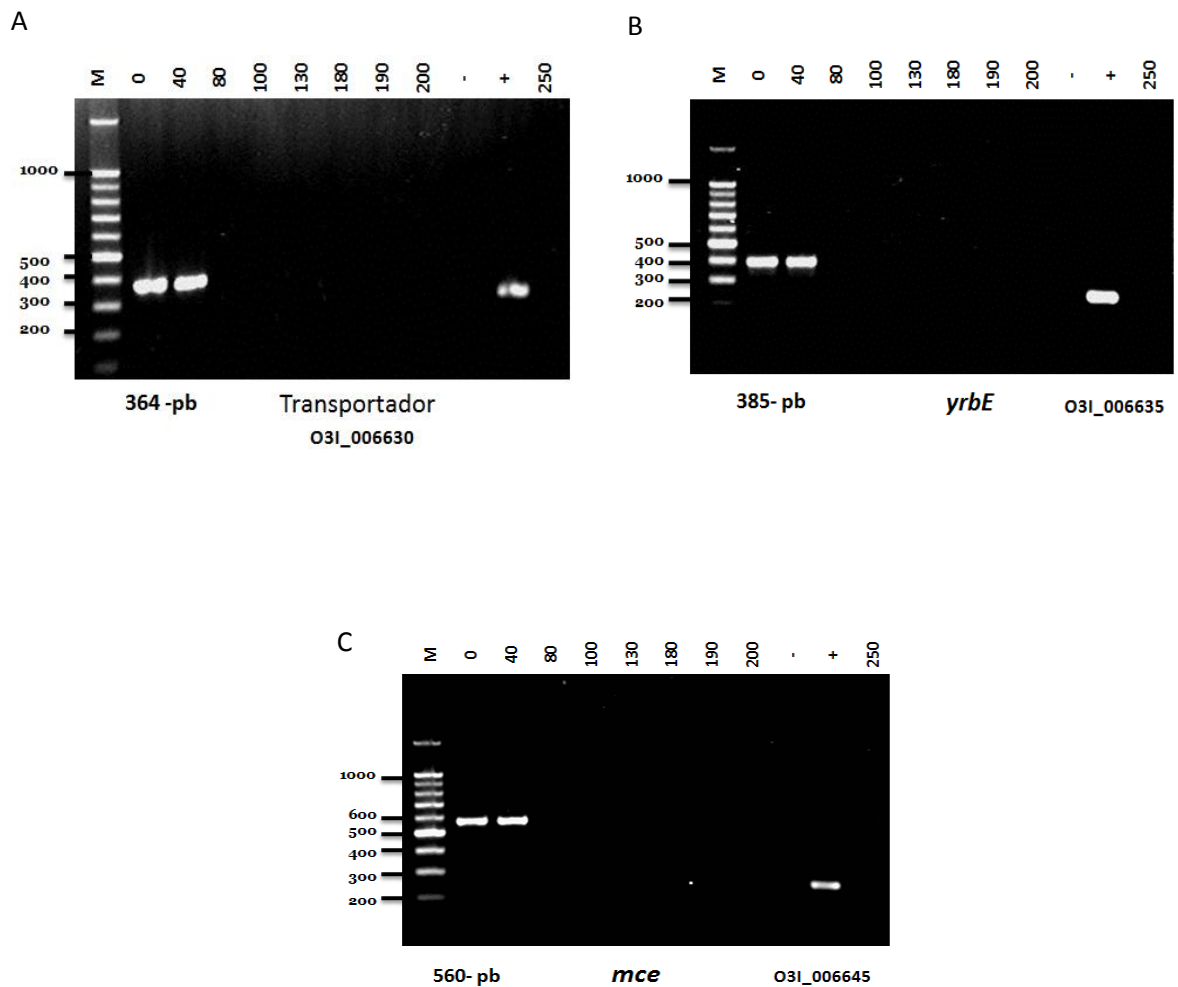


Fig. 14 (A-C) Análisis por PCR de los genes seleccionados de la RDNb3. Los carriles corresponden a los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se muestra la amplificación de tres genes situados en RDNb3 hasta el subcultivo 40. Carril M: marcador de 100-pb. Carril +: control positivo 16S de 234-pb.

**Amplificación de genes pertenecientes a las deleciones RDNb1, RDNb2 y RDNb3 detectadas por PCR punto final.**

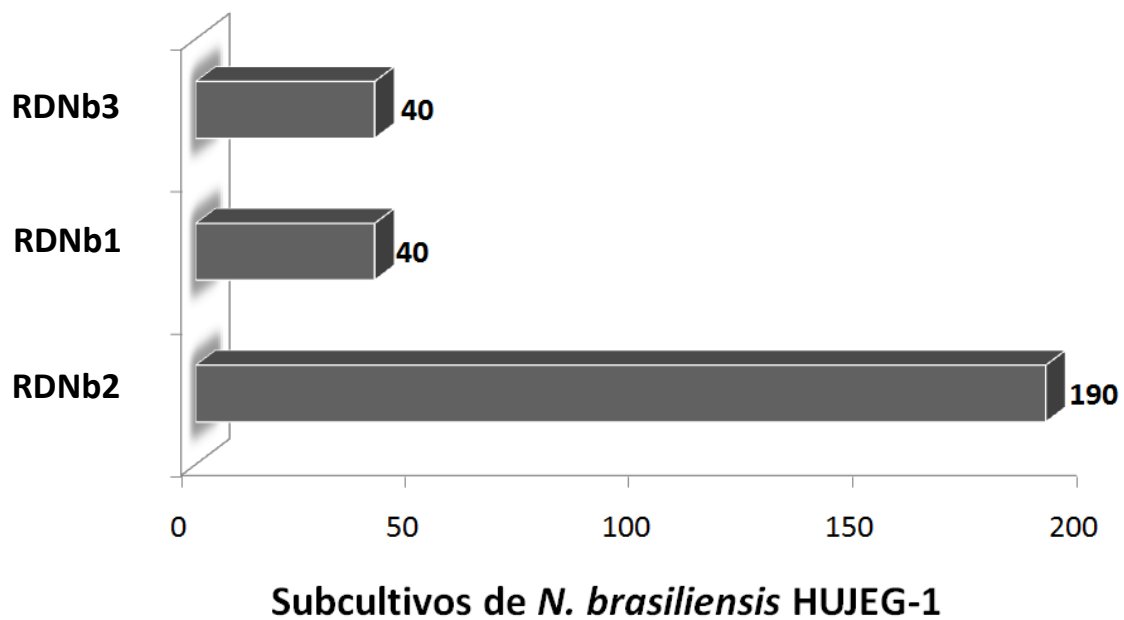


Fig. 15 Esquema de los resultados de PCR para las deleciones RDNb1, RDNb2 y RDNb3. Los resultados de las amplificaciones sugieren que la eliminación de los fragmentos RDNb1 y RDNb3 ocurrieron en subcultivos tempranos, mientras que la delección de RDNb2 ocurrió entre los subcultivos 190 y 200.

#### 6.4 Evaluación por Southern blot de la presencia de los genes en los subcultivos previos de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.

Por medio de la técnica de Southern blot detectamos la presencia de un gen para cada una de las 3 deleciones mencionadas anteriormente en los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1, con la finalidad de correlacionar estos resultados con los obtenidos por la técnica de PCR punto final.

Los resultados obtenidos de Southern blot nos indican que la pérdida de la RDNb1 ocurrió entre los subcultivos 75 y 80, como puede apreciarse en la siguiente figura donde se utilizó una sonda de 542-pb del gen O3I\_41375 que codifica para una proteína hipotética, la cual hibridó hasta el subcultivo 75, también puede apreciarse el control positivo en todos los subcultivos que corresponde a un fragmento de 246-pb del gen 16S, el cual tiene 3 copias en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

#### RDNb1

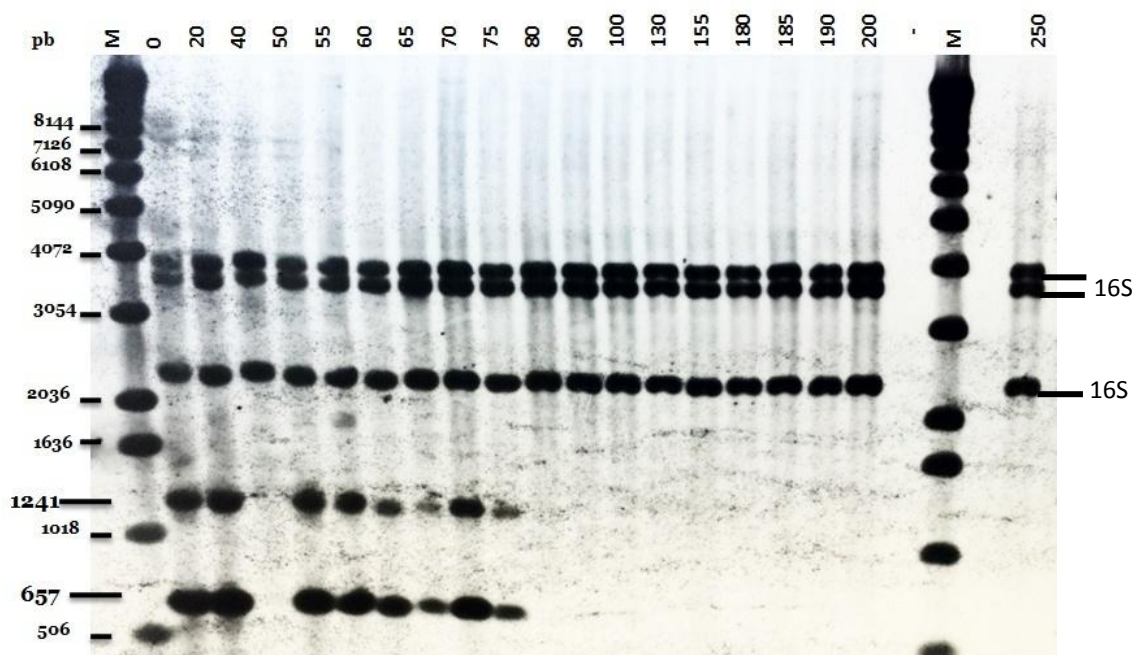


Fig. 16 Análisis por Southern blot de muestras de ADN de subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1 para demostrar la presencia del gen O3I\_41375 (proteína hipotética) perteneciente a RDNb1. Los carriles corresponden a los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se aprecia la presencia del gen O3I\_41375 hasta el subcultivo 75. Carril M: marcador de 1-kb. Control positivo: 16S.

Para la RDNb2 podemos apreciar por la técnica de Southern blot que la delección ocurrió posterior al subcultivo 155, lo cual puede observarse con la hibridación de una sonda de 486-pb del gen catalasa (O3I\_021945) al ADN genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1, así mismo se observa el control positivo 16S.

### RDNb2

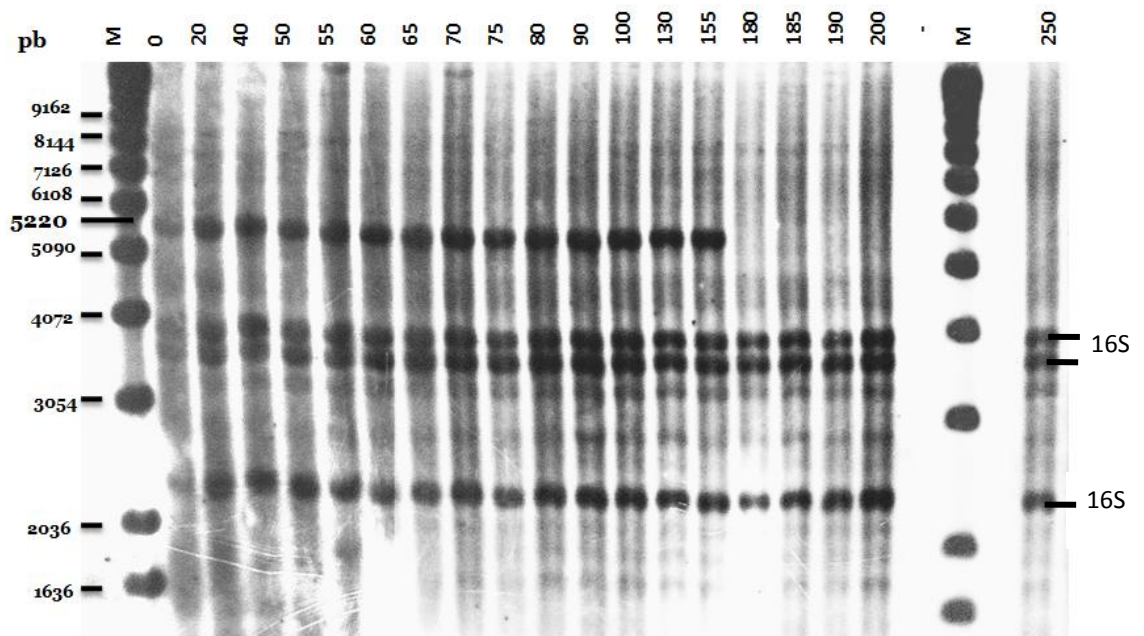


Fig. 17 Análisis por Southern blot de muestras de ADN de subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1 para demostrar la presencia del gen O3I\_021945 (catalasa) perteneciente a RDNb2. Los carriles corresponden a los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se aprecia la presencia del gen O3I\_021945 hasta el subcultivo 155. Carril M: marcador de 1-kb. Control positivo: 16S.



Para el caso de la RDNb3 se empleó una sonda del gen *mce* (O3I\_006645) de 560-pb que mostró hibridación con el ADN genómico de *N. brasiliensis* HUJEG-1 hasta el subcultivo 65.

### RDNb3

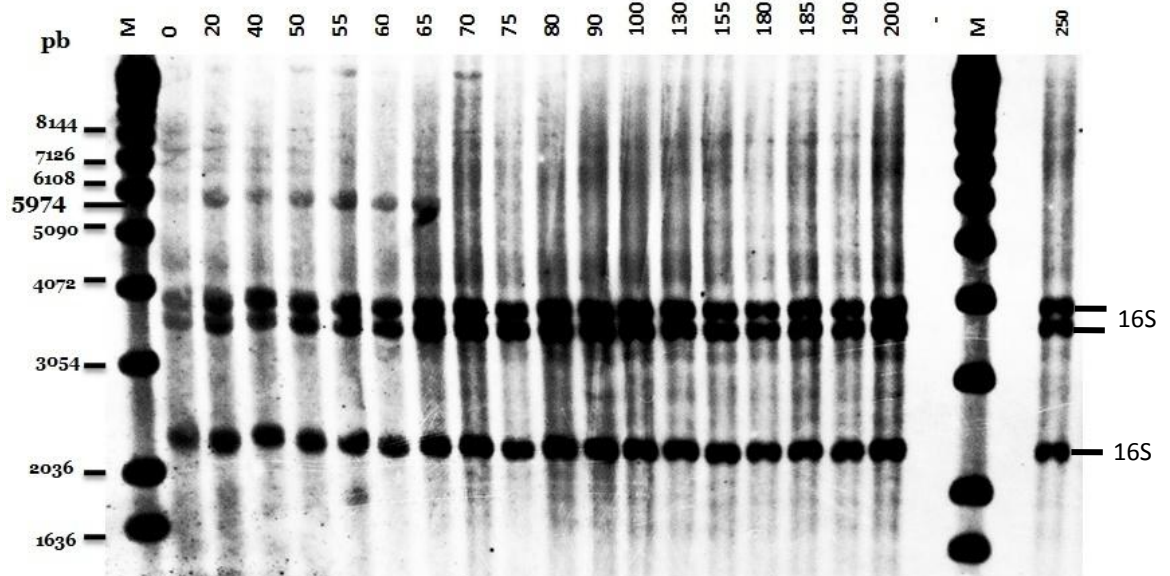


Fig. 18 Análisis por Southern blot de muestras de ADN de subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1 para demostrar la presencia del gen O3I\_006645 (*mce*) perteneciente a RDNb3. Los carriles corresponden a los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1, se aprecia la presencia del gen O3I\_006645 hasta el subcultivo 65. Carril M: marcador de 1-kb. Control positivo: 16S.

### Presencia de genes en los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P200

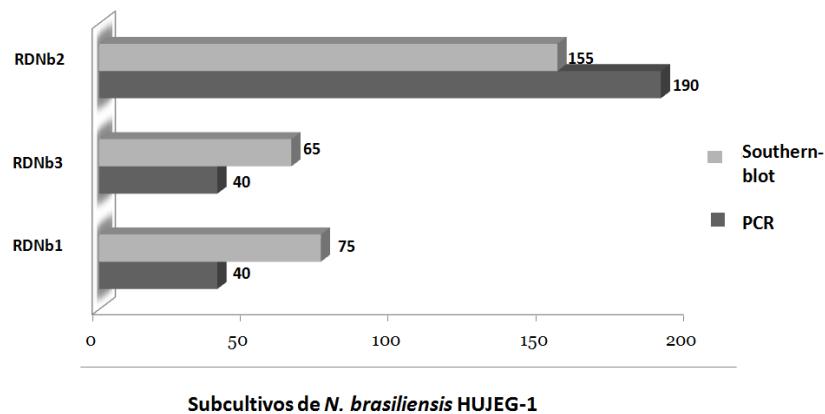


Fig. 19 Esquema de los resultados obtenidos por PCR y Southern blot para las deleciones RDNb1, RDNb2 y RDNb3.

## 6.5 Evaluación de la expresión de los genes de interés por PCR tiempo real.

Respecto a la expresión génica, seleccionamos el gen catalasa (O3I\_021945) que ha sido reportado como mecanismo de virulencia en el género *Nocardia* y que se encuentra en RDNb2, por la técnica de tiempo real se encontró que la expresión de dicho gen es estable entre *N. brasiliensis* HUJEG-1 P.0, P.40 y P.80, y que su expresión tiende a disminuir en subcultivos posteriores al P.80, continúa expresándose en menor medida hasta el P. 130; sin embargo al P. 190 ya no es detectable.

### Expresión del gen catalasa correspondiente a la RDNb2 en los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1.

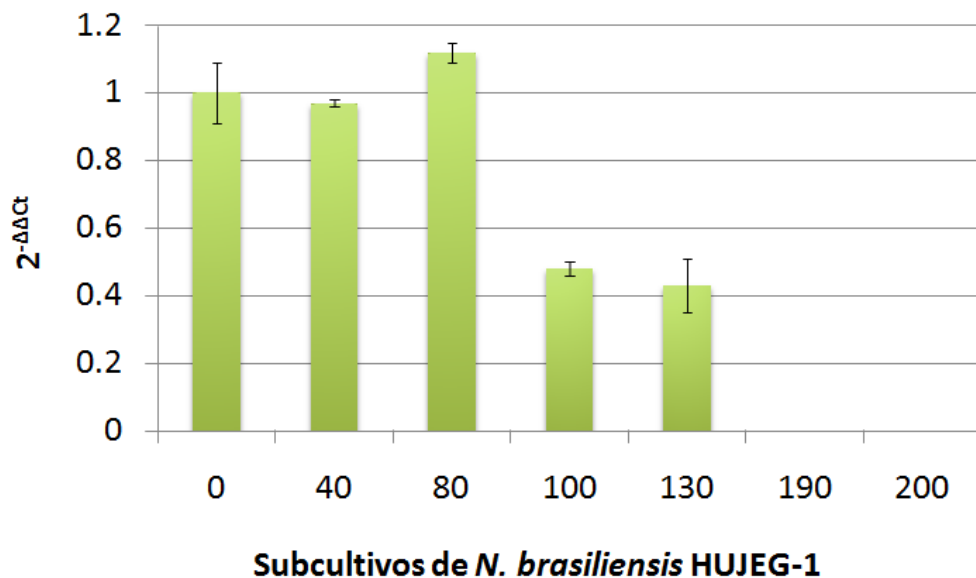


Fig. 20 Expresión del gen O3I\_021945 (catalasa) en los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1. Expresión constante del gen O3I\_021945 en la cepa parental (P. 0) y los subcultivos 40 y 80; obsérvese la disminución de la expresión del gen catalasa en los subcultivos 100 y 130; así como la ausencia de expresión en el subcultivo 190 y 200.



## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN

El subcultivo ha sido utilizado tanto para examinar el tiempo y modo de la evolución genómica y como un método para producir cepas atenuadas de organismos patógenos. Esto se ha logrado al repetir pasajes seriados de cepas parentales o virulentas, *in vitro* o en animales de laboratorio (Ebert, 1998). Para conseguirlo se requiere realizar cultivos continuos durante muchas generaciones y múltiples ensayos para determinar si el organismo subcultivado ha perdido patogenicidad. Las modificaciones genéticas que el organismo sufre han proporcionado un método para identificar genes relevantes en la patogenicidad en humanos (Martin *et al.*, 2008).

Entre los organismos en los que se ha estudiado el efecto del subcultivo se encuentran el virus de la rabia, los poliovirus, el virus del sarampión, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*, entre otros (Basombrío *et al.*, 2000, Jennings y Potter, 1999). La variación genética resultante se ha relacionado con cambios neutrales, benéficos o pérdida de virulencia.

En el presente estudio se analizó el efecto de 200 subcultivos continuos en la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1. Se comparó el genoma de la cepa sin subcultivar (P. 0) que es una cepa virulenta y capaz de ocasionar micetoma experimental en ratones y el genoma del subcultivo 200 (P. 200) que ya no causa micetoma en ratones BALB/c y se observaron cambios genéticos importantes en la cepa P. 200 que incluyen grandes deleciones y la presencia de varios SNP's que pueden estar implicados en las diferencias presentes entre estas dos cepas.

En *Escherichia coli* después de un período de pasaje diario continuo por aproximadamente 5 años, se logró alcanzar las 10 000 generaciones y observar una serie de cambios genéticos, destacando tres deleciones cuyo tamaño va de 6-23-kb y cuyos efectos en el genoma fueron benéficos y/o neutrales (Barrick *et al.*, 2009).

En *Mycobacterium bovis* BCG (la cual fue subcultivada 230 veces durante 13 años en un medio que contenía bilis de buey), se encontró que sufrió una serie de deleciones las cuales fueron denominadas Regiones de Diferencia o RD's, de las cuales destaca RD1 y RD2 que tienen un tamaño de ~ 9.5-kb y ~ 10.7-kb respectivamente. Estas RD's contienen genes involucrados en la respuesta T celular y formación del granuloma, siendo así implicados como genes importantes para la virulencia de este microorganismo (Kozak *et al.*, 2010).

Una comparación entre genomas de *M. tuberculosis* H37Rv (virulenta) y su contraparte H37Ra (avirulenta) obtenida después de un período de tiempo entre 3 y 4 meses en un medio sólido a base de huevo, indica que la cepa H37Ra presenta 53 inserciones y 21 deleciones que ocasiona que presente 8, 445-pb más que la cepa virulenta y posee 119 SNP's que afectan a 32 genes, las variaciones genéticas más importantes en H37Ra residen en las familias de genes IS6110, los cuales son capaces de insertarse en la secuencia de uno o varios genes y alterar su expresión, y la familia PE/PPE/PE-PGRS involucrados en la persistencia de la bacteria en macrófagos (Zheng *et al.*, 2008).

En el presente trabajo identificamos 3 deleciones importantes que denominamos RDNb1, RDNb2 y RDNb3 con tamaños de 59.7-kb, 216.3-kb y 31.7-kb respectivamente, resultando en una pérdida de 265 genes. Si bien la pérdida de material genético que puede incluir genes ancestrales se presenta frecuentemente en organismos simbioses obligados o parasíticos (Moran *et al.*, 2009), hasta nuestro conocimiento no se han reportado pérdidas genómicas de tamaño semejante mediante el subcultivo.

Mientras que para *N. brasiliensis* HUJEG-1 tomó aproximadamente 5 años en total alcanzar los 200 subcultivos (Almaguer *et al.*, 2011), para otros organismos estudiados como *Escherichia coli*, el presentar variaciones considerables en su genoma requirió al menos 5 años (Barrick *et al.*, 2009) y para *M. bovis* BCG se requirieron 13 años (Kozak *et al.*, 2010).

### 8.1 Comparación de los resultados obtenidos por PCR punto final y Southern blot.

Identificando las 3 deleciones encontradas en P. 200, así como los genes que comprendían dichas regiones se procedió a diseñar pares de iniciadores en genes importantes en metabolismo y de manera que cubrieran diferentes puntos de las deleciones. Partiendo de la técnica de PCR punto final y con la referencia de nuestros antecedentes directos en el cual se probaron los subcultivos 40, 80, 100, 130 y 200 en ratones BALB/c (Almaguer *et al.*, 2011) se logró identificar hasta que subcultivo los genes analizados seguían presentes en *N. brasiliensis*. Observamos que los genes de la RDNb1 y RDNb3 amplificaron hasta el subcultivo 40, ya no así en el subcultivo 80, por lo cual *N. brasiliensis* HUJEG-1 sufrió dos pérdidas genómicas en momentos tempranos de los subcultivos, lo cual es importante dado que desde el subcultivo 40, *Nocardia brasiliensis* ya mostraba una disminución de su virulencia. Para la RDNb2 se encontró que sus genes amplificaban hasta el subcultivo 180 y 190, es decir en momentos tardíos del subcultivo; sin embargo dado que en esta deleción se encuentran una gran cantidad de genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, lípidos, coenzimas, iones inorgánicos, metabolitos secundarios, factores de transcripción, proteasas y peptidasas, entre otros, correlaciona con la pérdida total de virulencia del P. 200 y propiedades biológicas que serán abordadas en el siguiente punto de la discusión.

Con el fin de analizar la evolución genómica se ha utilizado el pasaje seriado en organismos como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, encontrándose poblaciones genéticamente heterogéneas durante este proceso (Barrick *et al.*, 2009 y Brown *et al.*, 2011). En el presente trabajo empleamos la técnica Southern blot como un

apoyo a la identificación del tiempo en el cual ocurrieron las pérdidas genómicas durante el proceso de subcultivo, encontrando una concordancia para la RDNb1 y RDNb3 con los resultados obtenidos por PCR punto final en donde se descubrió que la pérdida de ambas zonas ocurrió entre los subcultivos 40 y 80, para el caso de la RDNb2 se identificó que su pérdida ocurrió entre los subcultivos 155 y 180, discrepando con los resultados por PCR punto final donde se detectaba hasta el subcultivo 190, ello puede deberse a la menor sensibilidad de la técnica de Southern blot (Gattuso, 2010) o bien a que existan poblaciones heterogéneas en los subcultivos de *N. brasiliensis* HUJEG-1 que provoquen esta discrepancia entre ambas técnicas; no obstante ambas metodologías empleadas concuerdan en que el subcultivo 200 ya no presenta la región RDNb2.

## 8.2 Cambios genéticos encontrados en *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 200.

La secuencia RDNb1 es muy posible que sea un elemento extracromosómico debido a que no ensambla en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 obtenido con un mapa óptico (OpGen, Gaithersburg, MD). Esta teoría se apoya por la presencia de un fragmento de ~ 1.5-kb el cual posee una similitud del 74% con un fragmento de la secuencia del plásmido pNF1 de *N. farcinica* IFM 10152; los genes de esta región codifican en su mayoría para proteínas hipotéticas y proteínas implicadas en procesos de transcripción y conjugación, lo que también concuerda con un posible plásmido.

RDNb2 es una región perdida de 216,371-pb, se ubica en la posición 4;795,938 -5;012,299 del genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ATCC 700358 (Número de acceso: NC\_018681.1), comprende 172 genes, su mayoría implicados en transporte y metabolismo de aminoácidos, lípidos, carbohidratos, coenzimas, nucleótidos y metabolitos secundarios, reguladores de transcripción así como proteínas hipotéticas de función desconocida. A pesar de que la ubicación de esta deleción parece ubicarse en una región no conservada en el género *Nocardia*, la pérdida de 172 genes podría explicar los cambios que presentó el subcultivo 200.

Entre las características de *Nocardia* se encuentra la ácido-alcohol resistencia, la cual depende de la composición de ácidos micólicos y el tipo de tinción utilizada, comúnmente se emplea la técnica de Kinyoun la cual favorece la

retención del colorante fucsina observándose por lo tanto a las bacterias con coloración roja (Wilson J., 2012); sin embargo el subcultivo 200 ha disminuido la capacidad de retener dicho colorante, por lo cual se tiñen del colorante azul de metileno. Esta pérdida de ácido-alcohol resistencia en el P. 200 podría explicarse con la pérdida de genes implicados en el metabolismo de lípidos, tales como: propionil-CoA carboxilasa cadena beta (PCCase), acil-CoA reductasa, CoA transferasa subunidad A, CoA transferasa subunidad B y la super familia de proteínas de ácidos grasos de cadena corta MFS, los cuales pertenecen a RDNb2.

En 1998 se reportó que en *Nocardia asteroides* la virulencia era mayor durante la fase de crecimiento exponencial, cuando abundan los filamentos, en comparación con la fase estacionaria en la que predominan células cocoides, observando que la composición de ácidos grasos y ácidos micólicos de la pared celular cambia durante el crecimiento, y que ambos son más poli-insaturados durante la fase logarítmica y se tornan más saturados durante la fase estacionaria (Beaman *et al.*, 1998); A diferencia de la cepa parental de *N. brasiliensis* HUJEG-1, el subcultivo 200 presenta disminución en la producción de filamentos, tal cambio podría relacionarse además de la delección de genes implicados en el metabolismo de lípidos, con una pérdida de 13 proteínas transportadoras ubicadas en las delecciones RDNb2 y RDNb3, del tipo permeasas transportadoras, transportadoras ABC y transportadoras ABC-2, entre otras, las cuales se encuentran relacionadas con el transporte de aminoácidos, metabolitos secundarios, carbohidratos e iones inorgánicos.

Dado que las proteínas transportadoras son fundamentales para permitir que moléculas, nutrientes o productos de desechos ingresen y salgan de la célula, y considerando como ejemplo a *Escherichia coli*, que para tener un crecimiento activo requiere ingresar  $\sim 10^6$  moléculas de glucosa por segundo (Phillips y Quake, 2006), aunado a que ha sido reportado que los transportadores ABC son importantes para la viabilidad, virulencia y patogenicidad (Davidson *et al.*, 2008), es factible que la delección de transportadores en el subcultivo 200 de *N. brasiliensis* HUJEG-1 afecte el crecimiento en forma de filamentos.

Otro cambio presentado en P. 200 es su sensibilidad a la eliminación por leucocitos polimorfonucleares característica que no es presentada por la cepa sin subcultivar. En 1985 se reportó que altos niveles de catalasa intracitoplasmática combinada con superóxido dismutasa parecen ser mecanismos primarios por los cuales *N. asteroides* evade los mecanismos de estrés oxidativo de los leucocitos polimorfonucleares, por lo cual ambas enzimas representan dos importantes factores de virulencia (Beaman *et al.*, 1985). En el presente trabajo encontramos que P. 200 perdió el gen O3I\_021945 que codifica para catalasa el cual se ubica en la RDNb2, asociando así el resultado obtenido en el trabajo de González-Carrillo, 2010.

Entre otros de los cambios presentados por la cepa P. 200 se encuentra un incremento en la tasa de crecimiento respecto a P. 0, dado que el subcultivo sufrió delecciones de genes que codifican para factores de transcripción de las familias SARP, AraC, LuxR, PadR-like y LysR ubicadas en las delecciones RDNb2 y RDNb3, de



las cuales: la familia SARP modula la frecuencia y tasa de transcripción, mientras que AraC se involucra con el metabolismo de carbono, respuesta al estrés y patogénesis, LuxR se relaciona con quorum sensing, biofilms, biosíntesis y metabolismo, PadR-like con la regulación negativa del metabolismo de ácidos fenólicos y finalmente la familia LysR con el metabolismo de carbono y nitrógeno (Ramos *et al.*, 2005). Es posible que la alteración de la regulación de todas las vías mencionadas anteriormente, influyera en un aumento de la tasa de crecimiento de *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 200.

Aunado a los cambios encontrados en P. 200 se añade el cambio de patrón de lípidos mediante extracciones con cloroformo-metanol observado por González-Carrillo, 2010, en donde la cepa P. 200 presentaba una menor densidad comparada con P. 0, tales cambios pueden relacionarse con los genes de la RDNb2 que se encuentran involucrados en el metabolismo y transporte de lípidos.

Finalmente uno de los cambios más significativos que se observó durante el subcultivo fue la disminución de la virulencia, desde el subcultivo 40 de *N. brasiliensis* HUJEG-1 probado en ratones BALB/c se apreció dicho cambio; sin embargo fue hasta el subcultivo 200 cuando ninguno de los ratones inoculados desarrolló micetoma. Al comparar los genomas de P. 0 y P. 200 logramos observar que como efecto del subcultivo se eliminaron 265 genes, de los cuales además de los involucrados en la síntesis de pared celular y lípidos abordados anteriormente,

se identificaron genes que codifican para proteasas y peptidasas como: caax amino proteasa, peptidasas M15A y carboxipeptidasa M14 ubicadas en la RDNb2.

La presencia de incrementos en serin-proteasas se ha relacionado con patogenicidad en estudios con *N. asteroides* (Tsuboi *et al.*, 1989) además es probable que algunas proteasas sean responsables del daño tisular en las lesiones de micetoma, además del deterioro en los huesos observado en las lesiones líticas de las infecciones crónicas (Salinas-Carmona *et al.*, 1992) por todo lo anterior consideramos importante la identificación de las proteasas encontradas postulándolas como posibles respuestas ante la disminución de virulencia observada en P. 200.

Como se ha mencionado anteriormente, el papel de la catalasa como un mecanismo de defensa por parte de *Nocardia asteroides* ante las especies reactivas de oxígeno producidas por leucocitos polimorfonucleares (Beaman *et al.*, 1985 ) es un mecanismo primario de virulencia. En el presente trabajo se encontró la delección del gen O3I\_021945 que codifica para una catalasa, el cual está ubicado en la RDNb2 además de asociarlo con la disminución de la sobrevivencia ante los leucocitos polimorfonucleares humanos de P. 200, al observar que la disminución de la expresión de su ARNm por tiempo real tiende a disminuir a partir del subcultivo 100, es posible también asociar la baja de su expresión con la disminución de la virulencia de *N. brasiliensis* HUJEG-1 cuando se probaron los subcultivos 100, 130 y 200 en ratones BALB/c (Almaguer *et al.*, 2011).

Asimismo se identificaron genes en la RDNb3 que codifican para una familia de proteínas denominada mamalian cell entry proteins (*mce*), las cuales se han propuesto como un mecanismo de virulencia. En 1993 se reportó que al clonar un fragmento de ADN de *M. tuberculosis*, confirió a una cepa no patógena de *Escherichia coli* la capacidad de invadir células Hela y aumentar la fagocitosis por macrófagos (Arruda *et al.*, 1993), posteriormente se identificó a dicho fragmento como miembro de esta familia de genes denominándolo *mce1*. Esta familia de genes se sitúa en operones con una disposición de dos genes *yrbE* seguido de seis genes *mce*. En *M. tuberculosis* se han encontrado 4 operones (*mce1-4*), los cuales son similares en secuencia y organización y basándose en la identificación de dominios conservados se ha sugerido que su función junto con los genes *yrbE* codifican para componentes de sistemas transportadores ABC (Kumar *et al.*, 2003), el operón *mce4* se ha reportado que codifica para un sistema de transporte de colesterol en *M. tuberculosis* y le permite a este organismo usar el colesterol como una fuente de carbono y energía (Pandey *et al.*, 2008); además se sabe que *mce4* es regulado por KstR, un tipo de regulador TetR y corregulado por otros genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos (Kendall *et al.*, 2007).

Una estrategia utilizada para elucidar el papel del operón *mce* es realizar mutantes "knock out", ello se llevó a cabo en los operones *mce1*, *mce2* y *mce3* de *M. tuberculosis*, infectándose por vía intratraqueal con estos microorganismos a ratones BALB/c, después de 10 semanas todos los ratones inoculados con las cepas mutantes sobrevivieron, mientras que los inoculados con cepas tipo silvestre

murieron (Gioffré *et al.*, 2005). Dado que *N. brasiliensis* HUJEG-1 P. 200 sufrió la deleción de un operón *mce*, es posible que la pérdida de este operón sea el responsable de la disminución de virulencia en P. 200. Todas estas hipótesis tendrán que ser comprobadas experimentalmente.

## CAPÍTULO VIII

### CONCLUSIONES

1. El subcultivo de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 tiene como efecto la pérdida gradual de fragmentos genéticos.
2. La pérdida de genes importantes en la síntesis de pared celular, lípidos, así como proteasas, peptidasas, la catalasa y *mce* parecen correlacionar con la pérdida de virulencia de *N. brasiliensis*.
3. La inactivación experimental de genes específicos nos dará información sobre el papel que juegan en la atenuación de *Nocardia brasiliensis*.

## CAPÍTULO IX

### LITERATURA CITADA

Alfaresi M, Elkosh A. 2006. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. *J Med Microbiol.* 55:1711-1715.

Almaguer-Chávez JA, Welsh O, Lozano-Garza HG, Said-Fernández S, Romero-Díaz VJ, Ocampo-Candiani J, Vera-Cabrera L. 2011. Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. *BMC Infectious Diseases.* 11:290.

Arenas R. 2008. *Micología médica ilustrada*. Ed. Mc Graw Hill. 3ª ed. pp.127-147.

Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science.* 261(5127):1454-1457.

Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. 2010. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection.* 38(2):89-97.

Bien J, Sokolova O, Bozko P. 2011. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *J. of Pathogens.*

Brown CT, Fishwich LK, Chokshi BM, Cuff MA, Jackson JM, Oglesby T, Rioux AT, Rodríguez E, Stupp GS, Trupp AH, Woollcombe JS, Wright TN, Zaragoza WJ, Drew JC, Triplet EW, Nicholson WL. 2011. Whole-genome sequencing and phenotypic analysis of *Bacillus subtilis* mutants following evolution under conditions of relaxed selection for sporulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (19):6867-6877.

Black CM, Paliescheskey M, Beaman BL, Donovan RM, Goldstein E. 1986. Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by *Nocardia asteroides*. *J. Clin. Microbiol.* 154(6):952-958.

Butler WR, Ahearn DG, Kilburn JO. 1986. High-performance liquid chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* Species. *J. Clin. Microbiol.* 23(1):182.

Basombrío MA, Segura MA, Gómez L, Padilla M. 2000. Studies on the virulence and attenuation of *Trypanosoma cruzi* using immunodeficient animals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95(1): p. 175-178.

Beaman BL, Scates SM, Moring SE, Deem R, Misra HP. 1983. Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. *J. Biol Chem.* 258:91-96.

Beaman BL, Black CM, Doughty F, Beaman L. 1985. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbial activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 47:135-141.

Beaman BL, Maslan S. 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infect Immun.* 20(1):290-295.

- Beaman BL, Moring SE. 1988. Relationship among cell wall composition, stage of growth, and virulence of *Nocardia asteroides* GUH-2. *Infect Immun.* 56(3): p. 557-563.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284:1520-1523.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci.* 104:5596-5601.
- Cardona PJ, Soto CY, Martín C, Giquel B, Agustí G, Guirado E, Sirakova T, Kolattukudy P, Julián E, Luquin M. 2005. Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection.* 8:183-190.
- Calmette A, Guerin C. 1909. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux d'origine, cultivé sur la bile de boeuf glycéinée. *C. R. Acad. Sci.* 149:716-718.
- Chesne-Seck ML, Barilone N, Boudou F, Asensio JG, Kolattukudy PE, Martin C. 2008. A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J. Bacteriol.* 190:1329-1334.
- Clemens JD, Jackie JH, Chuong JH, Feinstein AR. 1983. The BCG controversy: a methodological and statistical reappraisal. *JAMA.* 249:2362.
- Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72(2):317-364.
- Ebert D. 1998. Experimental evolution of parasites. *Science.* 282(5393): 1432-1436.
- Ellis TN, Beaman BL. 2002. Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon- $\gamma$  in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides*. *J Leukoc Biol.* 72:373-381.
- Filice GA, Beaman BL, Remington JS. 1980. Effects of activated macrophages on *Nocardia asteroides*. *Infect Immun.* 27(2):643-649.
- Franklin D, Lowy MD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Eng J Med.* 339:520-532.
- Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, Brodin P. 2008. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathogens.* 4:33.
- Gao Q, Kripke K, Arinc Z, Voskuil M, Small P. 2004. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 84:188-196.
- Gattuso P, Reddy V, David O. 2010. Differential diagnosis in surgical pathology. Saunders Elsevier. 2a ed. pp. 33.
- Gioffré A, Infante E, Aguilar D, Santangelo MP, Klepp L, Amadio A, Meikle V, Etchechoury I, Romano MI, Cataldia A, Pando-Hernández R, Bigia F. 2005. Mutation in mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes and Infection.* 7:325-334.

- Goodfellow M. 1973. Characterisation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* and related taxa. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*. 53:287-298.
- González-Carrillo C. 2010. Atenuación de *Nocardia brasiliensis* mediante cultivos seriados in vitro. XVIII Congreso iberolatinoamericano de dermatología. Noviembre 11 de 2010.
- González-Garza M T, Castro-Garza J, Cruz-Vega DE, Vargas-Villarreal J, Carranza-Rosales P, Mata-Cardenas BD, Siller-Campos L, Said-Fernández S. 2000. *Entamoeba histolytica*: diminution of erythrophagocytosis, phospholipase A(2), and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures. *Exp Parasitol*. 96:116–119.
- Hansen EJ, Wilson RM, Baseman JB. 1979. Two-dimensional gel electrophoretic comparison of proteins from virulent and avirulent strains of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun*. 24(2):468-475.
- Helal ZH, Khan MI, Ashour MS, Eissa SA. 2008. Detection and characterization of *Nocardia* from patients diagnosed as tuberculosis in Egypt. *Int J Biomed Sci*. 4(3): 179-184.
- Holt JG. 2000. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. pp.626.
- Jennings R, Potter W. 1999. Virus vaccines. in *virus culture: a practical approach*. Oxford University Press. pp. 156–160.
- Kendall SL, Withers M, Soffair CN, Moreland NJ, Gurcha S, Sidders B, Frita R, Ten Bokum A, Besra GS. 2007. A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 65: 684–699.
- Kozak RA, Alexander CD, Liao R, Sherman DR, Behr MA. 2010. Region of difference 2 contributes to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*. 79:59-66.
- Kumar A, Bose M, Brahmachari V. 2003. Analysis of expression profile of mammalian cell entry (mce) operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 71: 6083-6087.
- Long PF. 1994. A retrospective study of *Nocardia* infections associated with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Infection*. 22(5):362-364.
- López Martínez R, Mendez Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saul A, Macotela-Ruiz E. 1992. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac Med Mex*. 128:477-81.
- Martin C, Walker B. 2008. Attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex for laboratory and clinical use. *Tuberculosis*. 88:371-374.
- McNeil MM, Brown JM. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 7(3): 357-417.
- Molina-Torres CA, Castro-Garza J, Ocampo-Candiani J, Monot M, Cole ST, Vera-Cabrera L. 2010. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*. 59(4):384-91.
- Moran NA, McLaughlin HJ, Sorek R. 2009. The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science*. 323(5912):379-382.
- Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. 2003. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine*. 21:4270-4274.



- Pandey AK, Sassetti CM. 2008. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci.* 105: 4376-4380.
- Pandya U, Sinha M, Luxon BA, Watson DA, Niesel D. 2009. Global transcription profiling and virulence potential of *Streptococcus pneumoniae* after serial passage. *Gene.* 443:22-31.
- Phillips R, Quake SR. 2006. The biological frontier of physics. *Physics Today.*59:38-43.
- Pumarola A, Pumarola-Busquets A. 1987. *Microbiología y parasitología médica.* Ed. Masson. España. pp. 505-506.
- Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos MT, Brennan R, Tobes R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(2):326-356.
- Salinas-Carmona MC., Pérez LI, Welsh O, Rodríguez M, Rinaldi MG. 1992. Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. *J Mycol Med.* 2:1-6.
- Salinas-Carmona MC, Castro-Corona MA, Licón-Trillo A. 2002. Mecanismos de patogenicidad de *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides*. *Medicina Universitaria.* 4 (15):97-101.
- Salinas-Carmona MC, Torres-López E, Ramos AI, Licón-Trillo A, González-Spencer D. 1999. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun.* 67(5):2428-2432.
- Saubolle MA, Sussland D. 2003. Nocardiosis review of clinical and laboratory experience. *J. Clin. Microbiol.* 41(10):4497-4501.
- Silva CL, Faccioli LH. 1992. Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of *Nocardia brasiliensis* from the livers and spleens of mice. *Infect Immun.* 60:3566-3570.
- Somerville G, Beres SB, Fitzgerald JR, DeLeo FR, Cole RL, Hoff JS, Musser JM. 2002. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. *J. Bacteriol.* 184(5):1430-1437.
- Tsuboi R, Yamaguchi T, Matsuda K, Ogawa H. 1989. Extracellular proteinase production and the pathogenicity of Nocardiae. *Arch. Dermatol. Res.* 281: 78-80.
- Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E, Salinas-Carmona MC. 2012. Actinomycetoma and advances in its treatment. *Clinics in Dermatology.*30:372-381.
- Wilson JW. 2012. Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clin Proc.* 87(4):403-407.
- Wilson K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria, In Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman IG, Smith JA, Struhl K. Ed. *Current protocols in molecular biology*, Vo. 1. New York, N.Y.: Wiley Interscience, 19: 2.4.1
- Young LS, Rubin RH. 2002. Mycobacterial and nocardial diseases in the compromised host. *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host.* 4<sup>a</sup> ed. pp.257-261.

## CAPÍTULO X

### ANEXOS

Reactivos de detección para el Southern blot			
Solución 1		Solución 2	
Luminol	100 $\mu$ l	Peróxido de hidrógeno	10 $\mu$ l
Ácido coumárico	44 $\mu$ l	Tris 1 M pH 8.5	1 ml
Tris 1 M pH 8.5	1 ml	Agua bidestilada	9 ml
Agua bidestilada	8.85 ml		

\*Preparación de reactivos en condiciones de oscuridad.

Solución desnaturalizante: 86 g de NaCl (1.5 M) más 20 g de NaOH (0.5M), aforar a 1 L con agua destilada.

Buffer de neutralización: 86 g de NaCl (1.5 M) más 60.5 g de Tris (0.5 M). Disolver y ajustar a pH 7.5 con HCl concentrado, aforar a 1 L con agua destilada.

Buffer 20X SSC: 175.3 g NaCl más 88.2 g de citrato de sodio, aforar a 1L con agua destilada.

Buffer de lavado primario: 25 ml de SSC 20X, agregar 4 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), aforar a 1 L con agua destilada.

Buffer de lavado secundario (2X): 100 ml de SSC 20X, y aforar a 1L con agua destilada.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Mayra Paola Campos Rivera

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE UNA CEPA ATENUADA DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Biografía:

Datos Personales: Nacida el 15 de Septiembre de 1985 en la ciudad de Monterrey, Nuevo León. Hija de Juan Antonio Campos Martínez y María Elena Rivera Deansso.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2007.

Reconocimientos: Estudiante de Posgrado Distinguido en la Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética en el año 2012.

Participación en el Programa de Búsqueda y Desarrollo de Talentos a Nivel Superior de la Universidad Autónoma de Nuevo León, noviembre de 2003.

Tesis desarrolladas: Caracterización de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* cepas IB-2 a IB-27. Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2007. Tesis de Licenciatura.

Experiencia Profesional: Químico en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de 2008 a 2010.

Publicaciones en revistas indexadas: 2.

## *In Vitro* Activity of ACH-702, a New Isothiazoloquinolone, against *Nocardia brasiliensis* Compared with Econazole and the Carbapenems Imipenem and Meropenem Alone or in Combination with Clavulanic Acid<sup>∇</sup>

Lucio Vera-Cabrera,<sup>1\*</sup> Mayra Paola Campos-Rivera,<sup>1</sup> Wendy G. Escalante-Fuentes,<sup>1</sup>  
Michael J. Pucci,<sup>2</sup> Jorge Ocampo-Candiani,<sup>1</sup> and Oliverio Welsh<sup>1</sup>

Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Monterrey, N.L., México,<sup>1</sup> and Achillion Pharmaceuticals, Inc., 300 George Street, New Haven, Connecticut 06511<sup>2</sup>

Received 27 October 2009/Returned for modification 28 December 2009/Accepted 6 March 2010

**The *in vitro* activities of ACH-702 and other antimicrobials against 30 *Nocardia brasiliensis* isolates were tested. The MIC<sub>50</sub> (MIC for 50% of the strains tested) and MIC<sub>90</sub> values of ACH-702 were 0.125 and 0.5 µg/ml. The same values for econazole were 2 and 4 µg/ml. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of imipenem and meropenem were 64 and >64 µg/ml and 2 and 8 µg/ml, respectively; the addition of clavulanic acid to the carbapenems had no effect.**

Actinomycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* is a localized but progressive infectious disease which affects the skin, subcutaneous tissue, and bones (21). Several antimicrobials, including sulfonamides, aminoglycosides, beta-lactams, etc., have been used in the therapy of actinomycetoma (3). However, in some cases a cure is not obtained, making it important to evaluate the *in vitro* and *in vivo* activities of new antimicrobials.

Quinolones have been widely used to treat infections by gram-negative and gram-positive bacteria (14); among them, moxifloxacin and gatifloxacin are active *in vitro* and *in vivo* against *N. brasiliensis* (6, 8, 18). ACH-702, (R)-7-[3-(1-amino-1-methyl-ethyl)-pyrrolidin-1-yl]-9-cyclopropyl-6-fluoro-8-methoxy-9H isothiazolo[5,4-b]quinoline-3,4-dione (Fig. 1), is a novel isothiazoloquinolone compound with good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and enterococci, even against methicillin- and vancomycin-resistant isolates (16, 20). Its high activity against these gram-positive microorganisms raises the possibility that *Nocardia* spp., especially *N. brasiliensis* isolates, would also be susceptible to this new isothiazoloquinolone.

Imidazoles have been traditionally used against eukaryotic organisms since they interfere in the synthesis of ergosterol by inhibiting the cytochrome oxidase group of enzymes (CYP proteins); these enzymes were thought not to exist in prokaryotic organisms. However, sequencing in recent years of the genomes of many prokaryotes, including *Mycobacterium tuberculosis*, has shown the presence of CYP proteins in many of them, prompting testing of the activity of these compounds against species of *Mycobacterium* and *Nocardia*. Some of these compounds were active *in vitro*, particularly econazole (1, 2, 7).

However, in one study (7), only one isolate of *N. brasiliensis* isolate was used, exhibiting an MIC of 1 µg/ml, making it necessary to extend the study using more clinical isolates.

Beta-lactams have been used widely to treat gram-positive infections. Because of the presence of potent beta-lactamases in nocardiae, their use against these microorganisms has been very limited (3, 21); amoxicillin-potassium clavulanate acid has been one of the most successfully used compounds to treat human cases of actinomycetoma (5). Imipenem has been used in clinical cases of *N. brasiliensis* infection in combination with other drugs, with good results observed (10). More recently, it has been observed that some carbapenems, such as imipenem and meropenem, are active against *M. tuberculosis* isolates, but only when combined with a beta-lactamase inhibitor, clavulanic acid (12).

In this work, we report the susceptibility of *N. brasiliensis* isolates to ACH-702, as well as other potentially active compounds, including econazole and carbapenems (imipenem and meropenem), alone or combined with clavulanic acid.

We studied 30 isolates from the collection of the Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica of the Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Universitario de Nuevo León, including *N. brasiliensis* HUJEG-1, which was utilized previously in other *in vitro* and *in vivo* assays (11, 17). All of the isolates tested came from human cases of actinomycetoma and were identified as *N. brasiliensis* by biochem-

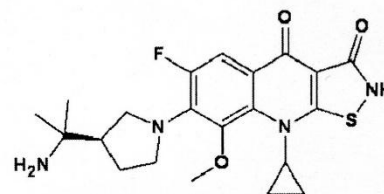


FIG. 1. Chemical structure of ACH-702.

\* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Madero y Gonzalitos, Colonia Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L., México. Phone: (528) 348 03 83. Fax: (528) 348 44 07. E-mail: luvera\_99@yahoo.com.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 22 March 2010.

TABLE 1. *In vitro* activities of ACH-702 and other antimicrobials against *N. brasiliensis* isolated from human cases of actinomycetoma

Antimicrobial agent(s)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Range	50% of strains tested	90% of strains tested
ACH-702	0.03–2	0.125	0.5
Econazole	1–8	2	4
Imipenem	1–>64	64	>64
Imipenem + clavulanic acid	1–>64	64	>64
Meropenem	1–>64	2	8
Meropenem + clavulanic acid	1–>64	2	8

ical methods and by nucleotide sequence analysis of a fragment of the 16S RNA gene of the small ribosomal unit as previously described (17).

ACH-702 was kindly donated by Achillion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, CT. Econazole and clavulanic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Imipenem and meropenem were obtained from commercial sources.

The broth microdilution method used was based on the CLSI M24-A document (15) and has been previously described (18). Briefly, ground colonies were suspended in 1 ml of saline solution and diluted with cation-adjusted Mueller-Hinton broth until the turbidity matched that of a 0.5 McFarland standard. This suspension was diluted to obtain a solution with a final concentration of  $1 \times 10^4$  to  $5 \times 10^4$  CFU per well in 0.1 ml. This solution then was added to microplate wells (Microtest Primaria; Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) containing an equal volume of broth with serial dilutions of the drugs to be tested. As a growth control, we similarly inoculated a well containing cation-adjusted Mueller-Hinton broth without drug. After 3 days of incubation at 35°C, the plates were read and the MIC was determined as the lowest concentration of drug that totally inhibited nocardial growth. As external controls, we used *Escherichia coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213. Econazole, imipenem, and meropenem were tested at concentrations of 64 to 0.25  $\mu\text{g/ml}$ . The lowest concentration of ACH-702 used was 0.03  $\mu\text{g/ml}$ . To test the effect of the beta-lactamase inhibitor on carbapenem activity, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  clavulanic acid was added to all of the carbapenems (12).

The MICs of ACH-702 and the other antimicrobial agents tested for the 30 clinical isolates of *N. brasiliensis* tested are summarized in Table 1. The MIC<sub>50</sub> (MIC for 50% of the strains tested) and MIC<sub>90</sub> values for ACH-702 were 0.125 and 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . The same values for econazole were 2 and 4  $\mu\text{g/ml}$ . The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for imipenem were 64 and >64  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Only seven isolates had an MIC of <2  $\mu\text{g/ml}$ . For meropenem, the values were 2 and 8  $\mu\text{g/ml}$ . For this compound, 16 out of 30 isolates tested exhibited an MIC value of  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ . The addition of clavulanic acid to the carbapenems did not change the MIC values significantly.

Although imidazoles have been traditionally used against eukaryotic organisms, recently it has been observed that actinobacteria, including mycobacteria and nocardiae, are also susceptible to this class of antimicrobials (2, 7). In our work, we

observed that most (90%) of the isolates exhibited an MIC of  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  for econazole. In mice, econazole given orally at 3.3 mg/kg, is rapidly metabolized and achieves plasma concentrations (maximum concentration of drug in plasma, 0.23  $\mu\text{g/ml}$ ; time to maximum concentration of drug in plasma, 1 h) below this MIC value (2). Given these parameters, we believe that econazole will not work effectively in the experimental mouse model. However, new imidazole compounds are being launched in the market and it is possible that in the future more potent drugs or other delivery methods would open up the possibility of therapy of actinomycetoma caused by *N. brasiliensis* using this class of antimicrobials.

Beta-lactams have been of limited use in the treatment of *N. brasiliensis* infections. Recently, it has been reported that carbapenems plus clavulanic acid have shown some activity against *M. tuberculosis* isolates (12). In our work, we did not find any difference when clavulanic acid was added, with MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values remaining the same. At best, imipenem or meropenem can be effective in human patients with isolates exhibiting MIC values of  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ , since the levels of these drugs remain over 2  $\mu\text{g/ml}$  for 3 to 4 h in humans after the intravenous administration of 1,000 mg (9). Given the observed differences in susceptibility among clinical isolates, it would be important to perform susceptibility tests prior to the initiation of therapy with these agents. Also, it will be important to assess the antibacterial activity of future beta-lactams that have the desirable advantage of oral administration for the treatment of *Nocardia* infections.

Quinolones, including ofloxacin, ciprofloxacin, and moxifloxacin, have been used in the therapy in infections caused by *Nocardia* spp. (4, 13, 22). However *N. brasiliensis* is a more resistant species and only newer compounds such as gatifloxacin, garenoxacin, and moxifloxacin have shown excellent *in vitro* and *in vivo* effects against this microorganism (3, 6, 8, 18). Of these quinolones, only moxifloxacin is available on the market, but its use has not been reported for actinomycetoma patients. ACH-702 showed MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values (0.125 and 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) lower than those of gatifloxacin (0.5 and 2  $\mu\text{g/ml}$ ) and moxifloxacin (0.5 and 2  $\mu\text{g/ml}$ ) (18), which suggests that this may be a promising compound to treat *N. brasiliensis* infections, although it will be important to test its intracellular (19) and *in vivo* activities against this bacterium.

#### REFERENCES

- Ahmad, Z., S. Sharma, G. K. Khuller, P. Singh, J. Faujdar, and V. M. Katoch. 2006. Antimycobacterial activity of econazole against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28:543–544.
- Ahmad, Z., S. Sharma, and G. K. Khuller. 2006. Azole antifungals as novel chemotherapeutic agents against murine tuberculosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 261:181–186.
- Ameen, M., and R. Arenas. 2009. Developments in the management of mycetomas. *Clin. Exp. Dermatol.* 34:1–7.
- Bath, P. M., K. W. Pettingale, and J. Wade. 1989. Treatment of multiple subcutaneous *Nocardia asteroides* abscesses with ciprofloxacin and doxycycline. *Postgrad. Med. J.* 65:190–191.
- Bonifaz, A., P. Flores, A. Saúl, E. Carrasco-Gerard, and R. M. Ponce. 2007. Treatment of actinomycetoma due to *Nocardia* spp. with amoxicillin-clavulanate. *Br. J. Dermatol.* 156:308–311.
- Chacon-Moreno, B. E., O. Welsh, N. Cavazos-Rocha, M. de la Luz Salazar-Cavazos, H. G. Garza-Lozano, S. Said-Fernandez, J. Ocampo-Candiani, and L. Vera-Cabrera. 2009. Efficacy of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Nocardia brasiliensis* in vitro and in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:295–297.
- Dabbs, E. R., S. Naidoo, C. Lephoto, and N. Nikitina. 2003. Pathogenic

- Nocardia*, *Rhodococcus*, and related organisms are highly susceptible to imidazole antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1476–1478.
8. Daw-Garza, A., O. Welsh, S. Said-Fernández, H. G. Lozano-Garza, N. Waksman de Torres, N. C. Rocha, J. Ocampo-Candiani, and L. Vera-Cabrera. 2008. In vivo therapeutic effect of gatifloxacin on BALB/c mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1549–1550.
  9. Dreetz, M., J. Hamacher, J. Eller, K. Borner, P. Koeppe, T. Schaberg, and H. Lode. 1996. Serum bactericidal activities and comparative pharmacokinetics of meropenem and imipenem-cilastatin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:105–109.
  10. Fuentes, A., R. Arenas, M. Reyes, R. F. Fernández, and R. Zacarias. 2006. Actinomycetoma and *Nocardia* sp. Report of five cases treated with imipenem or imipenem plus amikacin. *Gac. Med. Mex.* 142:247–252.
  11. Gonzalez-Suarez, M. L., M. C. Salinas-Carmona, and I. Pérez-Rivera. 2009. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 57:17–24.
  12. Hugonnet, J. E., L. W. Tremblay, H. I. Boshoff, C. E. Barry III, and J. S. Blanchard. 2009. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 323:1215–1218.
  13. Kandasamy, J., H. J. Iqbal, R. P. Cooke, and P. R. Eldridge. 2008. Primary *Nocardia farcinica* brain abscess with secondary meningitis and ventriculitis in an immunocompetent patient, successfully treated with moxifloxacin. *Acta Neurochir. (Wien)* 150:505–506.
  14. King, D. E., R. Malone, and S. H. Lilley. 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am. Fam. Physician* 61:2741–2748.
  15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. NCCLS document M24-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
  16. Pucci, M. J., J. Cheng, S. D. Podos, C. L. Thoma, J. A. Thanassi, D. D. Buechter, G. Mushtaq, G. A. Vigliotti, B. J. Bradbury, and M. S. Deshpande. 2007. In vitro and in vivo antibacterial activities of heteroaryl isothiazolones against resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1259–1267.
  17. Vera-Cabrera, L., W. M. Johnson, O. Welsh, F. L. Resendiz-Uresti, and M. C. Salinas-Carmona. 1999. Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona*, and *Rhodococcus*. *J. Clin. Microbiol.* 37:1971–1976.
  18. Vera-Cabrera, L., E. Gonzalez, S. H. Choi, and O. Welsh. 2004. In vitro activities of new antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:602–604.
  19. Vera-Cabrera, L., N. A. Espinoza-González, O. Welsh, J. Ocampo-Candiani, and J. Castro-Garza. 2009. Activity of novel oxazolidinones against *Nocardia brasiliensis* growing within THP-1 macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:1013–1017.
  20. Wang, Q., E. Lucien, A. Hashimoto, G. C. Pais, D. M. Nelson, Y. Song, J. A. Thanassi, C. W. Marlor, C. L. Thoma, J. Cheng, S. D. Podos, Y. Ou, M. Deshpande, M. J. Pucci, D. D. Buechter, B. J. Bradbury, and J. A. Wiles. 2007. Isothiazoloquinolones with enhanced antistaphylococcal activities against multidrug-resistant strains: effects of structural modifications at the 6-, 7-, and 8-positions. *J. Med. Chem.* 50:199–210.
  21. Welsh, O., L. Vera-Cabrera, and M. C. Salinas-Carmona. 2007. Mycetoma. *Clin. Dermatol.* 25:195–202.
  22. Yew, W. W., P. C. Wong, S. Y. Kwan, C. Y. Chan, and M. S. Li. 1991. Two cases of *Nocardia asteroides* sternotomy infection treated with ofloxacin and a review of other active antimicrobial agents. *J. Infect.* 23:297–302.



## In Vitro Activities of the New Antitubercular Agents PA-824 and BTZ043 against *Nocardia brasiliensis*

Lucio Vera-Cabrera,<sup>a</sup> Mayra Paola Campos-Rivera,<sup>a</sup> Norma Alejandra Gonzalez-Martinez,<sup>a</sup> Jorge Ocampo-Candiani,<sup>a</sup> and Stewart T. Cole<sup>b</sup>

Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Monterrey, N.L., Mexico,<sup>a</sup> and Global Health Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland<sup>b</sup>

The *in vitro* activity of PA-824 and BTZ043 against 30 *Nocardia brasiliensis* isolates was tested. The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for PA-824 were both >64 µg/ml. The same values for BTZ043 were 0.125 and 0.250 µg/ml. Given the MIC values for benzothiazinone (BTZ) compounds, we consider them good candidates to be tested *in vivo* against *N. brasiliensis*.

*Nocardia brasiliensis* is a natural inhabitant of the soil that in some cases gains entry to human skin by trauma with splinters or wood material contaminated with this bacterium (17). Once in the subcutaneous tissues, the bacteria proliferate, producing local inflammation, abscesses, and fistulae, and may affect subjacent organs, depending on the topographic localization of the lesions. The production of chronic inflammation and scarring of tissue makes it difficult for antimicrobials to penetrate and act against the bacteria. Several antimicrobials, including sulfonamides, aminoglycosides, beta-lactams, etc., have been used in the treatment of actinomycetoma (2, 5, 17). However, in some cases cure is not obtained, making it important to evaluate *in vitro* and *in vivo* the activity of new antimicrobials.

Given the close phylogenetic relationship among actinobacteria, it is possible that some antitubercular agents are active against nocardiae. Among the most recently developed antitubercular compounds, PA-824 [(S)-2-nitro-6-[4-(trifluoromethoxy)benzyloxy]-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine] has shown the best and most promising results (4, 12). *In vitro*, those compounds present MIC values for *Mycobacterium tuberculosis* isolates similar to those of isoniazid (MIC of PA-824, 0.015 to 0.25 µg/ml; MIC of isoniazid, 0.03 to 0.06 µg/ml) (12). PA-824 acts as a prodrug activated through a bioreduction process within the *M. tuberculosis* cell, and it is efficient against both latent and replicating *M. tuberculosis*. Transcriptional analysis has revealed a mixed potential mechanism of action that operates both by affecting cell wall synthesis and by chemical poisoning. The latter is achieved by increasing the intracellular amount of toxic nitric oxide (NO) (7, 10, 11). The development of *M. tuberculosis* mutants and its whole-genome resequencing showed the importance of a gene named *ddn* (*Rv3547*) in PA-824 resistance. This gene encodes a 151-amino-acid protein, a deazaflavin-dependent nitroreductase (Ddn); orthologous genes have been found in other actinobacteria (7).

1,3-Benzothiazin-4-one (benzothiazinone [BTZ]) compounds have been recently described that have excellent activity against actinobacteria, including *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* (6). They are particularly active against *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* and *in vivo*, with BTZ043 showing a MIC of 1 ng/ml for the control strain *M. tuberculosis* H37Rv. This value is far below that of other active drugs, including rifampin and isoniazid. The biochemical target, the decaprenyl-phosphoribose-2'-epimerase (encoded by gene *dprE1*), is commonly distributed among actinobacteria (6, 13).

In the present work, we analyze the susceptibility of 30 *N. brasiliensis* isolates from human mycetoma to these compounds by a broth microdilution method.

We studied 30 isolates from the collection of the Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (LIID) of the Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), including *N. brasiliensis* HUJEG-1 utilized previously in other *in vitro* and *in vivo* assays (1, 9, 15). All the isolates came from human cases of actinomycetoma and were identified as *N. brasiliensis* by biochemical methods and by nucleotide sequence analysis of a fragment of the 16S rRNA gene as described before (14).

PA-824 was kindly donated by the Global Alliance for TB Drug Development; BTZ043 was provided by one of the authors of the present study.

The broth microdilution method based on the CLSI M24-A2 document that we used has been described before (3). As external controls, we used *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. PA-824 was tested at concentrations of 64 to 0.25 µg/ml. In the case of BTZ043, the lowest concentration used was 0.0015 µg/ml. *M. tuberculosis* H37Rv was used also as a control.

The *dprE1* gene from *N. brasiliensis* was obtained by comparing the *dprE1* (locus *Rv3790*) gene sequence of *M. tuberculosis* H37Rv to the entire genome sequence of *N. brasiliensis* HUJEG-1 obtained by our group (16) by using the BLAST program available at the NCBI Internet site. To establish the presence of a putative *ddn* (*Rv3547*) ortholog in *N. brasiliensis*, we utilized the *M. tuberculosis* H37Rv nucleotide sequence published in GenBank and compared it to the complete chromosomal sequence of *N. brasiliensis* HUJEG-1 by the use of the BLAST program.

The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of PA-824 for the *N. brasiliensis* isolates were >64 µg/ml in both cases. *N. carneae* ATCC 6847 and *N. transvalensis* ATCC 6865 showed the same MIC value. As a resistant control, we tested *M. smegmatis* LR222, for which the

Received 17 January 2012. Returned for modification 16 March 2012.

Accepted 14 April 2012.

Published ahead of print 23 April 2012.

Address correspondence to Lucio Vera-Cabrera, luvera\_99@yahoo.com.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00115-12

