

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS
DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS
A SUBCULTIVO.

Por

M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en
Microbiología

SEPTIEMBRE DEL 2007

TD
Z5320
FCB
2007
.M64

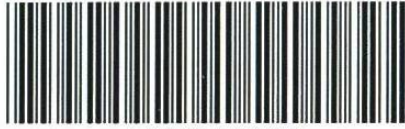
ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEBPAs

DIE

Mycobacterium tuberculosis SOBRETIDAS

A SUBCULTIVO.

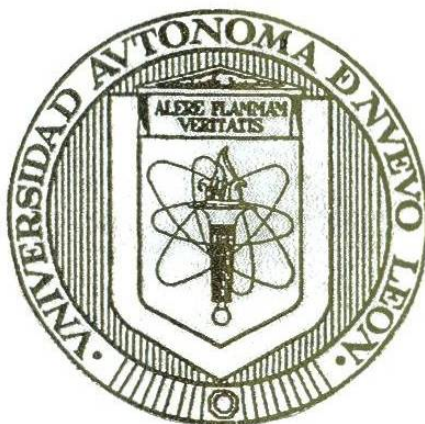
CM.



1020160697

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Por:

M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología

Septiembre de 2007



FONDO
TESIS

170908

TD

Z5320

FCB

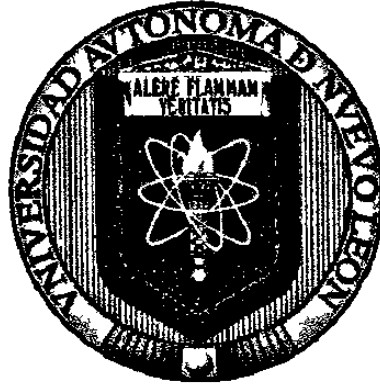
2007

.M64

- Septiembre - 08
Desarrollo de la Crea.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Por:

M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología

Septiembre de 2007

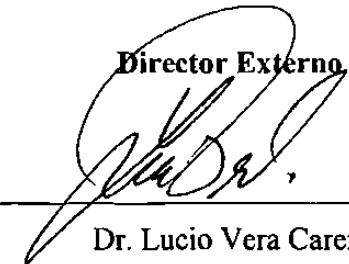
ANALISIS GENETICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Presentado por:

M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social y en la Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne del Institut Pasteur en Paris, Francia bajo la dirección externa del Dr. Lucio Vera Cabrera, la dirección interna de la Dra. Licet Villarreal Treviño y la Co-dirección del Dr. Jorge Castro Garza

Director Externo




Dr. Lucio Vera Carera

Director Interno



Dra. Licet Villarreal Treviño

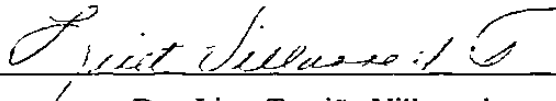
Co-Director



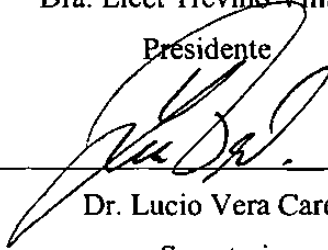
Dr. Jorge Castro Garza

ANALISIS GENETICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Comité de Tesis



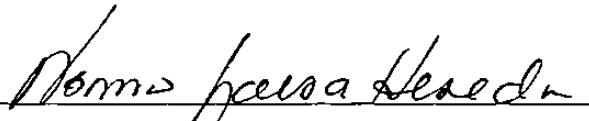
Dra. Licet Treviño Villarreal
Presidente



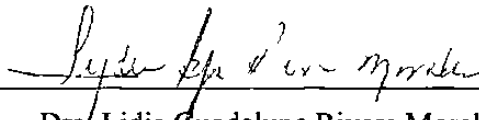
Dr. Lucio Vera Carera
Secretario



Dr. Jorge Castro Garza
Primer vocal



Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Segundo vocal



Dra. Lidia Guadalupe Rivera Morales
Tercer vocal

ANALISIS GENETICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Comité Académico de Doctorado

Dra. Diana Reséndez Pérez
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Principalmente a mi Director de tesis, Dr. Lucio Vera por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, por confiar en mí para participar en los distintos proyectos de investigación e impulsarme a crecer profesionalmente.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño por haber colaborado en la dirección de esta tesis y por estar siempre al pendiente y con disposición para el seguimiento adecuado de este trabajo.

Al Dr. Jorge Castro quien figuró como colaborador importante de este trabajo, por los valiosos conocimientos compartidos y por su paciencia y minuciosidad en la revisión de esta tesis.

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

A los miembros del Comité Tutorial, al Dr. José Santos Alvarado García y la Dra. Myriam Elías Santos por sus valiosas críticas al discutir los resultados cada semestre.

Al personal del Laboratorio de Dermatología del Hospital Universitario José E. González por haberme permitido utilizar su espacio de trabajo y por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el Laboratorio y especialmente a la Q.F.B. Wendy Escalante Fuentes.

A los compañeros y amigos de los diferentes laboratorios que formaron parte importante en mi estancia, a Pilar Carranza por su apoyo y confianza, a Charly Salinas y Hugo Barrios por colaborar con la preparación de las células, a Selene Nájera, Efrén Jaramillo, Ezequiel Viveros, Víctor Moreno y Víctor Velázquez. Fue una suerte conocerlos.

A los amigos que de una u otra forma me acompañaron en esta aventura: Elsa Ochoa, Teresa Pérez-Gavilán, Tania Medellín, Melba Torres, Raul Sandoval, Ofelia Sánchez, Pablo Armijo, Melissa Martínez, Ruben Domínguez, Abraham Montes, Diana Castillo, Marcos Guerrero, Norma Cordero y Anaelena de la Cruz.

A mi padre y mis hermanos por el apoyo moral y el cariño que siempre me han brindado, pero principalmente por ser mis amigos.

Y sobretodo, a Brandon por su apoyo y amor. Tu presencia es igual a una canción.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT.	1
2. INTRODUCCION.	3
2.1. Tuberculosis	3
2.2. Taxonomía.	3
2.3. Descripción del género.	4
2.4. Significado clínico de la infección con el complejo <i>M. tuberculosis</i>	5
2.5. Epidemiología global de la Tuberculosis.	6
2.6. Tuberculosis y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).	7
2.7. Situación en México.	8
3. HIPOTESIS.	10
4. OBJETIVOS.	11
4.1. Objetivo principal.	11
4.2. Objetivos específicos.	11
5. ANTECEDENTES	12
6. MATERIAL Y METODOS.	20
6.1. Selección de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> provenientes de aislamientos clínicos con delección del locus PLC.	20
6.1.1. Cultivo y preparación del stock.	21
6.1.2. Determinación de la cuenta bacteriana de los stocks.	22
6.1.3. Extracción del ADN	22
6.2. Análisis de la región cercana al locus PLC.23	
6.2.1. Ensayo de PCR.	24
6.2.2. Determinación de la extensión de las delecciones en el locus PLC.	25

6.2.3. Ensayo de PCR larga.	26
6.3. Ensayo de microarreglos para determinar ausencia de Genes en los asilamientos con respecto a la cepa H37Rv.	27
6.3.1. Método para el marcaje de ADN con Cy3 y Cy5.	27
6.3.2. Protocolo de hibridación estándar.	27
6.4. Genotipificación de ADN basada en IS6110.	29
6.4.1. Digestión del ADN con PvuII.	29
6.4.2. Separación de los fragmentos de ADN por electroforesis.	30
6.4.3 Southern Blotting	30
6.4.4. Adhesión del ADN a la membrana por enlaces covalentes.	31
6.4.5. Preparación de la sonda por PCR.	31
6.4.6. Marcaje de la sonda.	31
6.4.7. Hibridación y detección.	32
6.5. Spoligotyping.	33
6.6. Ensayos de citotoxicidad.	33
6.6.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular THP-1.	34
6.6.2. Transformación de la línea celular THP-1.	34
6.6.3. Determinación de la capacidad citotóxica de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	35
6.6.4. Cuantificación de la citotoxicidad por el Método del cristal violeta.	36
6.7. Subcultivo de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	36
6.7.1. Determinación de la concentración ideal de bilis para el subcultivo.	36
6.7.2. Determinación del tiempo idóneo para el subcultivo de las cepas. Curvas de crecimiento.	37
6.7.3. Obtención de clones de las cepas.	38
6.7.4. Subcultivo de las cepas clonadas.	38
6.8. Determinación de los cambios genéticos y/o de virulencia de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> subcultivadas.	40
6.8.1. Verificación por PCR de las deleciones reportadas en el ensayo de microarreglos.	40
6.8.2. Ensayo de PCR.	40
7. RESULTADOS.	43
7.1. Análisis de la región cercana al locus PLC.	43
7.2. Caracterización genética de la deleción del locus PLC.	45
7.3. Análisis de microarreglos en las cepas parentales.	47
7.4. Subcultivo de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	52
7.4.1. Determinación de la concentración ideal de bilis para el subcultivo.	52
7.4.2. Determinación del tiempo idóneo para el subcultivo de las cepas.	53
7.4.3. Estado del subcultivo.	55
7.5. Genotipificación de ADN basada en IS6110.	56
7.6. Spoligotyping.	57

7.7. Ensayo de citotoxicidad sobre la monocapa de macrófagos THP-1.	59
7.8. Análisis de microarreglos en el pase 100	62
7.8.1. Verificación por PCR de las deleciones reportadas en el ensayo de microarreglos.	66
7.9. Determinación de la cuenta bacteriana de los cultivos	67
8. DISCUSION	69
8.1. Análisis de la región cercana al locus PLC	70
8.2. Ensayo de microarreglos.	73
8.3. RFLP y Spoligotyping.	75
8.4. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos.	78
9. CONCLUSIONES.	82
10. PERSPECTIVAS.	83
11. LITERATURA CITADA.	84

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> utilizados en este trabajo.	21
2. Oligonucleótidos utilizados para analizar la región cercana al locus PLC.	24
3. Iniciadores para los genes adyacentes al locus PLC.	26
4. Oligonucleótidos utilizados para verificar las deleciones reportadas en el análisis de microarreglos de las cepas subcultivadas.	41
5. Amplificación de los genes más cercanos al locus de PLC	44
6. Genes ausentes de los aislamientos parentales de <i>M. tuberculosis</i> , aparte de la región PLC.	49
7. Crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> RIVM 97-0488 y H37Rv en distintos medios de cultivo.	52
8. Lectura de la absorbancia a 600 nm de los cultivos de <i>M. tuberculosis</i>	54
9. Estado del pasaje serial	56
10. Genes ausentes en los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> parentales y los sometidos a pasaje serial.	63
11. Amplificación de los genes discordantes en el ensayo de microarreglos de las cepas parentales y las subcultivadas.	66
12. Cuentas bacteriana en UFC/ml de las cepas en estudio.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tinción de Ziehl-Neelsen de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . 100x	4
2. Casos reportados y muertes estimadas por tuberculosis en México, 1995-2005.	9
3. Región del locus PLC y genes contiguos.	25
4. Macrófagos derivados de la línea celular THP-1.	35
5. Condiciones de cultivo de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> para el pasaje serial.	39
6. Representación esquemática de la localización del locus PLC en la cepa H37Rv.	43
7. PCR para la búsqueda de los genes más conservados adyacentes al locus PLC.	45
8. Región de PLC de las cepas <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y CDC1551 y cambios genéticos en las cepas Δ PLC usadas en este estudio.	47
9. Curvas de crecimiento de las diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> utilizadas en este estudio.	55
10. Análisis de RFLP para el elemento IS6110 de las cepas parentales y las subcultivadas.	57
11. Patrones de Spoligotyping de las cepas parentales y las subcultivadas.	59
12. Fotografía de una microplaca con macrófagos infectados con dos diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> a los 7 días de incubación.	60

13. Ensayo de citotoxicidad sobre una
monocapa de macrófagos THP-1. 61

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxiribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
°C	Grados Celsius
g	Gramos
g	Unidades de fuerza centrifuga relativa
h	Hora
Kb	Kilobases
M	Concentración molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Concentración milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ng	Nanogramos
nM	Concentración nanomolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonia
v	Volts