

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**"DISTRIBUCION DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia*
brasiliensis EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS
PATOGENOS"**

Por

Q.B.P. FRANCISCO LEOBARDO RESENDIZ URESTI

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Médica

Noviembre, 2001

FRANCIS

4382

O.B.P. FRANCISCO LEONARDO RESTI URESTI



1080113106

Q R 82
135
R4
c.1

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



INVESTIGACION DEL FRAGMENTO *Agar de Nutrientes*
incubado EN ESPECIES DE ACTIVACIONES
PATOGENAS

Por

DR. FRANCISCO LEONARDO BETTENDIZ URRUTIA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Médica

Noviembre, 2001

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



" DISTRIBUCION DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia brasiliensis* EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS "

Por

Q.B.P. FRANCISCO LEOBARDO RESÉNDIZ URESTI

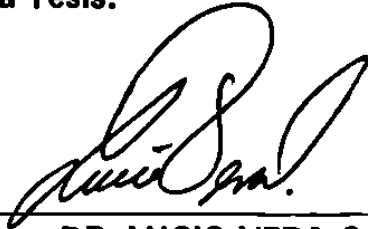
Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Médica

Noviembre, 2001



DISTRIBUCION DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia brasiliensis* EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS PATOGENOS

Aprobación de la Tesis:



DR. LUCIO VERA CABRERA
Presidente y Director de Tesis



DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ
Secretario



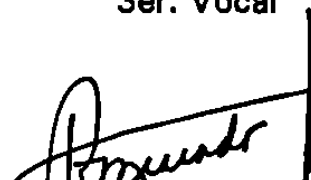
DR. OLIVERIO WELSH LOZANO
1er. Vocal y Co-Director de Tesis



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
2do. Vocal y Co-Director de Tesis



M.C. GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (LIID), perteneciente al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González", bajo la asesoría del Dr. Lucio Vera Cabrera y la co-asesoría del Dr. Oliverio Welsh Lozano y del Dr. Mario César Salinas Carmona.

DEDICATORIA

Este trabajo que me ha costado tanto sacrificio terminarlo va dedicado especialmente para la persona que ha compartido tantos años de mi vida pasando alegrías, tristezas, problemas, logros, etc, pero que a pesar de todo hemos seguido adelante. Para mi esposa, Angelica María. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por sus enseñanzas y así como por sus consejos para salir adelante en la Maestría.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología, Julio, Perla, Agustina, Lupita y Conchis por su amistad.

A los profesores de los demás Departamentos por su esmero en transmitir sus conocimientos.

Al Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla (†) por aceptarme en el Depto. de Microbiología así como por su carismática manera de transmitir su sabiduría.

Al Dr. Lucio Vera Cabrera por su enorme paciencia y por sus sabios consejos para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Oliverio Welsh Lozano por permitirme laborar en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, perteneciente al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González".

A la Comisión de Tesis por su interminable y laboriosa tarea de revisión del escrito para mejorar su contenido.

A Adriana Pizaña, Wendy Escalante, Concepción Melgoza y Lucio Vera por su amistad incondicional y por haberme soportado por tantos años.

A mis padres, que siempre me han brindado apoyo para continuar mis estudios a pesar de las adversidades.

A mis hermanos Aurora, José Antonio, Mario Felipe, María del Pilar y San Juana por toda una vida de compartir triunfos y fracasos .

Al CONACYT, por haberme apoyado económicamente para la realización de esta tesis.

A Dios, gracias...

RESUMEN

Francisco Leobardo Reséndiz Uresti
 Universidad Autónoma de Nuevo León
 Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Noviembre del 2001

Título de Tesis: **DISTRIBUCIÓN DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia brasiliensis* EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS.**

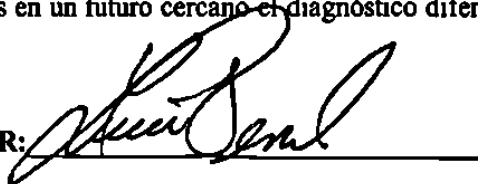
Número de páginas: **85**

Area de Estudio: **Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica.**
Microbiología Médica.

Propósito y Método de Estudio. El micetoma es una enfermedad subcutánea crónica, localizada, y de progresión lenta. Esta enfermedad puede ser causada por bacterias (actinomicetoma) u hongos (micetoma eumicético o eumicetoma). Los microorganismos reportados que causan actinomicetomas incluyen a *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y con menor frecuencia *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis* y *Nocardioopsis dassonvillei*. En Norteamérica, Sudamérica, Australia y en nuestro país, *Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal de actinomicetoma. En estudios previos, se observó que los pacientes con actinomicetoma producido por *Nocardia brasiliensis* reaccionaban con algunas proteínas de un extracto crudo de *N. brasiliensis* en un ensayo de Western blot. El suero de estos pacientes reaccionó mas intensa y específicamente con tres bandas de pesos moleculares aproximados de 24-, 26- y 61-kDa. De estas proteínas la P24 y P61 se aislaron y purificaron con métodos fisicoquímicos convencionales. De la proteína P61, se ha determinado la secuencia aminoacídica N-terminal (Sec. aminoacídica 1) y dos secuencias internas obtenidas por ruptura de la proteína mediante bromuro de cianógeno (Sec. aminoacídicas 2 y 3). Al comparar las secuencias aminoacídicas con la base de datos para proteínas del GenBank, mediante el sistema BLAST, se observó homología con catalasas de eucariotes y otros actinomicetos. Se realizó un análisis por alineamiento de las secuencias nucleotídicas de varios genes que codificaban para catalasas y se observaron varias secuencias consenso, una de ellas dentro de la secuencia aminoacídica No. 2 (FDLTKV). En base a esta secuencia y a otra secuencia consenso que se encontraba hacia el extremo 5' (VGNNTN) se prepararon oligonucleótidos degenerados denominados NB2 y NB3, respectivamente. Mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), y utilizando estos oligonucleótidos como iniciadores, se obtuvo un fragmento de 450-pb. En el presente trabajo de tesis, se examinó mediante PCR y Southern blot, 19 cepas de *Nocardia brasiliensis* pertenecientes al cepario del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, así como también cepas tipo de los géneros *Actinomadura* sp., *Gordona* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp. y *Tsukamurella* sp. para determinar la presencia de secuencias similares a la de *N. brasiliensis*.

Contribuciones y Conclusiones. Con los resultados obtenidos de PCR y Southern blot se contribuyó en la diferenciación de algunas especies pertenecientes al grupo de los Actinomicetos en base a la presencia o ausencia del fragmento *katN*. Con este estudio además se concluyó que existe polimorfismo entre las especies que son positivas para la presencia de este fragmento. La técnica de PCR, aunada al Southern blot, podría permitirnos en un futuro cercano el diagnóstico diferencial de los microorganismos causantes de micetoma.

FIRMA DEL ASESOR:



ABREVIATURAS

A	Adenina
bd	Bidestilada
°C	Grados centígrados
C	Citosina
CTAB	Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio
DAP	Acido 2,6-diaminopimélico
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleótido
EDTA	Acido Etilendiamino Tetraacético
fg	Fentogramo
g	Gramo
G	Guanina
HCl	Acido clorhídrico
h	Hora
HUJEG	Hospital Universitario "José Eleuterio González"
kDa	Kilodalton
kpb	kilopares de bases
LIID	Lab. Interdisciplinario de Investigación Dermatológica
LMP	Low Melting Point (bajo punto de fusión)
LUV	Luz Ultravioleta
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
µg	Microgramo
µL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro

mM	Milimolar
M	Molar
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
pg	Picogramo
RNA _r	Acido ribonucleico ribosomal
RNA'sa	Ribonucleasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S	Coefficiente de Sedimentación
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
SSC	Solución Salina- Citrato
SDS	Sulfato Duodecil de Sodio
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (Hidroximetil aminometano)
U	Unidad
v	Volts

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características Generales	1
1.2 Taxonomía	4
1.3 Clasificación	5
1.4 Identificación	6
1.5 Aspectos Epidemiológicos	8
1.6 Infección Cutánea	9
1.7 Antecedentes inmediatos	11
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo General	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. MATERIAL Y METODOS	16
3.1 Estrategia general	16
3.2 Microorganismos y condiciones de cultivo	18
3.3 Extracción del DNA con Bromuro de Cetil-Trimetil de Amonio (CTAB)	20

Capítulo	Página
3.4 Determinación de Pureza del DNA por Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5 %.	22
3.5 Cuantificación del DNA	23
3.5.1 Método Espectrofotométrico	23
3.5.2 Por estándares de concentración	24
3.6 Determinación del fragmento NB10-NB11 por PCR de muestras de DNA de actinomicetos	25
3.7 Ensayos de Southern blot	26
3.8 Obtención del Amplicón NB10-NB11	29
3.9 Purificación del Amplicón NB10-NB11	30
3.10 Marcaje del Amplicón NB10-NB11	33
3.11 Hibridización	34
3.12 Lavado y detección	35
3.13 Límite de detección del método de PCR para fragmento NB10-NB11 de <i>Nocardia brasiliensis</i>	36
3.13.1 A partir de diluciones de DNA	36
3.13.2 A partir de diluciones celulares	38
4. RESULTADOS	41
4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	41
4.2 Extracción del DNA con CTAB	41
4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores NB10-NB11	43

Capítulo**Página**

4.4 Digestión Enzimática del DNA	48
4.5 Secuenciación del fragmento NB10-NB11	53
4.6 Límite de Detección del método de PCR	58
4.6.1. Límite de detección con diluciones de células	58
4.6.2. Límite de detección con diluciones de DNA	59
5. DISCUSION	61
6. CONCLUSIONES	70
7. LITERATURA CITADA	71

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
1. Cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> de la colección del LIID (Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica) utilizadas en el presente estudio.	18
2. Especies de Actinomicetos utilizados en el presente estudio.	19
3. Mezcla utilizada en el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
4. Resultados de los ensayos de PCR con DNA genómico de especies de <i>Nocardia</i> utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.	46
5. Resultados de los ensayos de PCR con DNA genómico de otros géneros de Actinomicetos utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.	47
6. Resultados de Southern blot utilizando la sonda NB10-NB11 y de PCR con iniciadores NB10-NB11 de especies de actinomicetos.	52

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1.	Diagrama de la posible localización de las secuencias aminoacídicas internas y N-terminal del gen <i>katN</i> de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	13
2.	Estrategia general utilizada para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo.	17
3.	Sistema de transferencia Turboblotter para el paso del DNA del gel de Agarosa a un filtro de Nylon.	28
4.	Obtención y purificación del amplicón NB10-NB11 a partir de DNA genómico de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	32
5.	Sistema de marcaje de la sonda NB10-NB11 con peroxidasa.	34
6.	Límite de sensibilidad del método de PCR utilizado para la detección del fragmento NB10-NB11 a partir de diluciones de células y diluciones de DNA.	40
7.	Cuantificación de DNA de especies de actinomicetos mediante el uso de estándares de concentración.	42
8.	PCR de DNA genómico de cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> con iniciadores NB10-NB11.	43
9.	PCR de DNA genómico de actinomicetos con iniciadores NB10 y NB11.	45

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
10. Digestión enzimática de DNA genómico de <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1 con enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI.	48
11. Cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> digeridas con la enzima de restricción <i>Bam</i> HI.	49
12. Southern blot de DNA de actinomicetos digeridos con la enzima <i>Bam</i> HI y utilizando la sonda NB10-NB11.	50
13. Southern blot de DNA de actinomicetos digeridos con la enzima <i>Bam</i> HI y utilizando la sonda NB10-NB11.	51
14. Secuencias nucleotídicas del fragmento NB10-NB11 de actinomicetos positivos al PCR.	54
15. Secuencias aminoacídicas codificadas por el fragmento NB10-NB11 de actinomicetos positivos al PCR.	56
16. PCR de diluciones de células de <i>Nocardia brasiliensis</i> utilizando los iniciadores NB10-NB11.	58
17. PCR de diluciones de DNA de <i>Nocardia brasiliensis</i> utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.	59