

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
✓ DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

✓ TUBERCULOSIS CUTANEA:
LA BIOLOGIA MOLECULAR EN
LA ETIOLOGIA DE LAS TUBERCULIDES

T E S I S

✓ QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

✓ Q.B.P. MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

DIRECTOR: DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO.

ASESORES:
DR. RUBEN DARIO MARTINEZ PEREZ.
DR. VIANEY F. ORTIZ NAVARRETE.

MEXICO, D.F.

✓ JULIO DE 1998

La **Maestría en Biología Experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana, cuenta con apoyo del **CONACYT**, No. de registro 309-0, por considerársele un posgrado con nivel de excelencia.

Mi reconocimiento al **CONACYT** por el apoyo económico brindado durante la realización de la maestría, a través de la beca con número de registro 110562.

El presente trabajo de investigación se realizó en:

La Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional, Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

El trabajo se llevó al cabo con la colaboración del **Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua.**

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por brindarme la oportunidad de iniciar el camino de la Investigación y por la confianza que siempre ha depositado en mí. Por su acertada dirección en este trabajo y sus valiosos consejos.

Al Dr. Rubén Dario Martínez, por el tiempo dedicado a este trabajo, por todas sus sugerencias y acertados comentarios.

Al Dr. Vianey F. Ortiz Navarrete, por su apoyo en la realización de este trabajo y su asesoría académica.

Al Dr. Cesar R. González Bonilla, por sus valiosas observaciones y consejos en el desarrollo de este trabajo.

Al personal del Centro Dermatológico Pascua, que de una u otra forma hizo posible la realización de este trabajo, especialmente al **Dr. Alberto Ramos Garibay** y al **Dr. Fermín Jurado Santa Cruz**, quienes con sus conocimientos e inquietudes nos hicieron ingresar al campo de la Dermatología.

A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, por sus sugerencias y ayuda incondicional.

A mi compañero y amigo **Manuel Carrera Camargo**, por su amistad, su constante apoyo y acertados consejos.

A mis compañeras y amigas **Q. Ma. del Pilar Villar Aguirre** y **Q.F.B. Josefa Vargas**, por su admirable entusiasmo, sus valiosos consejos y el apoyo incondicional de siempre.

A mi Madre, la **Sra. Virginia Bernal Montesclaro**, por su valioso ejemplo en la vida y su gran confianza en mí. Por su constante apoyo e inigualable amor.

A mis hermanos: **José, Virginia, Marcos, Manuel, Héctor e Ivonne**. Por el apoyo incondicional que siempre he recibido, por su nobleza y sobre todo, por su gran cariño.

A mi esposo **Carlos Alberto Méndez G.** y a mis hijos **Karla, Gaby y Carlitos**, por el tiempo que no he podido brindarles y las ocasiones especiales que no he podido estar con ellos. Por su apoyo en todos los momentos difíciles y su manifiesta alegría con los logros obtenidos.

Gracias por toda su ayuda, comprensión y cariño.

Especialmente a la **Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz** por su valioso apoyo, confianza y consejos para la realización de esta Maestría.

Al **Comité de la Maestría** de la UAM Iztapalapa por su tiempo y entrega a este Posgrado.

A mis **compañeros y amigos** de la Maestría en Biología Experimental, Generación 96', por todos los buenos y malos momentos que pasamos juntos.

I N D I C E

	Página
I. Resumen.....	1
II. Antecedentes	2
1. Introducción.....	2
2. Epidemiología.....	2
3. Mecanismo de infección	4
4. Clasificación y características generales de la tuberculosis cutánea	5
5. Características. Formas Fijas	7
6. Características. Formas Diseminadas	8
7. Tipos de tuberculosis cutánea en el Centro Dermatológico Pascua	11
8. Diagnóstico clínico	12
8.1 Baciloscopia	13
8.2 Histopatología	13
8.3 Intradermoreacción	15
8.4 Estudio completo del paciente	15
8.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
III. Planteamiento del problema	17
IV. Hipótesis	18
V. Objetivos	18
VI. Material, pacientes y metodología	18
1. Material	18
2. Pacientes y muestras	18
3. Metodología	19
3.1 Preparación de las muestras de biopsia y extracción del DNA	23
3.2 Sistema de PCR múltiple	23
3.3 Análisis de los productos PCR	24

3.4 PCR anidada	25
3.5 Doble PCR y análisis del gen de la β -actina	25
VII. Diagrama de flujo	26
VIII. Resultados	27
1. Amplificación de tres genes de <i>M. tuberculosis</i> . Sistema de PCR	
Múltiple	27
2. Sensibilidad de la PCR múltiple y de la PCR anidada	28
3. Detección del DNA del género <i>Mycobacterium</i> , del Complejo	
<i>M.tuberculosis</i> y de <i>M. tuberculosis</i> en las muestras de piel	29
4. Detección especie-específica de <i>M. tuberculosis</i> mediante PCR	
Anidada	33
5. Doble PCR múltiple	38
6. Detección del gen de la β -actina	39
7. Análisis estadístico	40
IX. Discusión	41
X. Conclusiones	44
X I. Bibliografía	46
Apéndice 1. Material	51
Apéndice 2. Extracción del DNA de tejido embebido en parafina	52

I. RESUMEN.

La tuberculosis cutánea se considera en general de reinfección y se presenta como lesiones que muestran variabilidad morfológica considerable, por lo que es especialmente difícil distinguirla de otros procesos granulomatosos de la piel. Incluye dos grupos: las formas fijas o habitadas y las formas diseminadas o **“tuberculides”**. El segundo grupo ha sido motivo de controversia debido a que el *Mycobacterium tuberculosis* no puede aislarse y cultivarse de las lesiones producidas. Algunos autores consideran que dichas lesiones corresponden a la reacción del organismo hipersensibilizado al bacilo de la tuberculosis, presente en algún foco pulmonar o ganglionar, sin embargo otros autores proponen que los bacilos son responsables de la lesión y deben encontrarse en ella, por lo que con este trabajo se pretende determinar si en las formas de tuberculosis cutánea diseminada o **“tuberculides”**, se encuentra el *M. tuberculosis*.

Se seleccionaron al azar 30 biopsias de piel embebidas en parafina, de pacientes con diagnóstico clínicopatológico de tuberculosis cutánea (18 con **“tuberculides”** y 12 con tuberculosis fija). Se aisló el DNA de éstas y se aplicó por primera vez un sistema múltiple de PCR para investigar la posible presencia de cualquier micobacteria, mediante la amplificación simultánea de tres fragmentos genómicos del DNA bacteriano. Así también, para incrementar la sensibilidad y especificidad del sistema, se utilizó una PCR anidada especie-específica (Nested-PCR) para *M. tuberculosis*. De forma similar se trataron 4 biopsias de piel normal como control.

Se identificó *M. tuberculosis* en 24 de las 30 muestras sometidas a PCR anidada (80 % de positividad). De éstas 16 de 18 correspondieron a **“tuberculides”** y 8 de 12 a tuberculosis cutánea fija. En las biopsias de piel normal no se encontró DNA micobacteriano. No hubo resultados falsos negativos o falsos positivos en los controles del sistema.

Con este estudio se demostró que en los casos de tuberculosis cutánea diseminada, el *M. tuberculosis* está íntimamente relacionado con las lesiones producidas en la piel y puede detectarse eficientemente por PCR anidada, por lo que no deben denominarse **“tuberculides”**.

II. ANTECEDENTES

1. Introducción.

La piel, como cualquier otro órgano del cuerpo, puede ser afectada por el bacilo de la tuberculosis, produciendo lesiones de gran polimorfismo que dan origen a las diversas formas clínicas semejando cuadros dermatológicos de diferente etiología, lo que depende de la vía de inoculación, la virulencia del *Mycobacterium tuberculosis*, y sobre todo, del estado inmunológico del hospedero^{1, 2}. Sin embargo, se considera que la piel es un órgano poco receptivo para el bacilo de la tuberculosis y que al invadirla sufre una atenuación espontánea, como parece indicarlo el que las manifestaciones cutáneas son menos frecuentes que las que se observan en otros órganos, son crónicas y con bacilos escasos, como si la piel no tuviera las condiciones adecuadas para su desarrollo².

2. Epidemiología.

Actualmente la tuberculosis representa un serio problema a nivel mundial. Se estima que una tercera parte de la población mundial, (1.7 billones de personas), está infectada con *M. tuberculosis*. Aún cuando menos del 10 % de las infectadas desarrollan tuberculosis durante su vida, es la responsable de 3 millones de muertes³. En México se diagnostican aproximadamente 20 000 casos nuevos por año, 85 % de tipo pulmonar y es la causa de alrededor de 6 000 defunciones⁴.

En los países desarrollados, la frecuencia tanto de la tuberculosis pulmonar, como la de las formas extrapulmonares, incluidas las dermatológicas, habían disminuido considerablemente. Esta baja se atribuía a la vacunación con BCG, a la existencia de una terapéutica antifímica eficaz y sobre todo al mejoramiento de las condiciones de vida, tanto higiénicas como de alimentación. Sin embargo, en los últimos años y en todos los países, se ha encontrado una frecuencia cada vez mayor de casos de tuberculosis, tanto pulmonares como extrapulmonares^{1,2,5,6}.

Hay varios factores que contribuyen a esta tendencia. El factor más importante es el número creciente de individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), cuya inmunosupresión puede conducir a la reactivación de una tuberculosis antigua y a que se favorecen nuevas infecciones con *M.tuberculosis*^{1,2,7}. Además, los individuos infectados con el VIH, presentan cuadros clínicos atípicos, conduciendo a un retraso en el diagnóstico e infectividad prolongada. Otro factor que contribuye al resurgimiento de la tuberculosis es la aparición de las cepas de *M.tuberculosis* multidrogoresistentes⁷.

El 3 % de los individuos infectados con el VIH presentan lesiones fímicas en la piel y los tejidos blandos, lo cual es importante reconocer, por la frecuencia de formas atípicas y diseminadas de tuberculosis extracutánea en estos pacientes².

En México los cuadros dermatológicos de origen fímico, son relativamente frecuentes, como se revela en los estudios presentados por algunos autores^{2,8-10}. Las estadísticas Mexicanas muestran cifras que van del 1 al 3 % de tuberculosis cutánea por cada 114 pacientes que asisten con problemas de piel y cerca del 20 % de éstos son menores de 15 años de edad¹¹, habiendo mayor incidencia en el sexo femenino. Entre 1985 y 1995, en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, se registraron 178 casos de tuberculosis cutánea (0.91 %), de 19 664 biopsias practicadas. La mayor incidencia fue de 11 a 40 años de edad, el mayor porcentaje en la segunda década de la vida (24.7%) y la proporción mujer-hombre fue de 2:1 (122:56), datos que pueden observarse en la **Tabla I.** (Manuscrito en preparación).

**Tabla I. Número de casos por año, edad y sexo, de Tuberculosis Cutánea
en el Centro Dermatológico Pascua.**

1985 a 1995

Edad Año	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	>60	Total	Feme- nino.	Mas- culino.	Total	No. de Biopsias
85		4	3		1	1	2	11	6	5	11	1 212
86		5	2		2	1	1	11	7	4	11	1 244
87		4	1			2	1	8	7	1	8	1 154
88		4	3	5	1	3	1	17	12	5	17	1 268
89	1	4	2	3	2	1	3	16	12	4	16	1 725
90	1	2	3	1		2		9	8	1	9	1 651
91	1	4	4	2	3	1		15	10	5	15	1 772
92	2	5	3	5	3	2		20	14	6	20	2 033
93	6	2	3	6	3	1	3	24	11	13	24	2 038
94	2	8	9	7	7	2	2	37	25	12	37	2 935
95		2		3	2	3		10	10		10	2 632
Total	13	44	33	32	24	19	13	178	122	56	178	19 664
%	7.3	24.7	18.5	17.9	13.4	10.6	7.3	100	69	31	100	

3. Mecanismos de infección.

Los mecanismos de infección de la tuberculosis cutánea pueden ser por vía endógena o exógena:

A. Endógena.

Cuando proviene de focos primitivos extracutáneos preexistentes que invaden la piel por contigüidad (lesiones óseas o articulares) o por vía hematógena, por descargas de bacilos o de sus productos antigénicos.

B. Exógena.

Mecanismo más frecuente en los primeros años de vida. La primoinfección cutánea es rara, no así las reinfecciones o sobreinfecciones por inoculación directa del bacilo a la piel, a través de productos contaminados, los cuales pueden tener dos orígenes:

B.1. Del propio enfermo (infección autógena), cuando éste sufre una tuberculosis extracutánea, en la que los productos de ésta, tales como esputo, secreciones nasales o vaginales, orina y pus pueden contaminar el tegumento cercano a los orificios naturales y dar lugar a la infección.

B.2. De fuentes ajenas al paciente (infección heterógena), a través de productos de otros enfermos o bien por productos animales contaminados, tales como: leche, carne, cueros, etc. de reses tuberculosas (*M.bovis*), cuya penetración se facilita por heridas, ya sean quirúrgicas o traumáticas.

En general, se acepta que el estado inmunológico es el factor más importante y que la cualidad de la respuesta inmunológica a los antígenos tuberculosos es la que determina la existencia y el tipo de tuberculosis que desarrolla un individuo. En relación a las formas cutáneas, se considera que éstas se presentan en sujetos con un alto grado de hipersensibilidad retardada².

4. Clasificación.

El gran polimorfismo de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis cutánea ha planteado la necesidad de clasificarla adecuadamente. Se han propuesto varias clasificaciones, sin embargo a partir de Darier, la forma en que se han agrupado los diversos cuadros clínicos, independientemente de la nomenclatura empleada, es esencialmente la misma, distinguiéndose dos tipos de tuberculosis cutánea: las formas fijas y las diseminadas².

A las formas fijas también se les han llamado tuberculosis localizadas, típicas, habitadas y verdaderas, éstas resultan de la colonización y reproducción local de *M.tuberculosis* en individuos vírgenes a la infección o previamente infectados y con reactividad normal al bacilo o a sus productos antigénicos. A este grupo pertenecen la tuberculosis colicuativa (escrofuloderma), la luposa (lupus vulgar), la verrugosa y la ulcerosa. En ellas la respuesta al PPD es normérgica^{2,11}.

Las formas diseminadas también se denominan “**tuberculides**”, hiperérgicas, hematógenas, recidivantes y no habitadas. Se considera por algunos autores que son lesiones debidas a la respuesta hiperérgica del individuo al bacilo, mas que por la acción directa de éste¹¹⁻¹⁴. En ellas no es posible encontrar bacilos en las lesiones, pero la respuesta a sus antígenos es muy intensa, se cree que la reacción de hipersensibilidad es provocada por el bacilo de la tuberculosis, presente en algún foco pulmonar, ganglionar u en otro sitio. Dichas formas evolucionan por brotes recidivantes, son hematógenas y por lo mismo bilaterales. En este grupo se encuentran la tuberculosis nodular profunda, o eritema indurado de Bazin, la nódulo necrótica y las micronodulares, en todas ellas la respuesta al PPD es hiperérgica^{11,15}. Las características generales de las formas fijas y diseminadas pueden observarse en la **Tabla II** y en las **Figuras I y II**.

Tabla II. Características Generales de la Tuberculosis Cutánea^{2,11}.

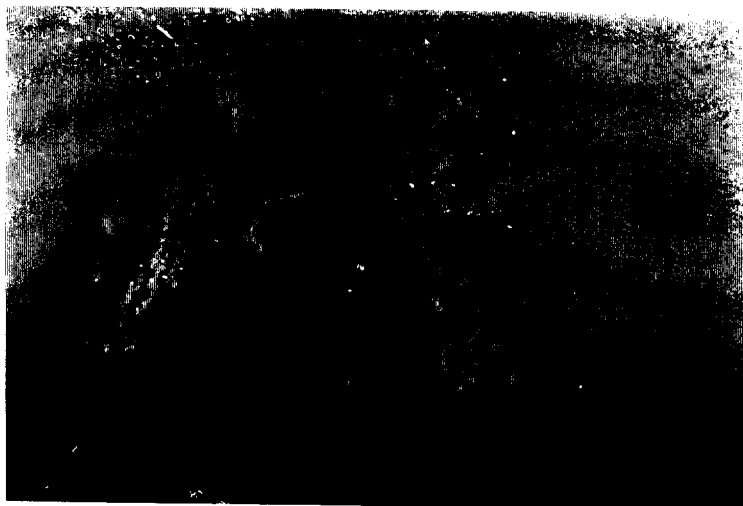
FORMAS FIJAS		
Colicuvativa	Luposa	Verrugosa
Predomina en niños y adultos jóvenes. Reinfección endógena, de focos tuberculosos linfáticos, óseos o ganglionares. Ataque a la piel por contigüidad o por vía linfática. Distribución en forma uni o bilateral en el cuello, regiones submaxilares y supraclaviculares. También puede presentarse en axilas y excepcionalmente en pliegues inguinales. Lesión elemental, el nódulo que puede ser único o múltiple, su evolución comprende 4 etapas: Induración, reblandecimiento, fistulización y cicatrización, que copresenden a un goma.	Se presenta con mayor frecuencia en niños y jóvenes (< de 20 años), especialmente en mujeres (2:1). De origen endógeno. Propagación por contigüidad, por vía linfática o con menor frecuencia por vía hematógena. Ocasionalmente la inoculación puede ser externa. Habitualmente se localiza en la cara y de ésta, en el 85 % de los casos en mejillas y nariz, en el 13 % en el labio superior, menton y pabellones auriculares. Con menos frecuencia (2 %) se observa en tronco y miembros, sobretodo en antebrazos y manos. La lesión característica es el Lupoma, que es un nódulo pequeño, redondeado, de consistencia blanda, de color amarillo rojizo por congestión vascular y que a la vitropresión se torna blanco amarillento. Su aspecto es translúcido.	Es propia de la edad adulta, hay casos que se inician en etapas tempranas de la vida. Predomina en el sexo masculino. Es una tuberculosis de reinfección por autoinoculación o por inoculación externa, (infección exógena). Se le ha considerado enfermedad profesional ya que se presenta en individuos que por su trabajo están en contacto con alguna fuente de infección. Se presenta en regiones expuestas de los miembros, en los superiores en dedos, dorso de manos y antebrazos, en los inferiores en rodillas, piernas y pies. Con menos frecuencia se observa en muslos y en regiones glúteas. Se inicia por un nódulo vegetante, hiperqueratósico, de color grisáceo, de borde infiltrado y rodeado por una zona inflamatoria de color violáceo.

Continuación Tabla II. Características Generales de la Tuberculosis Cutánea^{11,15}.

FORMAS DISEMINADAS		
Nodular profunda	Nódulo necrótica	Micronodular de la cara
Se presenta en mujeres jóvenes (15 a 30 años). Con pantorrillas gruesas, frías y cianóticas. Que por su ocupación permanecen de pie en lugares húmedos y fríos. Afecta los dos tercios inferiores de las piernas, especialmente sus caras posteriores, dorso de pies, rodillas y muslos. Los miembros superiores y excepcionalmente la cara. Morfológicamente está constituida por nódulos numerosos, situados profundamente, de tamaño variable entre uno y tres cm, de forma redondeada u ovoide, mal limitados, dolorosos a la palpación. En ocasiones confluyen. La superficie cutánea suele tener un color rojo o violáceo, es lisa, tensa y brillante en unos sitios, en otros puede mostrar descamación fina y adherente. Por lo general la temperatura de las lesiones esta disminuida o es francamente fría	Se presenta en niños y jóvenes de ambos sexos. Asociada a problemas de estasis y de acrocianosis. De origen endógeno. Diseminada a las caras de extensión de los miembros, tanto superiores como inferiores. Alrededor de, o en, codos y rodillas, dorso de manos, dedos y ortijos, regiones glúteas y lumbares. Ocasionalmente se presenta en la cara y en piel cabelluda, así como en zonas de piel lampiña: palmas, plantas y glande. Constituida por nódulos numerosos, pequeños, de color rosa pálido que después se torna a rojo, levantados, firmes, e infiltrados. A los pocos días aparece en el centro una vesiculopústula de color rojo violáceo y contenido turbio, al secarse da lugar a una escara circular, negruzca de 2 a 4 mm de diámetro fuertemente incrustada en el nódulo, que cubre una ulceración pequeña y profunda. A las dos o tres semanas involucionan, la escara se desprende y deja una cicatriz circular, deprimida, de aspecto varioliforme, rodeada de una franja delgada hiperpigmentada o de un collarate escamoso.	Se presenta en mujeres jóvenes, entre los 15 y 20 años de edad. Afecta preferentemente la cara: frente, nariz, mejillas, párpados superiores e inferiores. La morfología consta de múltiples nódulos pequeños de 1 a 2 mm que se agrupan en una base eritematosa. Suelen agregarse fotosensibilidad y conjuntivitis.

A. Tuberculosis colicuativa.

Ataque a la piel de la axila por vía linfática. Con múltiples nódulos.



B. Tuberculosis verrugosa.

Reinfección por autoinoculación. Con nódulos vegetantes, hiperqueratósicos.



C. Tuberculosis Luposa.

Propagación por contigüidad. Con formación de lupomas.



Figura I. Aspecto clínico de algunas formas de tuberculosis cutánea fija. (Ver Tabla II).

A. Tuberculosis Nodular

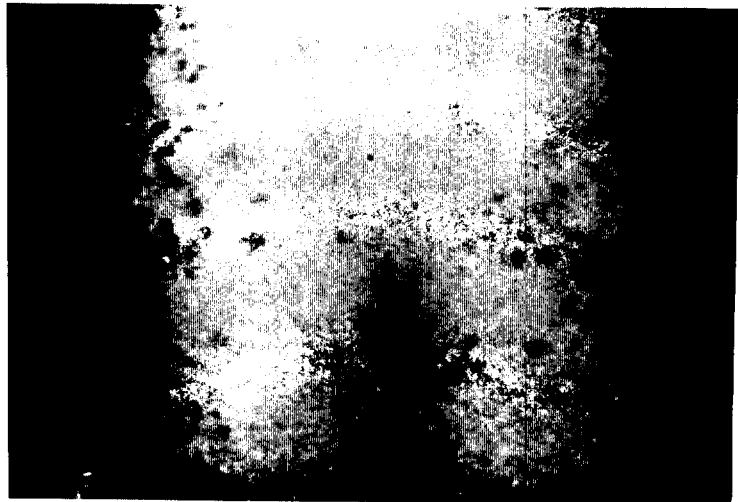
Profunda.

Nódulos múltiples y profundos en la parte inferior de las piernas.



B. Tuberculosis Nódulo Necrótica.

Nódulos numerosos y pequeños con una vesiculopústula.



C. Micronodular de la cara.

Nódulos pequeños agrupados en una base eritematosa.



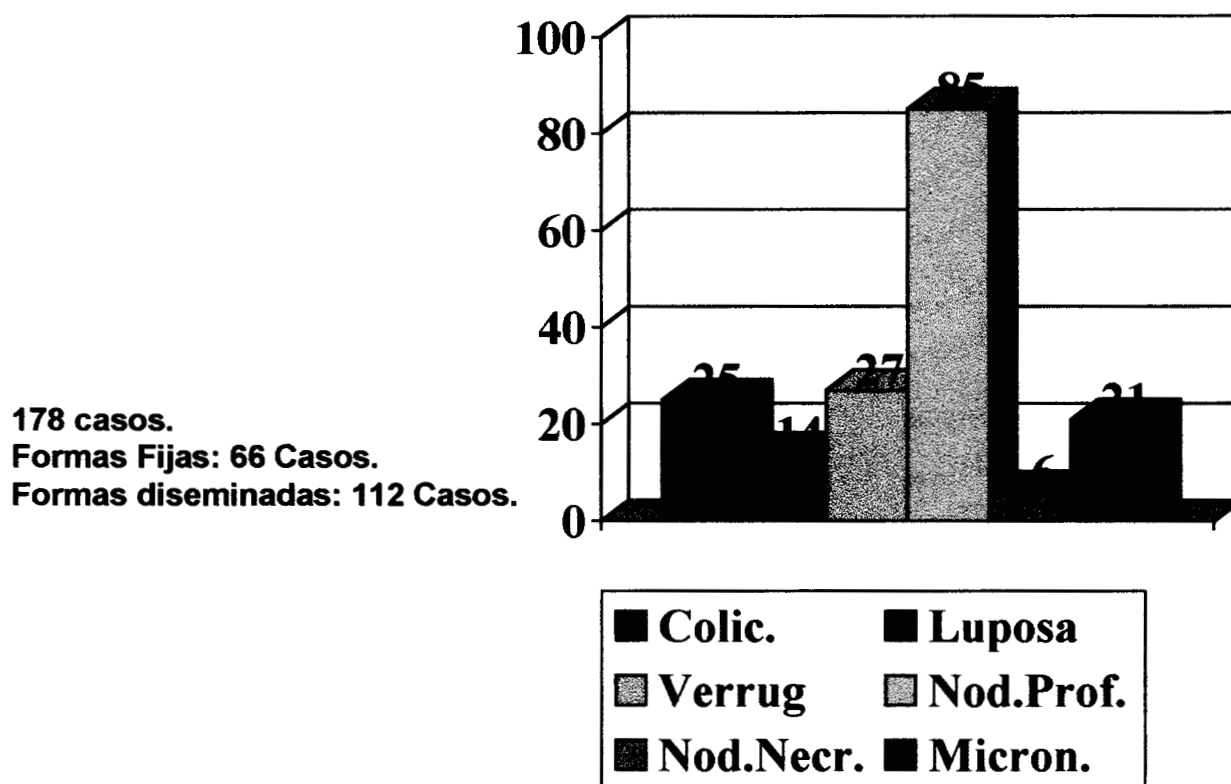
Figura II. Aspecto clínico de algunas formas de tuberculosis cutánea diseminada.

En el estudio realizado en el Hospital Pascua de 1985 a 1995 se detectaron 66 casos de formas fijas y 112 de formas diseminadas, datos que se muestran en la **Tabla III** y en la **Gráfica 1**.

Tabla III. Tipos de Tuberculosis Cutánea en el Centro Dermatológico Pascua. 1985-1995

Año	FORMAS FIJAS			FORMAS DISEMINADAS		
	Colicuativa	Luposa	Verrugosa	Nod.Prof.	N.Necrótica	Micronod.
85	1		2	8		
86	3	2	2	4		
87		1	2	4	1	
88	2	2	3	9	1	
89	2	1	1	12		
90			2	5		2
91	1	2	1	8	1	2
92	7		3	6	1	3
93	4	2	6	7	1	4
94	4	4	5	16	1	7
95	1			6		3
Total	25	14	27	85	6	21

Gráfica 1. Representación Gráfica de los Tipos de Tuberculosis Cutánea en el Centro Dermatológico Pascua 1985-1995



5. DIAGNOSTICO CLINICO.

El diagnóstico de la tuberculosis, en general se establece tomando en cuenta el cuadro clínico y la evidencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en el producto clínico, éste es definitivo si se logra cultivar a *M.tuberculosis*. Sin embargo, en la tuberculosis cutánea, el diagnóstico es por eliminación, debido a que la comprobación del agente causal, que sería el dato más importante, es muy difícil^{2,11,15}. En este caso, el diagnóstico se apoya en las características de la lesión y el cuadro clínico típico, además de la reacción al PPD y el estudio histopatológico. Así también, en el estudio completo del paciente mediante radiología y baciloscopia y sobre todo en la respuesta al tratamiento antifímico^{2,11,15}.

5.1. Hallazgo del bacilo.

Puede hacerse por medio de baciloscopía y de biopsias. De acuerdo a algunos autores es posible encontrarlo con dificultad en los casos de tuberculosis colicuvativa, casi imposible en la luposa y verrugosa y definitivamente nunca se encuentra en las “tuberculides”^{2,11-15}.

El cultivo en los medios apropiados, como el de Lowenstein-Jensen, es difícil de lograr y si se obtiene crecimiento del bacilo, su identificación y tipificación requieren de personal y laboratorios especializados. La inoculación al cobayo no está al alcance de los servicios de salud.

Sin embargo, en todos los casos de tuberculosis fija, debería intentarse el aislamiento e identificación del bacilo, ya que existen otras micobacterias capaces de producir lesiones en la piel, tales como *M. ulcerans* que produce ulceraciones importantes y se ha descrito en México, *M. kansasii* y *M. marinum* que producen el llamado granuloma de las piscinas y que presentan características de cultivo diferentes a las de *M. tuberculosis*.

5.2. Histopatología.

La imagen de las lesiones tuberculosas es el clásico granuloma tuberculoide, constituido por linfocitos, células epiteloides y células gigantes tipo Langhans. En ocasiones el granuloma es completo, otras veces falta alguno de los elementos. Sin embargo, esta imagen no es patognómica de la tuberculosis, pues es compartida por muchas parasitosis o enfermedades infecciosas tales como: cromomicosis, coccidiodomicosis, paracoccidiodomicosis, leishmaniasis, lepra tuberculoide, sífilis tardía, etc. En algunos casos el hallazgo de las formas parasitarias es lo que permite hacer el diagnóstico diferencial. El granuloma tuberculoso, cuando se encuentra, si es patognómico de la tuberculosis cutánea, el cual además de presentar las características del granuloma tuberculoide presenta caseificación¹¹.

En la tuberculosis cutánea, la disposición de los granulomas varía también según las formas clínicas, por ejemplo en la forma colicuvativa hay necrosis caseosa y no se ven células gigantes con facilidad, en la luposa el granuloma es completo y la necrosis caseosa no es frecuente; en la verrugosa predomina la acantosis y la hiperqueratosis y el infiltrado es abundante en la dermis. En la nodular profunda y nódulo necrótica, existe una alteración muy importante de los vasos de la dermis e hipodermis, con

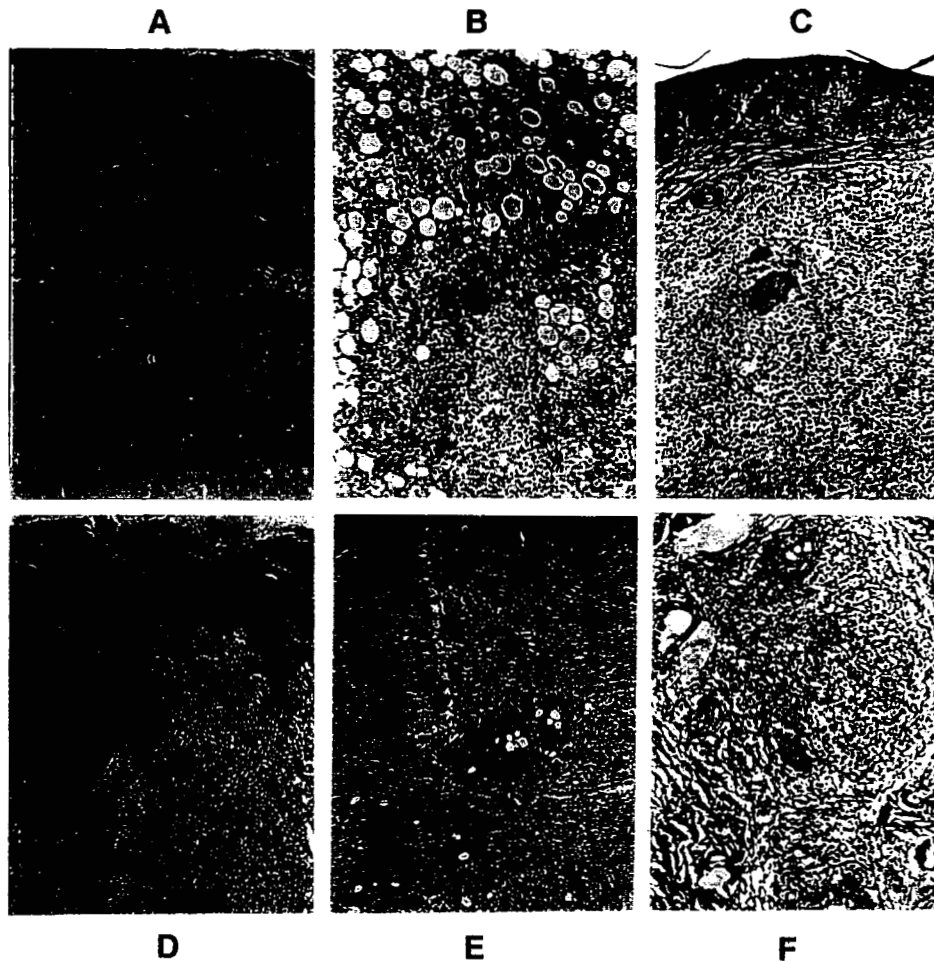


Figura III. Cortes histológicos de piel de pacientes con tuberculosis cutánea teñidos con Hematoxilina-Eosina.

A. Piel normal. B. Tb. Colicuvativa. C. Tb. Luposa. D. Tb. Verrugosa. E. Tb. Nodular Profunda. F. Tb. Nódulo Necrótica.

alteraciones proliferativas en sus paredes y con granulomas alrededor, **Figura III.** Sin embargo el patólogo también tiene dificultad para diferenciar estos cuadros de otros tipos de vasculitis^{2,11,15}.

5.3. Intradermoreacción con PPD.

La intradermoreacción con PPD no es diagnóstica, sólo indica un contacto con el bacilo de Koch y un alto porcentaje de la población la da positiva porque ha sido vacunada con BCG. Tiene importancia cuando es negativa ya que significa que el cuadro que se supone de origen tuberculoso no tiene tal etiología, o se trata de casos anérgicos. De cualquier forma es importante medir el grado de respuesta del organismo al PPD.

5.4. Estudio completo del paciente.

Aún cuando frecuentemente la localización del bacilo tuberculoso es en la piel y no se encuentra en otros sitios, debe hacerse un estudio completo del paciente, para investigar focos activos que pueden estar en el pulmón, ganglios, riñón, ojos, etc. La forma colicuvativa puede coincidir con lesiones en ganglios mediastínicos o en pulmones. Las “**tuberculides**” pueden cursar con focos activos, en ocasiones mínimos, que pasan inadvertidos en los ojos o en el riñón. Por ello se indican los estudios radiológicos, las baciloscopías y otros.

El diagnóstico de la tuberculosis en la piel, es casi siempre un diagnóstico por eliminación y en la mayoría de las ocasiones, el tratamiento es el que permite hacer el diagnóstico de certeza.

Los análisis de laboratorio son útiles para descartar procesos que suelen semejarse a las lesiones tuberculosas, tales como los que se presentan en la **Tabla IV**.

TABLA IV. Diagnóstico Diferencial de la Tuberculosis Cutánea¹¹

Tb colicuativa	Coccidioidomicosis, osteomielitis, actinomicosis, micetoma, enfermedad de Hodgkin, brucelosis, esporotricosis.
Tb verrugosa	Cromomicosis, linfaestasis verrugosa, verrugas virales, esporotricosis.
Tb luposa	Esporotricosis, leishmaniasis, carcinomas, paracoccidioidomicosis.
Tb nodular profunda	Eritema nudoso, vasculitis nodular.
Tb nódulo necrótica	Acné, foliculitis, sífilides.
Tb micronodular	Frinoderma, queratosis pilar.

5.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En años recientes se han desarrollado técnicas de Biología Molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar *in vitro* segmentos de DNA de *M. tuberculosis* y otras micobacterias presentes en diferentes muestras clínicas¹⁶⁻²⁸. Varias publicaciones han indicado que la sensibilidad de esta aproximación para la detección de *M. tuberculosis*, es comparable o mejor que las técnicas de cultivo²⁹⁻³³. En relación a la tuberculosis cutánea, hay algunos casos publicados indicando la utilidad de esta prueba como es en el caso de *Lupus vulgaris*³⁴⁻³⁶ y escrofuloderma³⁶⁻³⁷, así también en una inoculación exógena accidental³⁷, en lesiones de tuberculides papulonecróticas y en eritema indurado de Bazin^{12,13,38}.

La mayoría de las pruebas de PCR utilizadas en los estudios mencionados, no distinguen entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y la cepa de vacunación de Calmette y Guérin, sin embargo son una herramienta diagnóstica prometedora en la tuberculosis cutánea, siempre y cuando se lleven a cabo en laboratorios especializados que hayan superado los riesgos de los errores metodológicos y tengan precaución en la interpretación de los resultados. Esta puede usarse para estudiar tejidos embebidos en parafina^{39,40}.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las “**tuberculides**”, el aislamiento y cultivo de *M. tuberculosis*, generalmente no es posible^{11-15,38} y se considera que aún cuando el bacilo esté presente en las lesiones, puede haber muerto por una fuerte respuesta inmune del hospedero, por lo que el origen tuberculoso de éstas, ha estado en controversia^{12,13,38}.

Así, el origen del eritema indurado de Bazin, una erupción ulcerativa, nodular crónica de la parte inferior de las piernas, ha permanecido en controversia por casi 100 años^{12,13,38,41,43}. Bazin en 1861, describió el eritema indurado como una manifestación de tuberculosis³⁸, sin embargo, debido a que éste es raro y otros procesos patológicos pueden causar un proceso similar (tromboflebitis y lupus eritematoso), la tuberculosis ocasionalmente ha sido designada como una causa de vasculitis nodular. Sin embargo, aplicando metodologías de PCR, el DNA del complejo *M. tuberculosis* fue identificado en una proporción significativa de muestras (5 de 7) de eritema indurado³⁸. En todos los pacientes el diagnóstico fue basado en la historia médica, apariencia clínica, estudios histológicos y una prueba cutánea de tuberculina fuertemente positiva. El cultivo fue intentado en 4 casos, siendo negativo para micobacteria. La detección de DNA del complejo *M. tuberculosis* en eritema indurado, se ha confirmado por Schneider et al¹².

Considerando que en la tuberculosis cutánea diseminada o “**tuberculides**”, generalmente no se encuentra al *M. tuberculosis* por baciloscopía o cultivo, en el sitio de las lesiones y que en la tuberculosis cutánea fija o habitada, el hallazgo de éste, no siempre es posible, por lo que el diagnóstico a la fecha se establece por eliminación, mismo que se dificulta considerablemente por la variedad de formas clínicas y su similitud con otros procesos granulomatosos en la piel, es de primordial importancia utilizar aproximaciones moleculares, específicas y confiables, que permitan investigar la posible presencia del DNA micobacteriano y así poder determinar si la tuberculosis cutánea diseminada, o “**tuberculides**”, es provocada por *M. tuberculosis*.

IV. HIPOTESIS.

Las “**tuberculides**” podrán incluirse, o descartarse, de la tuberculosis cutánea mediante la búsqueda del DNA de *M. tuberculosis* en el sitio de la lesión. Con esto podrá sustentarse el largo y frecuente debate de su origen fímico.

V. OBJETIVOS.

1. Determinar si la tuberculosis cutánea diseminada, o “**tuberculides**”, es provocada por *Mycobacterium tuberculosis* .
2. Establecer el diagnóstico confirmativo de la tuberculosis cutánea mediante un **sistema múltiple de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una PCR anidada**.
3. Establecer la correlación del diagnóstico clínicopatológico con respecto a la detección del DNA de *M. tuberculosis* por PCR, comparando los casos que corresponden a la tuberculosis cutánea fija y la diseminada.

VI. MATERIAL, PACIENTES Y METODOLOGÍA

1. Material

Incluido en el apéndice 1.

2. Pacientes y muestras.

En base a la prevalencia de la tuberculosis cutánea, determinada con respecto a la estadística de los últimos 11 años, en el Hospital Dermatológico Ladislao de la Pascua, se investigó la presencia del DNA micobacteriano en 30 muestras de pacientes con diagnóstico clínicopatológico de tuberculosis cutánea. Las biopsias de piel de los 30

pacientes que se incluyeron se encontraban embebidas en parafina y fueron seleccionadas al azar de casos diagnosticados como tuberculosis diseminada y fija, manteniéndose la proporción de 2 a 1. De tal manera que se seleccionaron 18 con diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis cutánea diseminada y 12 con alguna forma de tuberculosis cutánea fija (**Tabla V**). Se incluyeron 20 mujeres y 10 hombres, cuya edad fue de 3 a 63 años (edad promedio 30.1 años, DE 17.58), estos fueron captados en los años de 1991 a 1995 (**Tablas VI y VII**). Los controles negativos consistieron de cuatro biopsias de piel de apariencia microscópica normal y de la mezcla de los reactivos utilizados en los ensayos. El control positivo del sistema fue el DNA genómico purificado y estandarizado de *M. tuberculosis*, aislada de un paciente con tuberculosis pulmonar y caracterizada en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

3. Metodología.

En un estudio ciego, se investigó la presencia del DNA micobacteriano mediante un sistema múltiple de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en 34 muestras de biopsia de piel, fijadas con formalina y embebidas en parafina, 30 de ellas con diagnóstico clinicopatológico de alguna forma de tuberculosis cutánea (Tabla V) y 4 de piel normal. Para ello, de forma simultánea se amplificaron tres fragmentos genómicos del DNA bacteriano, utilizando tres pares de oligonucleótidos iniciadores. El primer grupo de iniciadores amplifica un fragmento de 506 pares de bases (pb) del gen para el antígeno de 32 Kd (antígeno alfa) de *M. tuberculosis*, mismo que está presente en la mayoría de las especies del género *Mycobacterium*. El segundo grupo, amplifica un fragmento de 984 pb de la secuencia de inserción IS 6110, de las bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y el tercer grupo, derivado de una secuencia específica de *M. tuberculosis* llamada mtp 40, amplifica un fragmento genómico de 396 pb. Para incrementar la sensibilidad del sistema de detección se empleó una prueba de PCR-anidada (Nested-PCR), utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican una región interna de 223 pb de la secuencia especie-específica mtp40 de *M.tuberculosis*.

Tabla V. Datos clínicos de 30 casos de tuberculosis cutánea incluidos en el estudio.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Distribución de lesiones	Aspecto clínico	Duración	Diagnóstico clinicopatológico
1	F	30	Párpados y mejillas	Nódulos pequeños	4 meses	Granuloma tuberculoide.
2	F	9	Toda la cara	Nódulos pequeños	6 meses	Granuloma tuberculoide.
3	F	28	Muslos, piernas y dorso de los pies.	Nódulos profundos y cicatrices.	1 mes	Tb. nodular profunda.
4	F	40	Muslos y piernas	Placas eritematosas y dolorosas.	1 año	Tb. nodular profunda.
5	M	19	Dorso mano izquierda.	Nódulos con aspecto verrugoso.	2 años	Tb. verrugosa.
6	F	55	Muslos y piernas	Nódulos dolorosos	1 mes	Tb. nodular profunda.
7	F	6	Axila, brazo, dorso mano y torax izquierdo.	Nódulos, gomas y cicatrices.	2 años	Tb. colicuativa.
8	M	48	Clavícula derecha	Una goma ulcerada con secreción.	4 años	Tb. colicuativa.
9	M	43	Dorso mano izquierda.	Una placa nódulo verrugosa.	8 meses	Tb. verrugosa
10	F	63	Ambas piernas en todas las caras.	Nódulos profundos y manchas residuales.	10 años	Tb. nodular profunda.
11	F	4	Párpado superior Derecho.	Cuatro nódulos pequeños	6 meses	Tb. luposa.
12	M	6	Mandíbula Derecha.	Nódulo ulcerado con secreción	6 meses	Tb. colicuativa.
13	F	27	Clavícula derecha	Siete gomas ulceradas con material caseoso.	18 meses	Tb. colicuativa.

Continuación Tabla V. Datos clínicos de 30 casos de tuberculosis cutánea incluidos en el estudio.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Distribución de lesiones	Aspecto clínico	Duración	Diagnóstico clinicopatológico
14	M	22	Párpados inferiores	Nódulos pequeños	7 meses	Tb. micronodular.
15	F	60	Piernas	Cuatro nódulos	5 años	Tb. nodular profunda.
16	M	3	Arco plantar Derecho.	Placa infiltrada con dos orificios.	18 meses	Tb. verrugosa.
17	F	18	Maleolos	Úlceras purulentas y cicatrices.	3 años	Granul. Tuberculoide.
18	F	45	Piernas	Nódulos profundos y cicatrices.	3 años	Tb. Nod. profunda.
19	F	10	Párpado inferior y labio superior.	Nódulos pequeños y cicatrices.	¿	Tb. micronodular.
20	M	17	Cervical y supraclavicular izq. y esternal.	Nódulos y cicatrices	3 meses	Tb. colicuativa.
21	F	15	Muslos y piernas	Nódulos profundos	2 años	Tb. Nod. profunda.
22	F	44	Brazo, antebrazo y muñeca.	Nódulos pequeños	2 meses	Tb. Micronodular.
23	F	45	Piernas	Nódulos profundos	45 días	Tb. Nod. profunda.
24	M	33	Mano derecha	Nódulos verrugosos	8 años	Tb. verrugos
25	F	42	Cara	Nódulos pequeños	13 años	Tb. luposa
26	F	55	Piernas	Nódulos profundos	5 años	Tb. Nod. profunda
27	M	28	Cara	Nódulos pequeños	4 meses	Tb. Micronodular.
28	F	36	Músclos y piernas.	Nódulos profundos	27 años	Tb. Nod. profunda.
29	M	34	Pie izquierdo	Nódulos verrugosos	15 años	Tb. Verrugosa.
30	F	18	Cara	Nódulos pequeños	2 años	Tb. Micronodular

**TABLA VI. Número de casos seleccionados
por grupos de edad y sexo.**

Grupos de edad (n=30)	Casos
01 a 10 años	6
11 a 20 años	5
21 a 30 años	5
31 a 40 años	4
41 a 50 años	6
> a 51 años	4

Femenino	20 (67%)
Masculino	10 (33%)

**TABLA VII. Tipo y número de casos de tuberculosis cutánea
incluidos en el estudio.**

	Casos	%
FORMAS DISEMINADAS (n=18)	18	60
Nodular profunda	10	55.6
Micronodular	7	38.9
Nódulo necrótica	1	5.5
FORMAS FIJAS (n=12)	12	40
Verrugosa	5	41.7
Luposa	2	16.6
Colicuativa	5	41.7
TOTAL	30	100

3.1 Preparación de las muestras de biopsia y extracción del DNA.

Se hicieron 5 cortes de 20 μm de espesor de los bloques seleccionados de tejido embebido en parafina, de acuerdo al procedimiento descrito por Volkenandt et al.⁴⁴. Los tejidos fueron desparafinados de acuerdo al mismo procedimiento y sometidos a 70°C durante 30 min³². El DNA genómico se aisló con tiocianato de guanidina y fenol, utilizando 1.0 mL del reactivo TRIzol (Gibco BRL), de acuerdo al procedimiento descrito por Chomezynski y Sacchi⁴⁵, dicho reactivo es una solución mono-fásica de tiocianato de guanidina y fenol. El DNA se resuspendió en 50 μL de NaOH 8.0 mM después de la precipitación con etanol al 75%, el material insoluble se removió mediante centrifugación a 14 000 rpm por 5 min a 4 ° C, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo nuevo. Esta solución se calentó a 55 ° C durante 20 min, se determinó su relación de absorbancia a 260/280 nm y se tomaron 10 μL para la amplificación del DNA por PCR⁴⁶. El procedimiento completo para la extracción del DNA se describe en el apéndice 2.

3.2 Sistema de PCR Múltiple.

Para la identificación diferencial de las micobacterias se utilizó el sistema descrito por Del Portillo y col., 1996²⁷. Se emplearon 10 μL del DNA en solución de NaOH 8 mM, aislado de las biopsias de piel y cuantificado previamente, como control positivo del sistema se usaron 100 ng del DNA de la cepa tipo de *Mycobacterium tuberculosis*. Los blancos para el ensayo de PCR fueron los genes que codifican para la proteína de 32 kDa (gen del antígeno alfa), presente en todas las micobacterias descritas, así como la secuencia de inserción IS6110, gen que se encuentra en las bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*²⁷ y el gen mtp40 especie-específico que codifica para la proteína del mismo nombre^{23,24} (GenBank NCBI gibbsq 146622). Los oligonucleótidos iniciadores utilizados fueron obtenidos de Boehringer Mannheim y sus secuencias están indicadas en la **Tabla VIII**, así también, en ésta misma tabla se indican los fragmentos amplificados de DNA. Todas las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 50 μL , con amortiguador de reacción 10 X, 1.25 U de Taq polimerasa,

0.2 mM de cada deoxinucleotido trifosfato, 2.5 mM de MgCl₂ (todos los reactivos fueron de Gibco BRL), 10 pmol de MT1-MT2, 15 pmol de IS5-IS6 y 20 pmol de PT1-PT2. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador RoboCycler 40 (Stratagene), de acuerdo a los perfiles térmicos indicados en la **Tabla IX**. Para establecer el límite de sensibilidad del sistema PCR múltiple, se hicieron diluciones seriadas en base 10, del DNA de *M. tuberculosis*, de 10 ng/μL a 10 fg/μL.

Tabla VIII. Oligonucleótidos iniciadores utilizados

Gen amplificado	Denominación	Secuencia	Longitud del fragmento amplificado
Antígeno alfa	MT1	5' -TTC CTG ACC AGC GAG CTG CCG- 3'	506 pb
	MT2	5' -CCC CAG TAC TCC CAG CTG TGC- 3'	
Secuencia de inserción IS6110	IS 5	5' -CGG AGA CGG TGC GTA AGT GG-3'	984 pb
	IS 6	5' -GAT GGA CCG CCA GGG CTT GC-3'	
<i>mtp 40</i>	PT1	5' -CAA CGC GCC GTC GGT GG- 3'	396 pb
	PT2	5' -CCC CCC ACG GCA CCG C- 3'	
<i>mtp 40</i> - fragmento interno	PT3	5' -CAC CAC GTT CGG GAT GCA CTG C- 3'	223 pb
	PT4	5' -CTG ATG GTC TCC GAC ACG TC G- 3'	
<i>β-Actina</i>		5' -GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA -3' 5' -CTC CTT AAT GTC ACG GCA CGA TTT-3'	548 pb

Tabla IX. Perfil térmico de las reacciones de amplificación

Etapa	PCR Múltiple	PCR Anidada	PCR βActina	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94°C 5 min	1
Desnaturalización	94 °C 1 min	94 °C 1 min	94°C 1.15 min	35
Alineamiento	71 °C 2 min	74 °C 2 min	55°C 1.30 min	
Elongación	72 °C 3 min	72 °C 2 min	72°C 2.00 min	
Extensión final	72 °C 10 min	72 °C 7 min	72°C 10 min	1

3.3 Análisis de los productos de PCR.

Después de la amplificación del DNA se analizaron 10 uL de los productos de reacción PCR mediante electroforesis horizontal (Horizon 58, Life Technologies, Gibco

BRL), en gel de agarosa al 2.0 % (PRONADISA) conteniendo 0.5 µg de bromuro de etidio por mL⁴⁶. Las bandas de DNA fueron visualizadas en un analizador de imágenes (IS-1000, Digital Imagin System, Alpha Innotech Corporation). Los productos de PCR que no mostraron bandas de amplificación por este método, fueron sometidos a una detección específica de *M.tuberculosis*, mediante una prueba de PCR anidada²⁶.

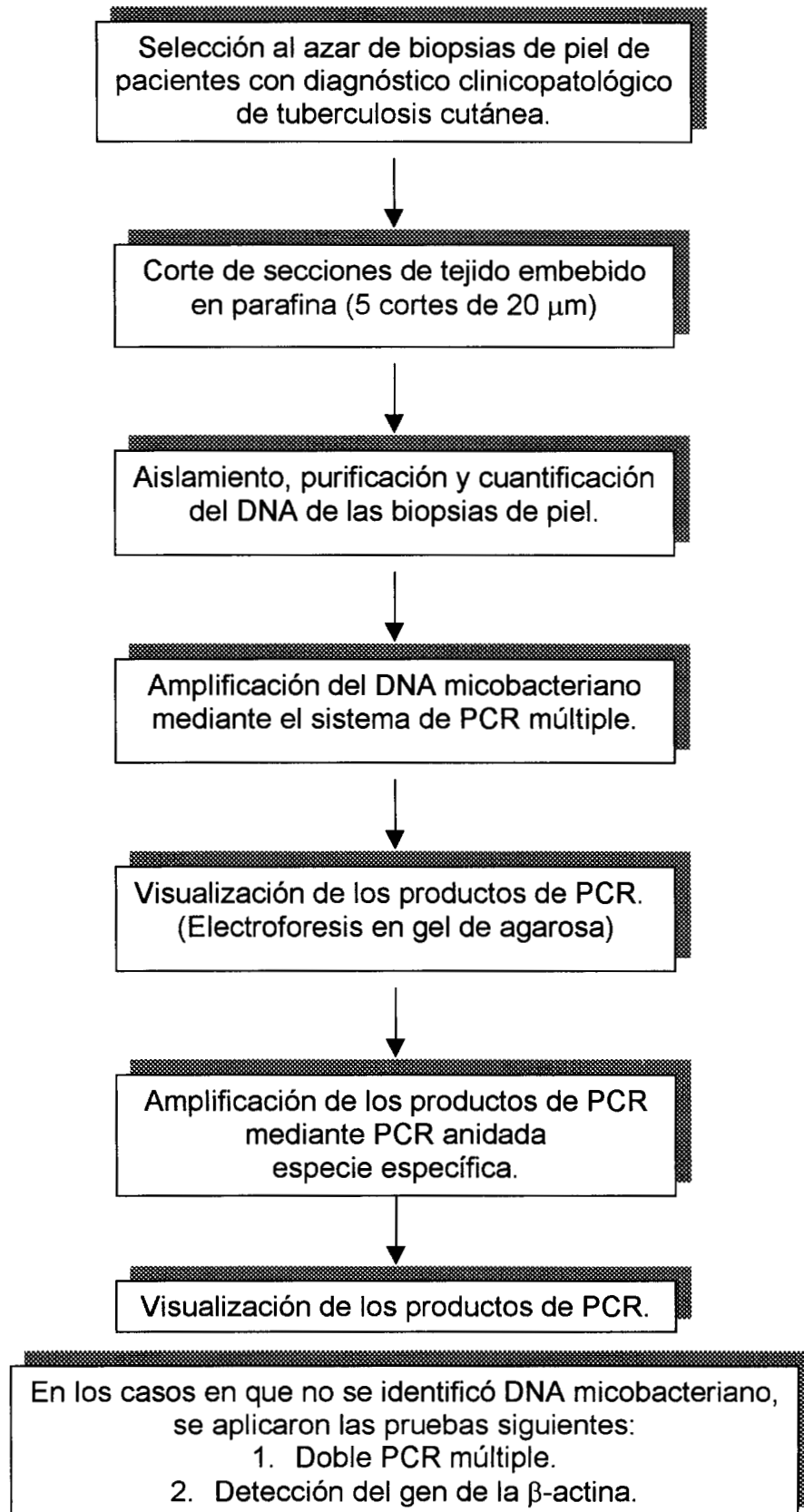
3.4 PCR anidada.

Se utilizó como secuencia blanco el gen *mtp40* y los oligonucleótidos iniciadores internos que corresponden a los nucleósidos 44 a 65 (PT3) y 244 a 265 (PT4), de acuerdo a lo descrito por Gori y col.²⁶. Su secuencia puede observarse en la Tabla VIII (GenBank NCBI gibbsq 146622). La región amplificada fue de 223 pb. Para esta prueba se utilizaron 10 µL de los productos de PCR, 20 pmol de los oligonucleótidos iniciadores y los reactivos de PCR en las concentraciones indicadas anteriormente. La reacción de amplificación fue llevada a cabo bajo los perfiles térmicos señalados en la tabla IX. Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0 %, con 0.5 µg de bromuro de etidio por mL⁴⁶ y visualizados como en la PCR múltiple. La sensibilidad de la PCR anidada se evaluó a partir de los productos de amplificación usados en la determinación de sensibilidad para la PCR múltiple.

3.5 Doble PCR y Análisis del gen de la β -actina.

Las muestras de DNA que no mostraron el producto de amplificación correspondiente a *M. tuberculosis* por la prueba de PCR anidada, fueron sometidas a una doble prueba de PCR múltiple, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, ésto con objeto de incrementar la posibilidad de identificar cualquier otra micobacteria diferente a *M. tuberculosis*. Así también, como control de integridad del DNA, dichas muestras fueron analizadas para detectar un fragmento del gen de la β -actina⁴⁸, utilizando los oligonucleótidos iniciadores indicados en la tabla VIII. La reacción de amplificación fue llevada a cabo bajo los perfiles térmicos señalados en la tabla IX.

VII. DIAGRAMA DE FLUJO.



VIII. RESULTADOS

1. Amplificación de tres genes de *M. tuberculosis*. Sistema de PCR múltiple.

En la **Figura 1** se muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación del DNA de *M. tuberculosis*. En el carril 7 se observan las tres bandas obtenidas mediante el sistema PCR múltiple, una que corresponde a un fragmento de amplificación de 506 pb del gen del antígeno alfa, común a todas las micobacterias, un fragmento de amplificación de 984 pb de la secuencia de inserción IS6110, presente en todas las micobacterias del complejo tuberculoso y un fragmento de 396 pb, resultado de la amplificación del gen *mtp40* especie-específico. Los carriles 3, 4 y 5 muestran los fragmentos de amplificación del DNA, cuando los oligonucleótidos iniciadores se utilizaron en forma separada. En el carril 6 de la misma figura, se muestra un fragmento de amplificación de 223 pb, que corresponde al fragmento interno del producto amplificado del gen *mtp40*.

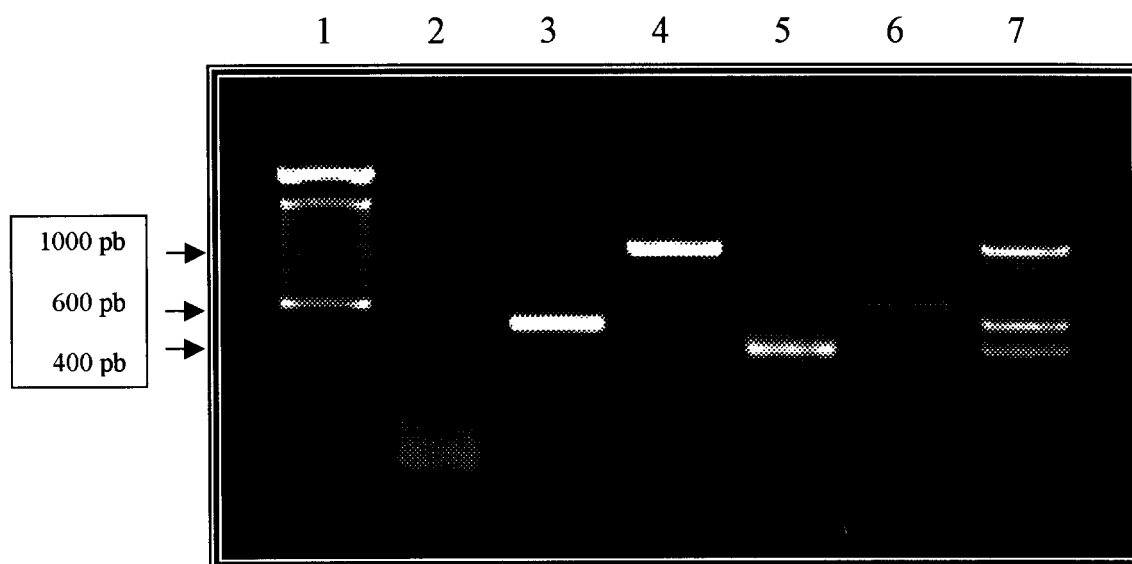


Figura 1. Amplificación de tres genes diferentes de *M. tuberculosis*.

100 ng de DNA purificado de *M. tuberculosis* fue amplificado con un grupo de oligonucleótidos iniciadores separadamente y con la mezcla de tres de éstos. 1.-Marcadores Moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo sin DNA, 3.-Iniciadores género específico (MT1-MT2), 4.-Iniciadores complejo *M. tuberculosis* (IS5-IS6), 5.-Iniciadores especie-específicos (PT1-PT2), 6.-Iniciadores fragmento interno del gen *mtp40* especie-específico (PT3-PT4), 7.-MT1-MT2 mas IS5-IS6 mas PT1-PT2.

2. Sensibilidad de la PCR múltiple y de la PCR anidada.

La sensibilidad del sistema PCR múltiple fue de 100 pg de DNA y de la PCR anidada fue de 10 fg. **Figuras 2 y 3.**

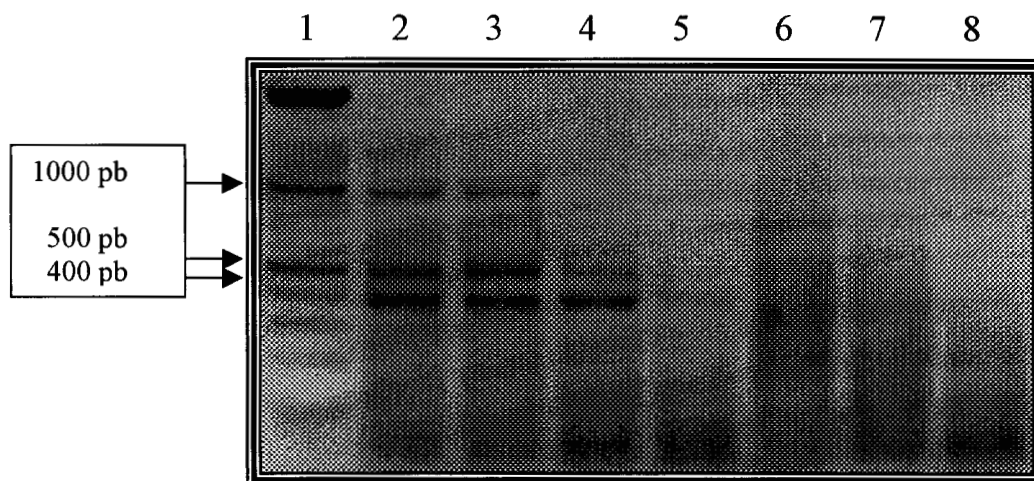


Figura 2. Sensibilidad del Sistema PCR múltiple con DNA purificado de *M. tuberculosis*. Productos de PCR de cantidades decrecientes de DNA purificado de *M. tuberculosis*. Se observó una banda de amplificación de 396 pb correspondiente al gen *mtp40* hasta 100 pg de DNA.

1.- Marcadores moleculares de 100 pb, 2.- 100 ng, 3.- 10 ng, 4.- 1 ng, 5.- 100 pg, 6.- 10 pg, 7.- 1 pg, 8.- 100 fg.

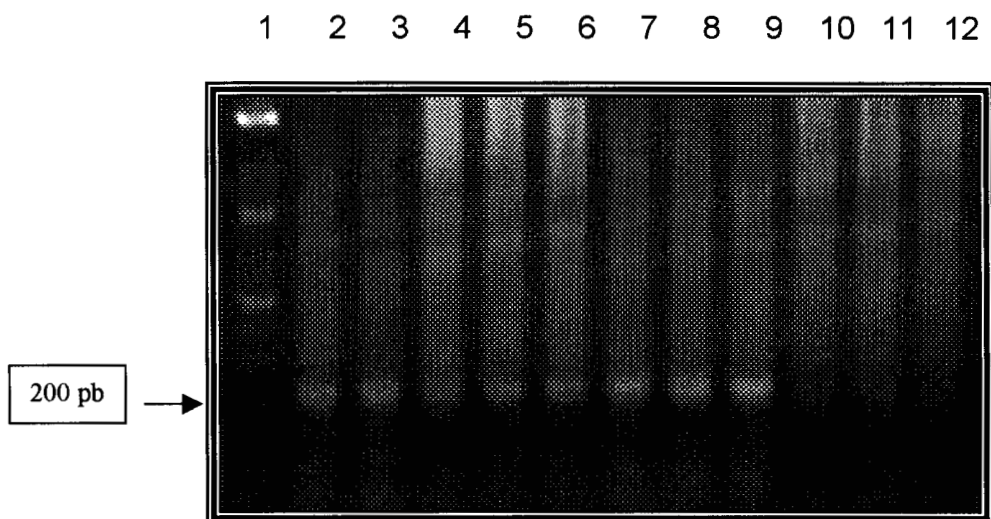


Figura 3. Sensibilidad de la PCR anidada con DNA purificado de *M. tuberculosis*. Productos de amplificación empleando como plantilla los productos de PCR de cantidades decrecientes de DNA purificado de *M. tuberculosis* y los iniciadores de la secuencia interna del gen *mtp40*. Se observó producto de amplificación de 223 pb hasta 10 fg de DNA.

1.- Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-100 ng, 3.-10 ng, 4.-1 ng, 5.-100 pg, 6.-10 pg, 7.- 1 pg, 8.- 100 fg, 9.- 10 fg, 10.- 1 fg, 11.-100 ag, 12.-10 ag.

3. Detección del DNA del género *Mycobacterium*, del complejo *M.tuberculosis* y de *M. tuberculosis* en las muestras de piel.

Después de la estandarización del sistema PCR múltiple con el DNA de la cepa de *M. tuberculosis*, éste fue aplicado a las 34 muestras de biopsias de tejido embebido en parafina, 30 de pacientes con diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis cutánea y 4 controles de piel normal, los resultados se muestran en las **figuras 4 a 8**.

Los resultados de los primeros 6 pacientes estudiados, se encuentran en los carriles 3 a 7 de **4A** y en el carril 2 de **4B**, (pacientes 1,2,5,7,8 y 9). En ninguno de los 6 pacientes se observaron las bandas de amplificación correspondientes a *M.tuberculosis*, por lo que a éstas se les aplicó la prueba de PCR anidada. Los controles positivos mostraron las tres bandas de amplificación esperadas (carriles 8 de la Fig. 4A, 3 y 4 de la Fig. 4B), el control negativo fue satisfactorio (carril 2 de la Fig. 4A).

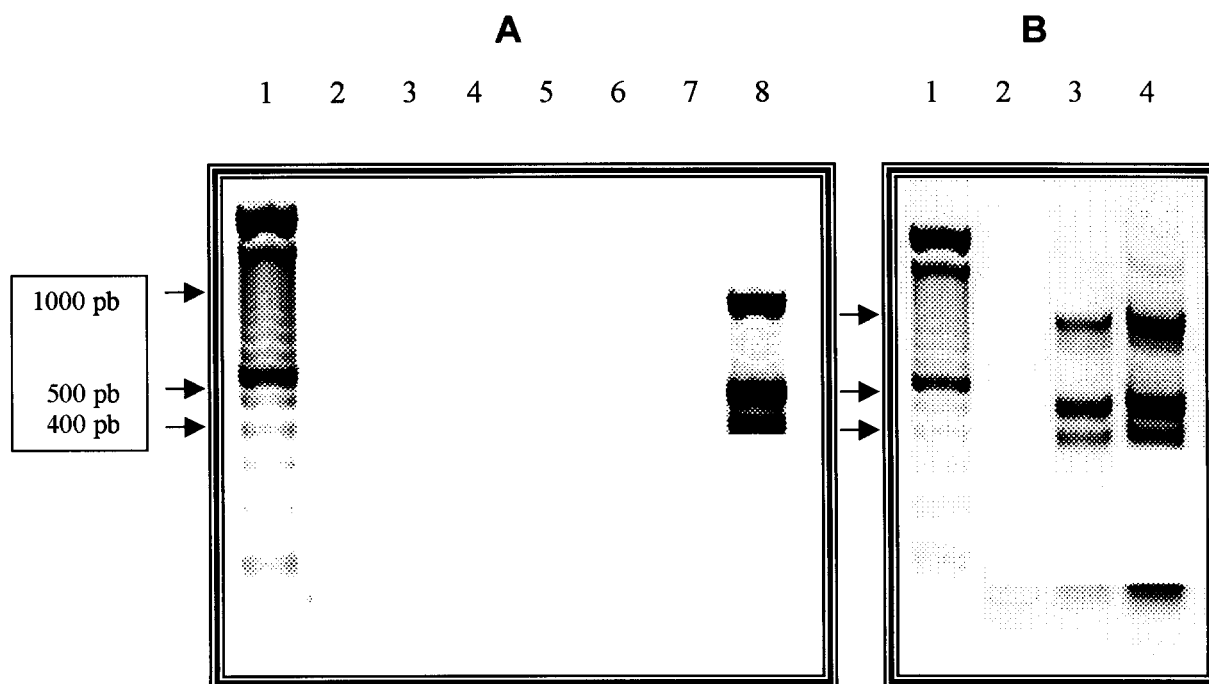
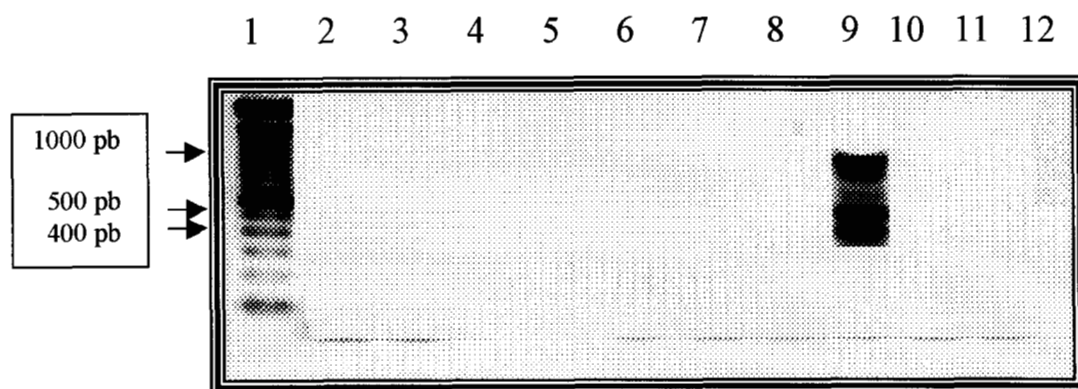


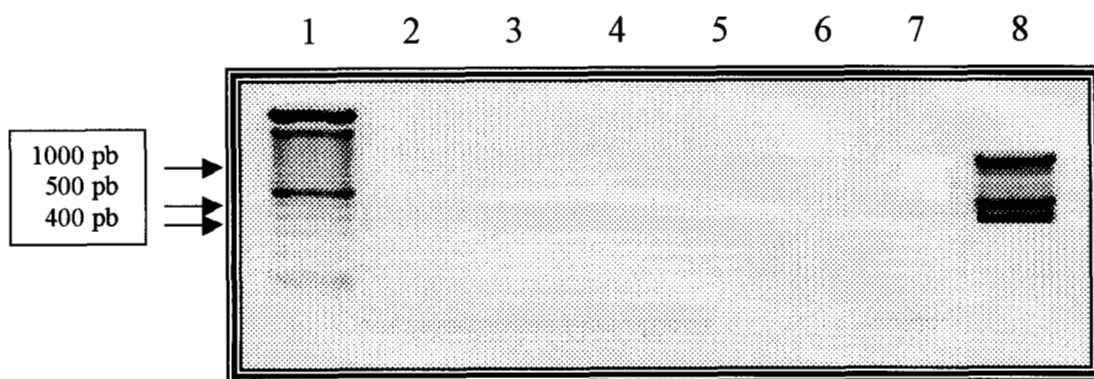
Figura 4. Amplificación simultánea de tres genes de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. A 10 μ L del DNA extraído de las biopsias de 6 pacientes se les aplicó la prueba de PCR múltiple, no se observó ningún producto de amplificación cuando se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Los controles negativos y positivos fueron satisfactorios.

A. 1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control Negativo, 3.-Paciente 1, 4.-Paciente 2, 5.-Paciente 5, 6.-Paciente 7, 7.-Paciente 8, 8.-Control positivo. **B.** 1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Paciente 9, 3 y 4.-Controles positivos.

De manera similar, en las **Figuras 5A y 5B** se encuentran los resultados de las biopsias de 14 pacientes, 5 con diagnóstico histopatológico de alguna de las formas de tuberculosis cutánea fija y 9 con alguna forma de tuberculosis cutánea diseminada, las cuales no mostraron ninguna banda de amplificación visible, por lo que fueron sometidas a la prueba de PCR anidada (Fig. 5A, carriles 3 a 8, pacientes 11,12,13,17,19 y 20, carriles 10 a 12, pacientes 3, 4 y 6. En la Fig. 5B, carriles 2 a 6, pacientes 10,14,15,16 y 18). En 5A, los carriles 2 y 9 corresponden a los controles negativo y positivo respectivamente, mismos que dieron resultados conforme lo esperado. En el carril 7 de 5B se encuentra el producto de PCR de una biopsia de piel normal (control 1) y en el 8 el control positivo, los resultados de ambos fueron satisfactorios.



A. 1.-Marcadores Moleculares de 100 pb, 2.-Control Negativo, 3.-Paciente 11, 4.-Paciente 12, 5.-Paciente 13, 6.-Paciente 17, 7.-Paciente 19, 8.-Paciente 20, 9.-Control positivo, 10.-Paciente 3, 11.-Paciente 4, 12.-Paciente 6.



B. 1.-Marcadores Moleculares, 2.-Paciente 10, 3.-Paciente 14, 4.-Paciente 15, 5.-Paciente 16, 6.-Paciente 18, 7.-Piel normal, 8.-Control positivo.

FIGURA 5 . Amplificación simultánea de tres genes de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de 14 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. A 10 μ L del DNA extraído de las biopsias se les aplicó la prueba de PCR múltiple, no se observó ningún producto de amplificación cuando se analizaron en gel de agarosa al 2 %. Los controles fueron satisfactorios.

En la **Figura 6** se muestran los resultados de 4 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea y el resultado de una muestra de piel normal. El control negativo del sistema fue de acuerdo a lo esperado (carril 2). Las muestras de los pacientes 22 al 25 y el control de piel normal (control 2) no mostraron ninguna banda de amplificación de *M. tuberculosis* (carriles 3 a 7). En el control positivo del sistema se observaron las tres bandas de amplificación correspondientes a *M. tuberculosis* (carril 8).

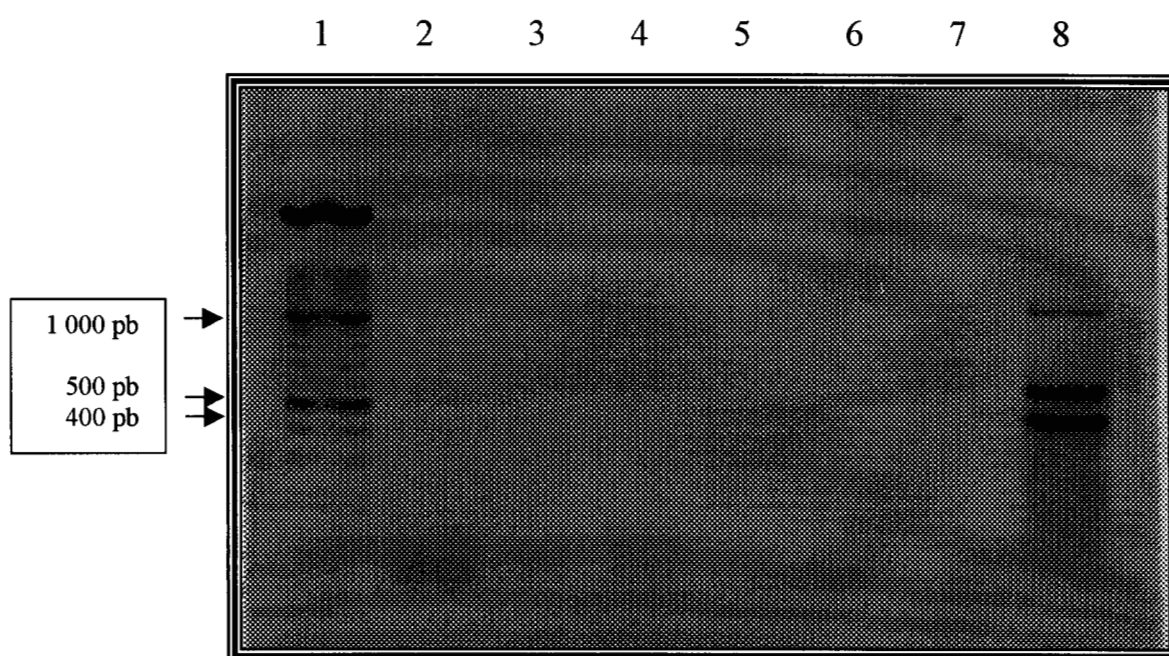


FIGURA 6. Amplificación simultánea de tres genes de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de 4 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. A 10 μ L del DNA obtenido de las biopsias se les aplicó la prueba de PCR múltiple, no observándose productos de amplificación en ninguna de ellas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. El DNA control de *M. tuberculosis*, mostró las tres bandas de amplificación correspondientes.

1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 22, 4.-Paciente 23
5.-Paciente 24, 6.-Paciente 25, 7.-Piel normal, 8.-Control positivo.

De forma similar, en la **Figura 7** se observan los resultados de 4 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea (pacientes 26 a 28 y 30, carriles 3 a 6), y el resultado de una muestra de piel normal (control 3, carril 7), los que no mostraron ninguna banda visible de amplificación. Los controles negativo y positivo del sistema dieron resultados conforme lo esperado (carriles 2 y 8). Así también, en la

Figura 8 se muestran los resultados de 2 pacientes (21 y 29) y el control de piel normal (control 4), en los que no se observó ninguna banda de amplificación (carriles 3 a 5). Los controles negativo y positivo del sistema, mostraron los resultados esperados (carriles 2 y 6).

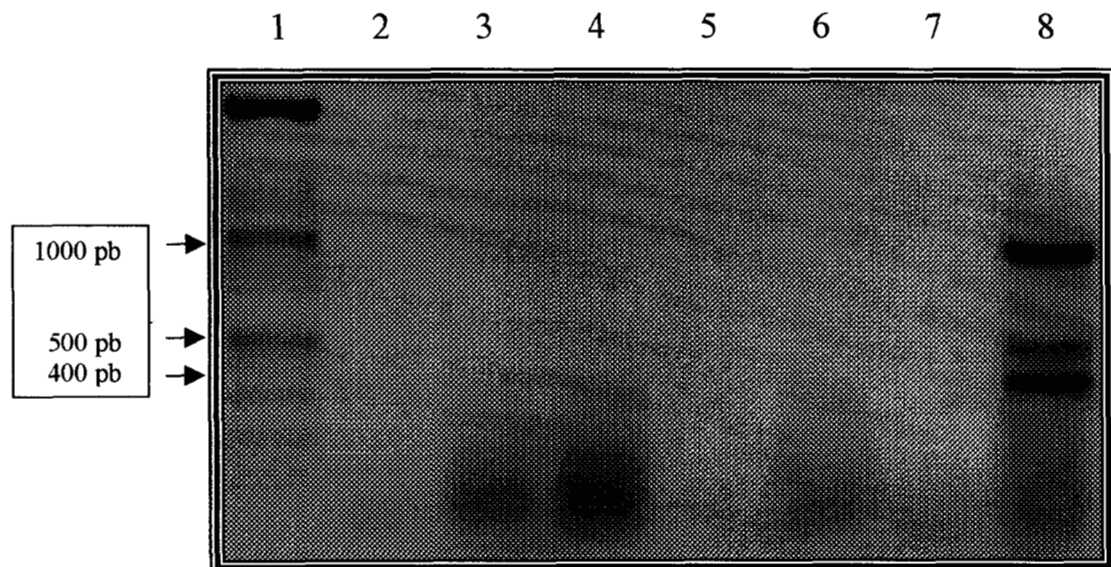


Figura 7. 1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 26, 4.-Paciente 27, 5.-Paciente 28, 6.-Paciente 30, 7.-Piel normal, 8.-Control positivo.

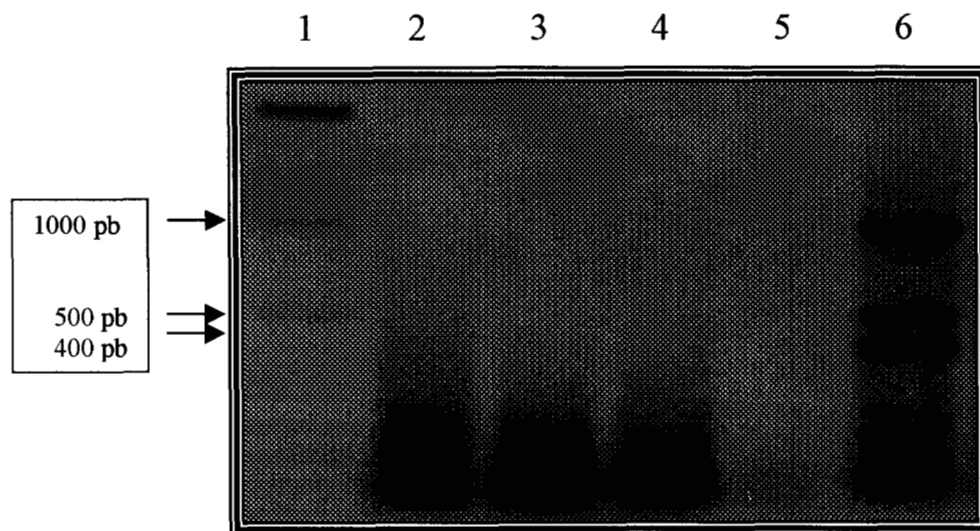


Figura 8. 1.-Marcadores moleculares, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 21, 4.-Paciente 29, 5.-Piel normal, 6.-Control positivo.

Figuras 7 y 8. Amplificación simultánea de tres genes de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de 6 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. 10 μ L del DNA aislado de las biopsias fueron sometidos a la prueba de PCR múltiple, no se observaron productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en ninguna de ellas. El DNA control presentó las tres bandas de amplificación correspondientes a *M. tuberculosis*.

De las 34 muestras, 30 correspondientes a pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea y 4 a biopsias de piel normal, no mostraron bandas visibles de productos de amplificación en los análisis electroforéticos, por lo que fueron sometidos a la prueba de PCR anidada. Los resultados de los controles positivos y negativos del sistema fueron satisfactorios.

4.- Detección especie-específica de *M. tuberculosis* mediante PCR anidada.

Este sistema fue aplicado a los 34 productos de PCR del DNA aislado de las biopsias de piel. Los resultados pueden observarse en las **Figuras 9 a 13**. En los pacientes 1, 2, 5, 8 y 9 (**Fig. 9A**, carriles 3,4,5 y 7, y **Fig. 9B**, carril 2) se observó una banda de amplificación de 223 pb, correspondiente a la secuencia interna del gen mtp40 de *M.tuberculosis*. En el paciente 7, (carril 6), no se observó la banda del producto amplificado, por lo que se procedió a hacer una doble PCR de éste.

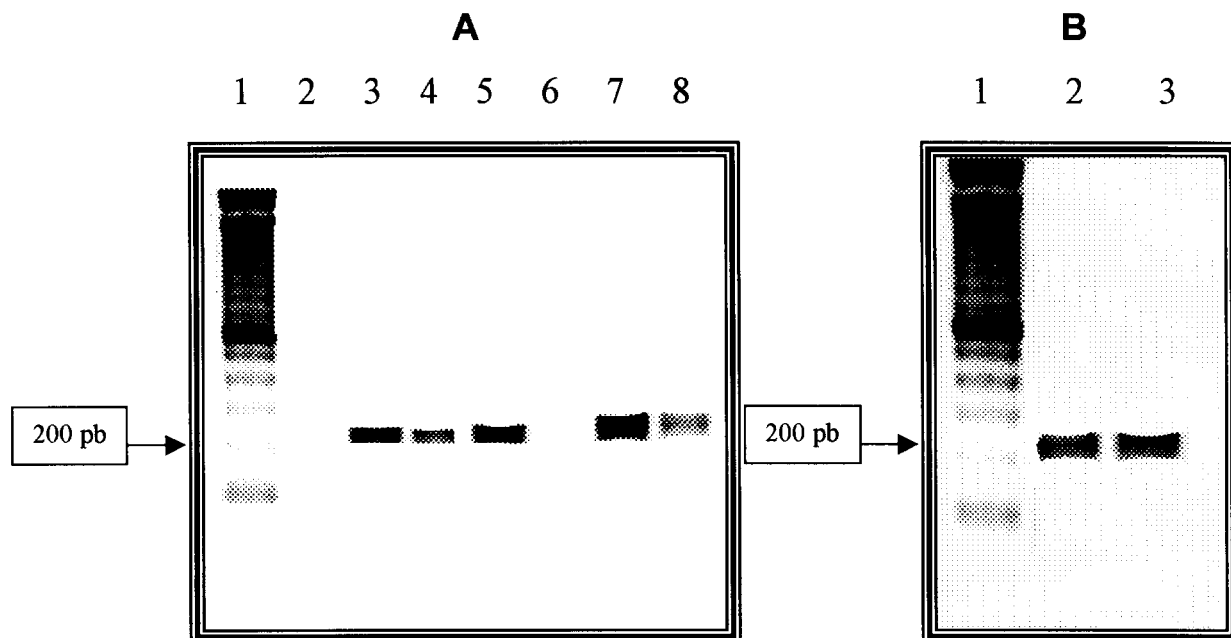


Figura 9. Amplificación especie específica del gen mtp 40 de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de 6 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea.

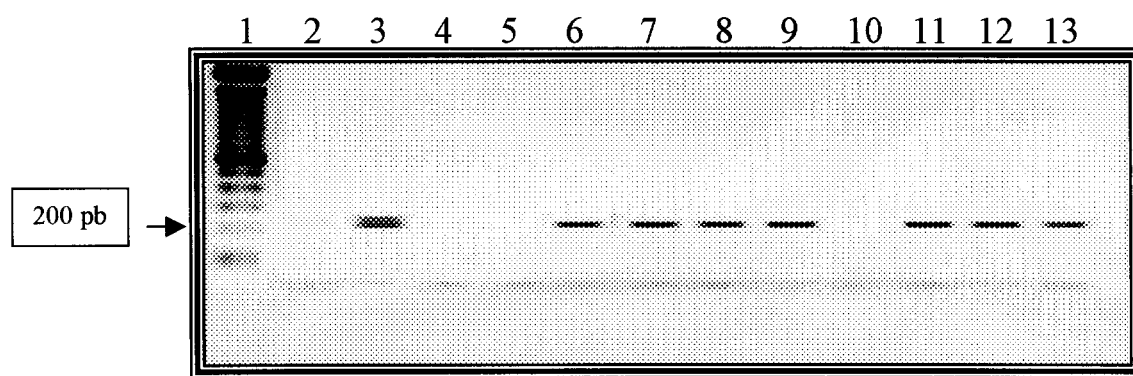
A 10 µL de los productos de PCR múltiple de los pacientes 1,2,5,7,8 y 9, se les aplicó una prueba de PCR anidada utilizando un fragmento interno del gen mtp40, se observó una banda de 223 pb correspondiente a *M. tuberculosis* en 5 de los pacientes y en el control positivo.

A. 1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 1, 4.-Paciente 2, 5.-Paciente 5, 6.-Paciente 7, 7.-Paciente 8, 8.-Control positivo.

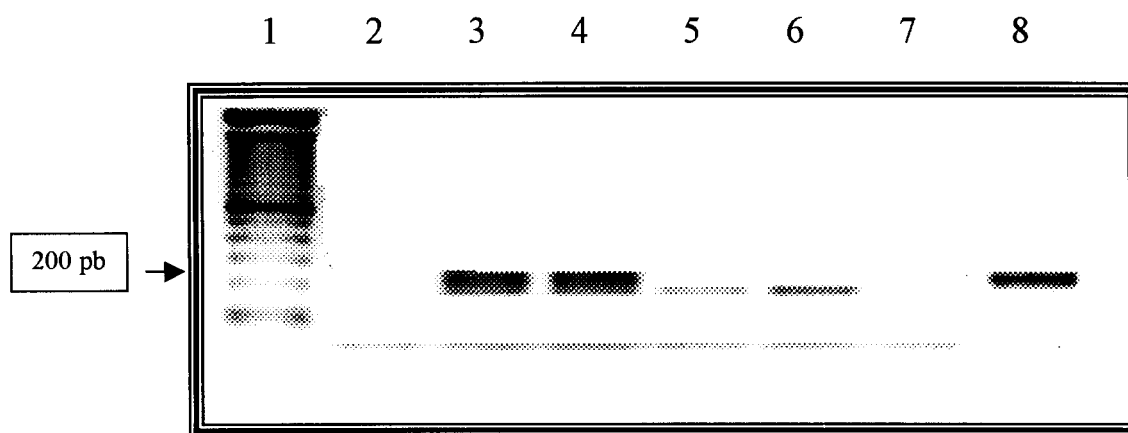
B. 1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Paciente 9, 3.-Control positivo.

Así también, de los pacientes 11, 17, 19, 20, 3, 4 y 6, (**Fig.10A** , carriles 3,6,7,8,11,12 y 13) y de los pacientes 14, 15, 16 y 18 (**Fig. 10B**, carriles 3 a 6), pudo observarse la banda de amplificación correspondiente a la secuencia interna del gen *mtp40* de *M. tuberculosis*, sin embargo en los pacientes 12, 13 y 10, ésta no se detectó (Fig. 10A, carriles 4 y 5, Fig. 10B, carril 2) y fue necesario llevar a cabo la doble PCR múltiple.

En la muestra de biopsia de piel normal (control 1), no se observó la banda de amplificación (carril 7 de la Fig. 10B). De los controles incluidos en el sistema, no se tuvieron resultados falsos positivos o falsos negativos. (Carriles 2 y 9 de la Fig. 10A y 8 de la Fig. 10B).



A. 1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 11, 4.-Paciente 12, 5.-Paciente 13, 6.-Paciente 17, 7.-Paciente 19, 8.-Paciente 20, 9.-Control positivo, 10.-Control negativo, 11.-Paciente 3, 12.-Paciente 4, 13.-Paciente 6.



B. 1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Paciente 10, 3.-Paciente 14, 4.-Paciente 15, 5.-Paciente 16, 6.-Paciente 18, 7.-Piel normal, 8.-Control positivo.

Figura 10. Amplificación especie-específica del gen *mtp40* de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de 14 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. A 10 uL de los productos de PCR múltiple, de los pacientes 3,4,6 y 10 a 20, se les aplicó una prueba de PCR anidada utilizando un fragmento interno del gen *mtp40*, se observó una banda de amplificación de 223 pb, correspondiente a *M.tuberculosis*, en 11 de los pacientes y en el control positivo.

En la **Figura 11** se observa una banda de amplificación de 223 pb correspondiente a *M.tuberculosis* en las muestras de los pacientes 22, 23 y 25 (carriles 3,4 y 6) y en el control positivo del sistema (carril 8). La muestra del paciente 24 fue negativa, aún cuando se trata de una tuberculosis cutánea verrugosa, considerada dentro de las habitadas o verdaderas (carril 5). Así también, el control de piel normal (carril 7) y el control negativo del sistema (carril 2) fueron negativos.

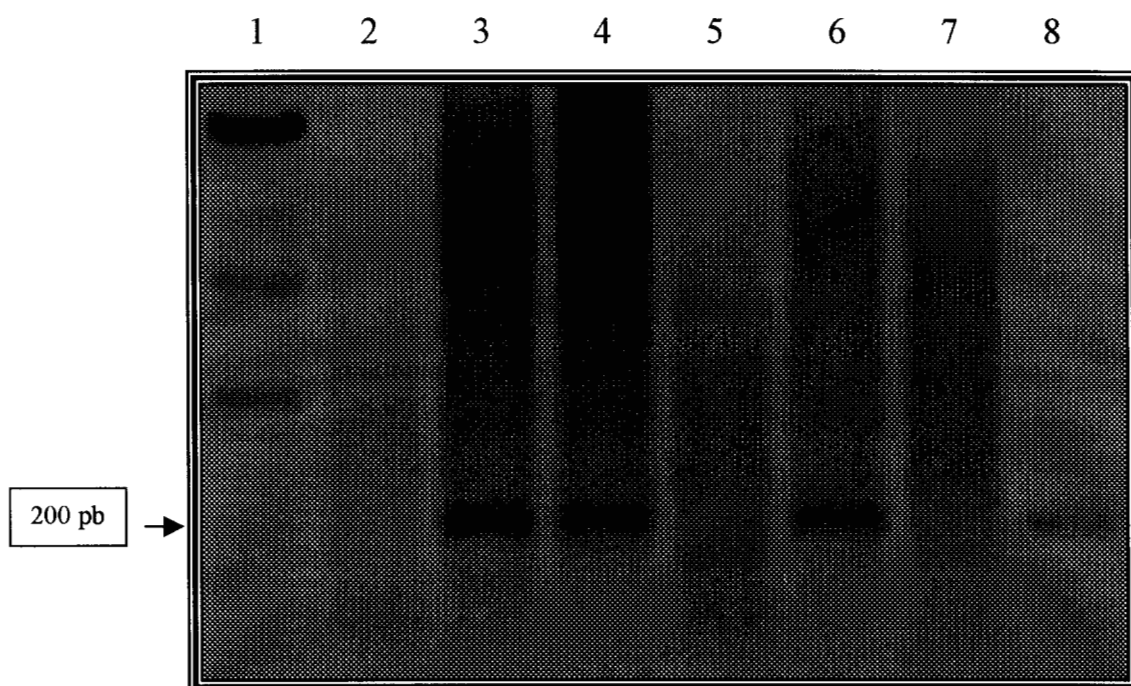


Figura 11. Amplificación especie-específica del gen mtp40 de *M.tuberculosis* de biopsias de piel de 4 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. A 10 μ L de los productos de PCR múltiple, de los pacientes 22,23,24 y 25, se les aplicó la prueba de PCR anidada para amplificar un fragmento interno del gen mtp40 de *M. tuberculosis*, observándose la banda correspondiente de 223 pb en 3 de los pacientes y en el control positivo.

1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 22, 4.-Paciente 23, 5.-Paciente 24, 6.-Paciente 25, 7.-Piel normal, 8.-Control positivo.

De la misma forma, en la **Figura 12** se observa que las muestras de los pacientes 26, 27 y 30, presentaron la banda de amplificación que identifica a *M.tuberculosis* (carriles 3,4 y 6), así como también el control positivo del sistema (carril 8). La muestra del paciente 28 no presentó ninguna banda de amplificación (carril 5), ni

el control de piel normal y ni el control negativo del sistema (carriles 7 y 2 respectivamente).

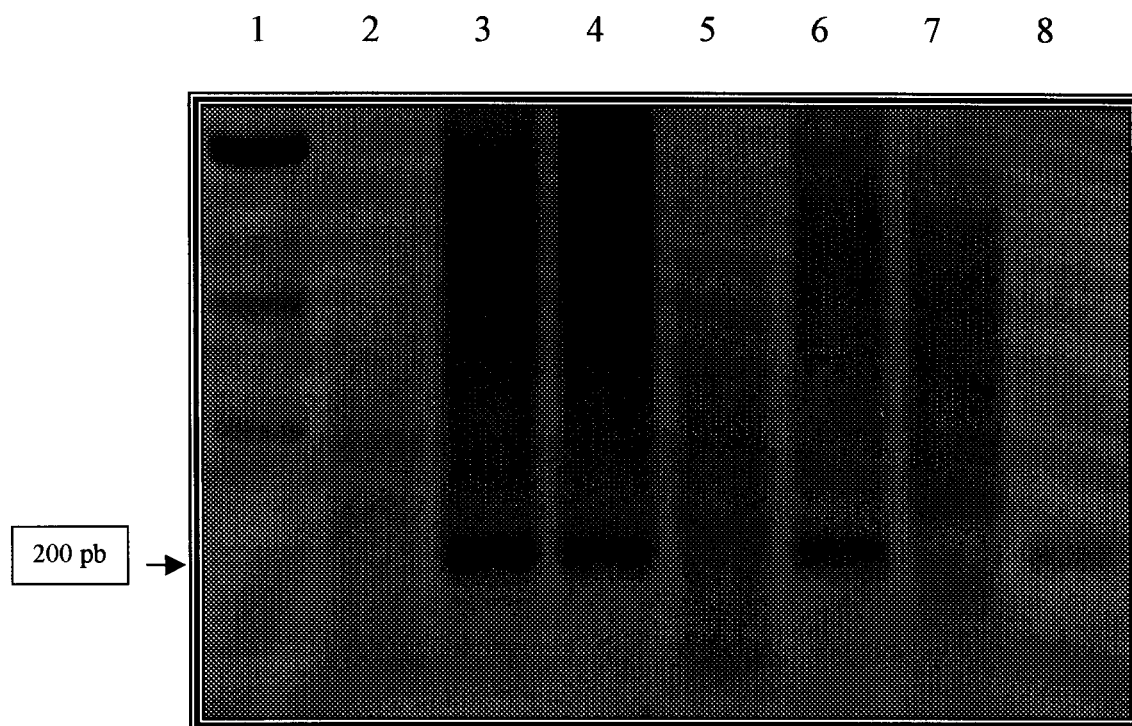


Figura 12. Amplificación especie-específica del gen mtp40 de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de 4 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. A 10 μ L de los productos de PCR múltiple, de los pacientes 26,27,28 y 30, se les aplicó una prueba de PCR anidada para amplificar un fragmento interno del gen mtp40 de *M.tuberculosis*, observándose la banda correspondiente de 223 pb en 3 de los pacientes y en el control positivo.

1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 26, 4.-Paciente 27, 5.-Paciente 28, 6.-Paciente 30, 7.-Piel normal, 8.-Control positivo.

Las muestras de los pacientes 21 y 29, correspondientes a tuberculosis nodular profunda y verrugosa respectivamente (Tabla V), presentaron la banda de amplificación que identifica a *M. tuberculosis* (carriles 3 y 4 de la **Fig. 13**). Así también el control positivo del sistema (carril 6) presentó la misma banda de amplificación. El control negativo y la biopsia de piel normal no mostraron ninguna banda de amplificación (carriles 2 y 5 de la misma figura).

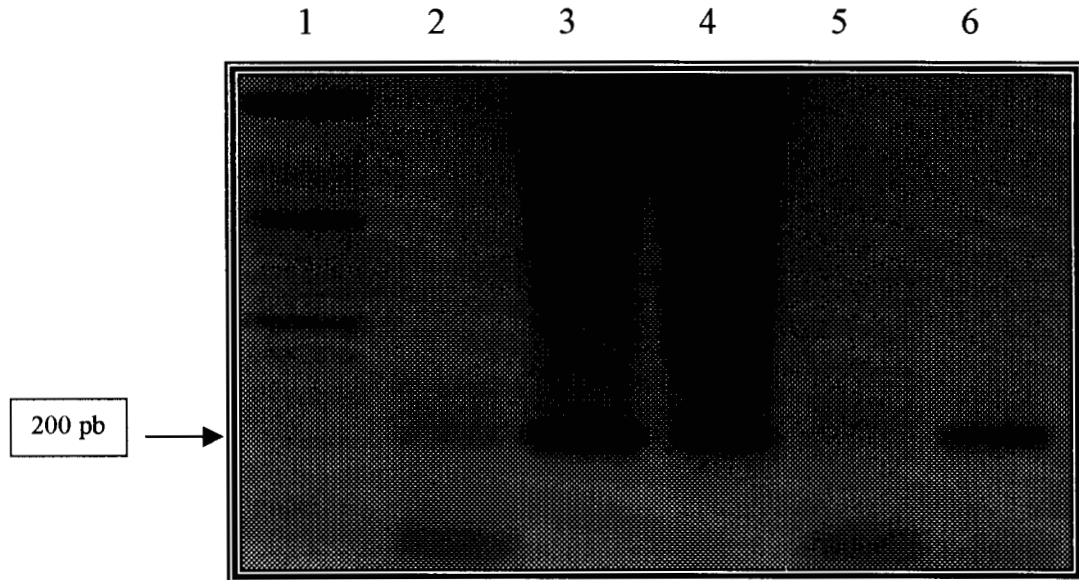


Figura 13. Amplificación especie-específica del gen mtp40 de *M. tuberculosis* de biopsias de piel de 2 pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea. 10 μ L de los productos de PCR múltiple de los pacientes 21 y 29, fueron sometidos a una prueba de PCR anidada para amplificar un fragmento interno del gen mtp40 de *M. tuberculosis*. Se observó la banda correspondiente de 223 pb en los dos pacientes y en el control positivo.

1.-Marcadores moleculares, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 21, 4.-Paciente 29, 5.-Piel normal, 6.-Control positivo.

De las 30 muestras de los pacientes con diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis cutánea, probadas por el sistema de PCR múltiple, ninguna mostró las bandas de amplificación correspondientes a *Mycobacterium*. Sin embargo, los productos de amplificación de 16 de los 18 casos de tuberculosis diseminada o “**tuberculides**” (88.9 %) y 8 de los 12 casos de tuberculosis fija o habitada (66.7 %), mostraron la banda de 223 pb correspondiente al fragmento interno de amplificación del gen mtp40 de *M. tuberculosis*, cuando fueron sometidas a la prueba de PCR anidada, estos resultados pueden observarse en la **Tabla X**.

De los 18 pacientes con diagnóstico clinicopatológico de “**tuberculides**”, 10 correspondían a tuberculosis nodular profunda, 7 a tuberculosis micronodular y uno a

nódulo necrótica y la identificación de *M. tuberculosis* por PCR anidada fue de 80 %, 100 % y 100 % respectivamente (Tabla X). Así también, de los 12 casos de tuberculosis cutánea fija, incluidos en este estudio, 5 tuvieron diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis verrugosa, 2 luposa y 5 colicuativa y la identificación de *M. tuberculosis* por PCR anidada fue de 80 %, 100 % y 40 % respectivamente (Tabla X).

Tabla X. Detección de DNA especie-específico de *M. tuberculosis* en 30 muestras de biopsia de pacientes con diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis cutánea, estudiadas por PCR múltiple y PCR anidada.

Diagnóstico clinicopatológico (casos)	PCR (+)	PCR anidada		
		(+)	(-)	% (+)

Formas Diseminadas (n=18)

Nodular profunda	(10)	0	8	2	80
Micronodular	(7)	0	7	0	100
Nódulo necrótica	(1)	0	1	0	100
		16	2	88.9	

Formas fijas (n=12)

Verrugosa	(5)	0	4	1	80
Luposa	(2)	0	2	0	100
Colicuativa	(5)	0	2	3	40
		8	4	66.7	
TOTAL	(30)	0	24	6	80

5. Doble PCR múltiple.

Considerando que las muestras de los 6 pacientes con diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis cutánea que fueron negativas para la prueba de PCR anidada, podrían contener un número pequeño de otras micobacterias, diferentes a *M.tuberculosis*, se procedió a aplicar una doble PCR múltiple, los resultados pueden observarse en la **Figura 14**, todos ellos nuevamente fueron negativos, lo que nos

demuestra que los trastornos en la piel no fueron causados por ninguna otra micobacteria o bien, que estuvieron presentes en número tan pequeño que no fueron detectadas por ésta nueva PCR múltiple, sería conveniente hacer una PCR anidada género específica y una PCR anidada para el complejo *M. tuberculosis*.

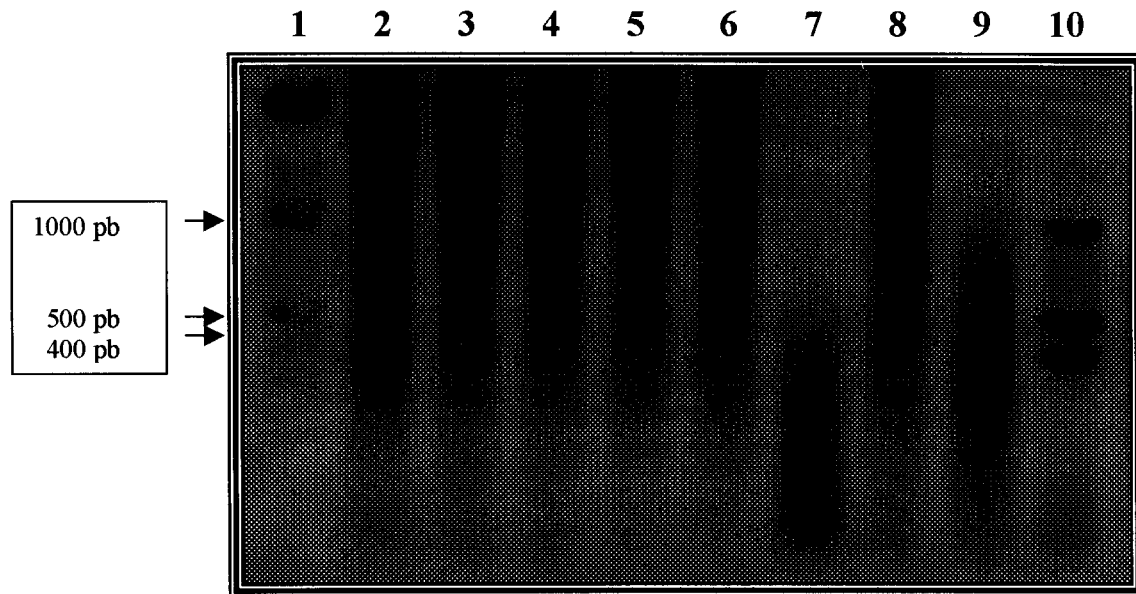


Figura 14. Búsqueda de micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* en biopsias de piel de pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea y pruebas de PCR múltiple y anidada negativas para *M. tuberculosis*. 10 μ L de los productos de PCR múltiple fueron utilizados como plantilla para una nueva PCR múltiple, observándose amplificación únicamente en el control positivo.

1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.- Paciente 7, 4.-Paciente 10, 5.-Paciente 12, 6.-Paciente 13, 7.-Paciente 24, 8.-Paciente 28, 9.-Piel normal, 10.-Control positivo.

6. Detección del gen de la β -actina.

En relación a los resultados obtenidos cuando se estudió el gen de la β -actina, del DNA extraído de los 6 pacientes en los que no se detectaron los genes para *Mycobacterium* por PCR múltiple o PCR anidada, pueden observarse en la **Figura 15**. En ninguno de ellos se detectó la banda de amplificación de 548 pb que corresponde al fragmento esperado de la β -actina. Cuando este fragmento se buscó en el DNA aislado de los pacientes 21 y 29, mismos en los que se detectaron los genes que identifican a

M. tuberculosis, de igual forma no fue posible detectarlo, por lo cual no puede decirse que en los 6 pacientes negativos para *M. tuberculosis*, hubiese falta de integridad del DNA. El control positivo en este caso fue el DNA aislado de la línea celular U937 (Monocitos humanos), el cual presentó la banda de amplificación de 548pb correspondiente al fragmento seleccionado del gen de la β -actina. El control negativo del sistema consistió de la mezcla de reactivos sin plantilla de DNA y fue satisfactorio.

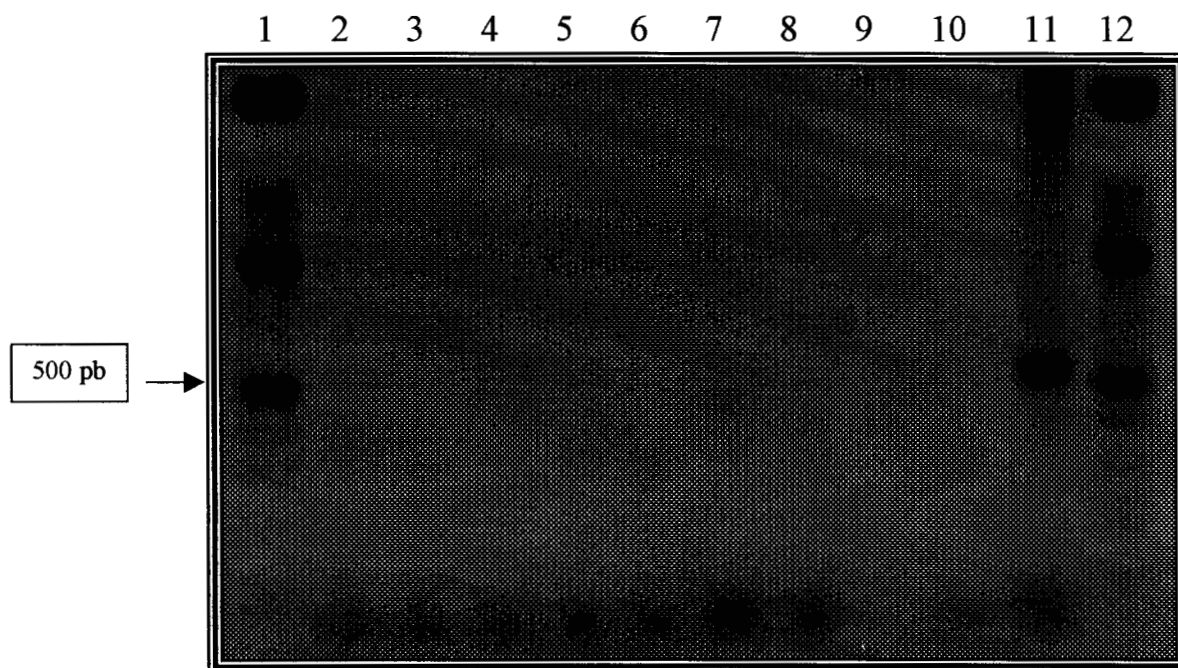


Figura 15. Evaluación de la integridad del DNA de biopsias de piel de pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis cutánea y pruebas de PCR múltiple y anidada negativas para *M.tuberculosis*. A 10 μ L del DNA aislado de los 6 pacientes con PCR anidada negativa se les aplicó una prueba de PCR para detección del gen de la β -actina, de forma simultánea se analizaron las muestras de DNA de dos pacientes con prueba de PCR anidada positiva para *M. tuberculosis*. Observándose únicamente amplificación en el control positivo que correspondió al DNA aislado de la línea celular U937.

1.-Marcadores moleculares de 100 pb, 2.-Control negativo, 3.-Paciente 7, 4.-Paciente 10, 5.- Paciente 12, 6.-Paciente 13, 7.-Paciente 24, 8.- Paciente 28, 9.-Paciente 21, 10.-Paciente 29, 11.-Control positivo, 12.-Marcadores moleculares de 100 pb.

7. Análisis estadístico.

Para conocer la correlación existente entre el diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis cutánea y la detección del DNA de *M. tuberculosis* en las biopsias de piel,

se determinó el Coeficiente de Contingencia “C” para los casos de tuberculosis cutánea diseminada y fija, encontrando que este coeficiente fue de 0.7 para las formas diseminadas y de 0.47 para las formas fijas.

IX. DISCUSIÓN.

La PCR usada en este estudio permitió la amplificación simultánea del gen *mtp40* especie-específico, del elemento de inserción IS 6110 y del gen del antígeno alfa, por lo que en una sola determinación puede identificarse a *M. tuberculosis* y distinguirse de *M. bovis* y de otras micobacterias no tuberculosas. Con este sistema se asegura poder detectar aquellas micobacterias que carecen en su genoma del elemento de inserción IS 6110²⁵, ya que podrían detectarse los fragmentos de DNA del gen *mtp40* especie-específico y del gen del antígeno alfa²⁷.

A través de este sistema se esperaba obtener cualquier micobacteria que estuviese en las muestras de biopsia, sin embargo fue necesario utilizar adicionalmente un sistema de PCR anidada, el cual permitió incrementar la sensibilidad especie-específica, lográndose identificar a *M. tuberculosis* en el 80 % de las muestras incluidas en el estudio (Tabla X). El incremento en la sensibilidad del sistema PCR múltiple mediante la PCR anidada fue indispensable, considerando que en las muestras de biopsia los bacilos podían ser muy escasos o no encontrarse, de acuerdo con lo publicado por algunos autores^{2,11-13,15,34-38}. Así también, se consideró que los tejidos embebidos en parafina pueden disminuir la eficacia de la PCR, dependiendo de varios factores, entre ellos el tiempo de conservación y el fijador empleado^{39,40}.

El límite de detección en este estudio para el sistema PCR-múltiple fue de 100 pg de DNA, a diferencia de 1 pg encontrado por Del Portillo et al.²³. Para el sistema PCR anidada la sensibilidad se incrementó a 10 fg de DNA de *M.tuberculosis*, dato no publicado anteriormente, lo que correspondería a 2 micobacterias¹⁶.

Dos de los casos de tuberculosis nodular profunda, o eritema indurado de Bazin, no fueron corroborados mediante el sistema PCR anidada (casos 10 y 28), lo que

puede atribuirse a la presencia de inhibidores no detectados por la amplificación del control, o a una distribución no homogénea de bacterias en la muestra, de tal forma que la fracción probada podría no haber contenido micobacterias, o bien, que probablemente estos casos correspondían a un diagnóstico diferente de tuberculosis, como podría ser un eritema nudoso. La tuberculosis nodular profunda, o eritema indurado de Bazin, es la **“tuberculide”** más frecuentemente presentada en México y otros países^{13,15} y puede confundirse con otros procesos patológicos que causan un cuadro similar^{13,15,38}.

Ocasionalmente la tuberculosis nodular profunda se ha designado como una causa de vasculitis nodular de la parte inferior de las piernas. Sin embargo en este estudio aplicando PCR múltiple y PCR anidada se identificó el DNA de *M. tuberculosis* en 8 de los 10 casos (80 % de positividad) con lo que se demuestra la estrecha relación entre *M. tuberculosis* y las lesiones de la piel.

En las **“tuberculides”**, el aislamiento y cultivo de *M. tuberculosis*, generalmente no es posible y se considera que aún cuando el bacilo esté presente en las lesiones, pudo haber sido destruido por la respuesta inmune del hospedero, por ello su origen tuberculoso ha permanecido en controversia^{12,38}. En este estudio, la detección de DNA micobacteriano sugiere la presencia de micobacterias que están estructuralmente intactas, ya que el DNA libre estaría sujeto a una degradación enzimática muy rápida. Se considera que las micobacterias no pueden detectarse en las **“tuberculides”** mediante cultivo, porque probablemente son muy pocas o incapaces de crecer, sin embargo es posible detectarlas mediante la prueba de PCR anidada utilizada en este estudio. Con estos resultados se proporciona la evidencia molecular de una asociación directa entre la tuberculosis cutánea y las lesiones nodulares crónicas, denominadas **“tuberculides”**, con lo que puede sustentarse adecuadamente el frecuente debate que ha existido durante mas de 100 años^{13,38,41-43}, con respecto a su origen.

En el estudio de Margall y col.³⁶ se incluyeron diferentes variedades histopatológicas de tuberculosis cutánea y mediante PCR se detectó el complejo micobacteriano en el 77% de las muestras estudiadas. En dicho estudio solo el 10 %

de las muestras correspondieron a casos de “**tuberculides**”. En nuestro estudio se obtuvo el 80 % de resultados positivos, (Tabla X), aún cuando el mayor número de casos (60 %), (Tabla VII), fueron de “**tuberculides**”, que son las que presentan mayor grado de dificultad para su diagnóstico y en las que generalmente no se encuentra el agente causal^{11-13,35-37,48}.

En el trabajo realizado por Degitz et al.³⁸, se demostró la presencia del DNA del complejo *M.tuberculosis* en 5 de 7 pacientes con eritema indurado de Bazin y en 4 de 6 pacientes con tuberculide nodulonecrótica, con PCR de muestras de piel embebidas en parafina y análisis de Southern blot, con oligonucleótidos internos que les permitieron diferenciar entre el DNA del complejo micobacterium y el DNA de micobacterias atípicas. Estos resultados apoyan nuestro estudio, aún cuando dichos autores solo detectan DNA micobacteriano del complejo *M. tuberculosis*. Así también, el estudio realizado por Schneider et al.¹², en el que identifican el DNA del complejo *M.tuberculosis*, en 5 de 20 pacientes con eritema indurado de Bazin, apoya nuestros resultados obtenidos con PCR anidada, ya que dichos autores tuvieron que hacer una doble PCR para detectar 4 de los 5 casos positivos.

En este estudio, en 3 de los 5 casos de tuberculosis colicuvativa no fue corroborado el diagnóstico por el sistema de detección implantado, aún cuando este tipo de tuberculosis es de las consideradas como típicas, habitadas o verdaderas^{1,2,11}. Habitualmente este tipo de tuberculosis es secundaria a tuberculosis en ganglios, huesos y articulaciones, ocasionalmente llega a la piel por vía sistémica o linfática. Dadas las características de ésta (Tabla II) y la alta sensibilidad de la PCR anidada, se considera que el DNA de *M.tuberculosis* en dichas muestras, no estaba presente en el sitio de las lesiones por lo que no se detectó. Uno de los casos, paciente 12, presentó un nódulo ulcerado en la mandíbula derecha, que probablemente correspondió a una fístula odontogénica y no a una tuberculosis colicuvativa. Los otros dos casos, pacientes 7 y 13, presentaron lesiones características de tuberculosis colicuvativa, sin embargo el DNA micobacteriano no se detectó. Se ha publicado que la velocidad de recuperación del DNA intacto puede estar influenciada por diferentes variables, tales como: el tipo de tejido, la autólisis o necrosis del mismo, el contenido de nucleasas y la densidad

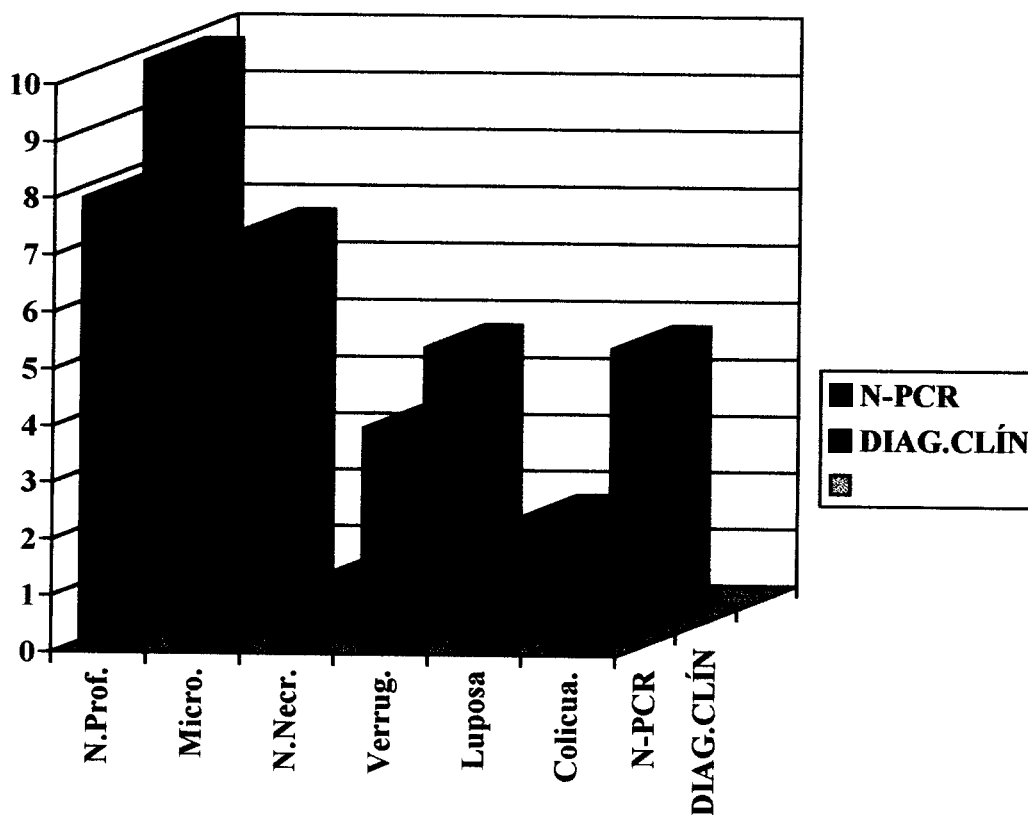
estromal^{36,39,40}, dichas variables probablemente influyeron en los resultados de este estudio.

Esto mismo pudo haber ocurrido en el caso del paciente 24 con diagnóstico clinicopatológico de tuberculosis verrugosa en el que no se demostró la presencia del DNA mcobacteriano. Así la detección del DNA de *M.tuberculosis* en la tuberculosis cutánea fija fue del 66.7 %, contrario a lo esperado, pero que coincide con lo publicado por Degitz et al.³⁸ en un estudio en el que detectaron el DNA del complejo *M.tuberculosis* en el 53 % de las muestras clínicas embebidas en parafina, de casos diagnosticados como lupus vulgaris.

X. CONCLUSIONES.

1. La tuberculosis cutánea diseminada esta íntimamente relacionada con *M.tuberculosis*, por lo que no debe denominarse a esta forma clínica como “**tuberculides**”.
2. La utilización de la PCR puede ayudar a la detección de la tuberculosis cutánea diseminada y fija, sobre todo utilizando la combinación PCR múltiple y anidada, en la que se incorporan los oligonucleótidos iniciadores especie-específicos.
3. La correlación encontrada mediante el coeficiente de contingencia entre el diagnóstico clinicopatológico y la PCR anidada fue de 0.7 para la tuberculosis cutánea diseminada y de 0.47 para el caso de tuberculosis cutánea fija. (**Gráfica 2**). Esto nos indica que en la tuberculosis diseminada el método de diagnóstico molecular es muy confiable y no así en el caso de la tuberculosis cutánea fija, el cual aún debe estudiarse.

Gráfica 2. Diagnóstico Clinicopatológico de Tuberculosis Cutánea y Detección de *M. tuberculosis* por PCR Anidada.



Formas Diseminadas// Formas Fijas

Representación gráfica de los 30 casos de tuberculosis cutánea incluidos en el estudio, comparando el diagnóstico clinicopatológico con la detección de *M. tuberculosis* por PCR anidada en las diferentes formas clínicas.

XI. BIBLIOGRAFIA.

1. Fariña M. del C, Gegundez I, Piqué E, Esteban J, Martín L, Requena L, et al. Cutaneous tuberculosis : A clinical, histopathologic, and bacteriologic study. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:433-40.
2. Rodríguez O. Tuberculosis cutánea. *Revista del Centro Dermatológico Pascua* 1993; 2:53-64.
3. Musser MJ. Progress in the War on Tuberculosis: Advances on the Antibiotic Resistance Front. In: Phillip J. Baker, Ph.D., (Ed) Annual Report. The Jordan Report. Accelerated Development of Vaccines 1996. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland. p. 49-55.
4. Consejo Asesor en Epidemiología. 1990. México: Información prioritaria en Salu. México, D.F., SSA.
5. Shinnick, TM. 1996. 215 Current Topics in Microbiology and Immunology. In: T.M. Shinnick (Ed.) **Tuberculosis**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlín, Germany.
6. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. *Sistema Único de Información*. 1998;1:4
7. Huebner RE and Castro KG. The changing face of tuberculosis. *Annu Rev Med* 1995;46:47-55.
8. Amézquita MR. Tuberculosis Cutánea. Aspectos Clínicos y Epidemiológicos en México. *Tesis de Licenciatura de Médico Cirujano*. Universidad Autónoma de México, 1963.
9. Parra GM. Tuberculosis Cutánea. Estadística 1964-1981. *Tesis de Posgrado en Dermatología, Leprología y Micología*. Centro Dermatológico Pascua. Universidad Nacional Autónoma de México, 1982.
10. Escalona E. y Estrada C. Tuberculosis Cutánea en México. *Rev. El Médico*. 1992.
11. Amado S. Dermatitis Bacterianas. En: Méndez Editores, editores. Lecciones de Dermatología. Méndez Editores, S.A. de C.V. México, D. F; 1996. p.72-85.
12. Schneider JW, Geiger DH, Rossouw DJ, Jordaan HF, Victor T and van Helden PD. *Mycobacterium tuberculosis* DNA in erythema induratum of Bazin. *Lancet* 1993;342: 747-8

13. Cho KH, Lee DY, Chun HS, Eun HCh and Han SK. Erythema induratum with pulmonary tuberculosis: Report of three cases. *J Dermatol* 1995;22:143-8.
14. Held JL, Kohn SR, Silvers DN, Grossman ME. Papulonecrotic tuberculid. *NY State J Med* 1988;449-501.
15. Rodríguez, O. Tuberculosis diseminadas. *Revista del Centro Dermatológico Pascua* 1994;3:614.
16. Hermans PWM, Schuitema ARJ, Soolingen DV, Verstynen CPHJ, Bik EM, Thole JER, et al. Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:1204-13.
17. Brisson-Nöel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991;338:364-6.
18. Saboor SA, Johnson NM, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet*. 1992;339:1012-15.
19. Sritharan V, Iralu VJ and Barker RH. Comparison of genus and species-specific probes for PCR detection of mycobacterial infections. *Mol. Cell Probes* 1994;8:409-16.
20. Afghani, B. and Stutman HR. Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of *M. tuberculosis*: Comparison of Simple Boiling and a Conventional Method for DNA Extraction. *Biochem Mol Med* 1996;57:14-8.
21. Hashimoto A, Koga H, Kohno S, Miyazaki Y, Kaku M and Hara K. Rapid Detection and Identification of Mycobacteria by Combined Method of Polymerase Chain Reaction and Hybridization Protection Assay. *J Infect* 1996;33:71-7.
22. Neimark H, Baig MA, and Carleton S. Direct Identification and Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34:2454-59.
23. Del portillo P, Murillo LA and Patarrollo ME. Amplification of a Species-Specific DNA Fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and Its Possible Use in Diagnosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2163-68.
24. Herrera EA and Segovia M. Evaluation of *mtp40* Genomic Fragment Amplification for Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:1108-13.

25. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Clave MD and Eisenach KD. Specificity of IS6110-Based Amplification Assays for *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Clin Microbiol* 1996;34:2843-46.
26. Gori A, Franzetti F, Marchetti G, Catozzi L and Carbellino M. Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by *mtp40* Nested PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34:2866-7.
27. Del Portillo P, Thomas MC, Martínez E, Marañón C, Valladares B, Patarollo ME and López MC. Multiprimer PCR System for Differential Identification of Mycobacteria in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 1996;34:324-8.
28. Kox LFF, Jansen HM, Kuijper S and Kolk AHJ. Multiplex PCR Assay for Immediate Identification of the Infecting Species in Patients with Mycobacterial Disease. *J Clin Microbiol* 1997;35:1492-98.
29. Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frébault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D and Gicquel B. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol*. 1989;3:843-9.
30. Brison-Noël A, Gicquel B, Lecossier D, Lévy-Frébault V, Nassif X and Hance AJ. Rapid Diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989;2:1069-71.
31. Pao CC, Yen TSB, You J-B, Maa JS, Fiss EH, Chang C-H. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1877-80.
32. De Wit D, Steyn L, Shoemaker S and Sogin M. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990;28:2437-41.
33. Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhargava A, Saluja S and Shriniwas. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 1991;72:21-7.
34. Serfling U, Penneys NS and Leonardi CL. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a case of lupus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1993;28: 318-22.
35. Steidl M, Neubert U, Volkenandt M, Chatelain R and Degitz K. Lupus vulgaris confirmed by polymerase-chain reaction. *B J Dermatol* 1993. 129:314 -18.

36. Margall N, Baselga E, Coll P, Barnadas MA, de Morgas JM and Prats G. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA by the polymerase chain reaction for rapid diagnosis of cutaneous tuberculosis. *B J Dermatol* 1996;135:231-6.
37. Penneys NS, Leonardi CL, Cook S, Blauvelt A, Rosenberg S, Eells LD, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in five different types of cutaneous lesions by polymerase chain reaction. *Arch Dermatol* 1993;129:1594-8.
38. Degitz K, Steidl M, Thomas P, Plewig G and Volkenandt M. Aetiology of tuberculids. *Lancet* 1993;341:239-40.
39. Shibata D, Martin WJ and Arnheim N. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: A bridge between Molecular Biology and Classical Histology. *Cancer Research* 1988;48: 4564-6.
40. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N and Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase. *J Histochem and Cytochem* 1991;39:351-4.
41. Ollert MW, Thomas P, Korting HC, Schraut W, Braun-Falco O. Erythema Induratum of Bazin. Evidence of T-lymphocyte hyperresponsiveness to purified protein derivative of tuberculin: Report of two cases and treatment. *Arch Dermatol* 1993;129:469-73.
42. Kuramoto Y, Aiba S and Tagami H. Erythema induratum of Bazin as a type of tuberculid. *J Am. Acad Dermatol* 1990;22:612-6.
43. Degitz K. Detection of mycobacterial DNA in the skin. Etiologic Insights and diagnostic perspectives. *Arch Dermatol* 1996;132:71-5.
44. Volkenandt MA, Dicker R, Fanin D, Banerjee A, Albino and Bertino J. Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from paraffin-embedded Tissue. In: White BA, editors. *Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*. Human Press Inc., Totowa, NJ; 1993. p.81-88.
45. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and Proteins from cell and tissue sample. *BioTechniques* 1993;15:532-6.
46. Delidow B, Lynch J, Peluso J and White B. Polymerase Chain Reaction. In: Bruce White, editors. *Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Methods and Applications*. Human Press Inc., Totowa, NJ; 1993. p. 1-30.

47. Degitz K, Steidl M, Neubert U. Detection of mycobacterial DNA in paraffin-embedded specimens of lupus vulgaris by polymerase-chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1993; 285:168-70.
48. Butch AW, Chung GH, Hoffmann JW and Nahm MH. Cytokine Expression by Germinal Center Cells. *J.Immunol* 1993;150;39-47.

Apéndice 1.

M a t e r i a l.

1. Analizador de imágenes. IS1000. Digital Imaging System. Alpha Inotech Corporation.
2. Balanza analítica granataria. Mettler.
3. Baño Maria. FELISA
4. Centrífuga refrigerada. EBA 12R. Hettich. Mod. 1002-01.
5. Cámara horizontal para electroforesis en gel de agarosa. HORIZON 58. LIFE TECHNOLOGIES.
6. Destapador de tubos eppendorf.
7. Espátula de acero inoxidable.
8. Fuente de poder EPS 250. C.B.S. Scientific Company, Inc.
9. Gabinete de seguridad biológica. VECO. Serie E1911.
10. Mechero Bunsen.
11. Pipetas automáticas de volumen variable, de 0.2-2.0 uL, 5-40 uL, 40-200 uL, 200-1000 uL.
12. Platina de oscilación.
13. Puntas con filtro para micropipetas. De 10, 200 y 1000 uL.
14. Rotor Scientific Industries Inc. Multi-Purpose Rotator. Mod. 151.
15. Termociclador RoboCycler 40. Stratagene.
16. Termociclador PROGENE. TECHNE. Mod. FPROG05Y.
17. Tubos eppendor de 500 uL y 1500 uL.
18. Vortex. GENIE.

Apéndice 2.

Extracción del DNA de Tejido Embebido en Parafina.

Se cortaron 5 secciones de tejido embebido en parafina de 20 μ m de espesor, se colocaron dentro de un tubo eppendorf de 1.9 mL, evitando la contaminación cruzada, para lo cual se limpiaron las pinzas y la navaja del microtomo entre muestras.

Desparafinación de las muestras:

1. Se agregó 1 mL de xileno a cada tubo eppendorf conteniendo las muestras de biopsia, se agitó suavemente en vortex durante 10 seg y se incubó 10 min a temperatura ambiente sobre una placa oscilante.
2. El tejido se agrupó mediante centrifugación a 14 000 rpm durante 5 min. Cuidadosamente se removió el sobrenadante y se descartó. (Centrífuga Hettich EBA 12R)
3. Se repitió 1 y 2, dos veces más.
4. El botón se lavó agregando 1 mL de etanol absoluto e invirtiendo el tubo varias veces, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5'. El sobrenadante se removió cuidadosamente.
5. Se repitió el paso 4.
6. El botón se lavó con etanol al 75%, se invirtió varias veces y se agrupó el tejido por centrifugación a 14 000 rpm durante 5 min. Se removió el sobrenadante.
7. Las muestras de tejido se secaron mediante centrifugación al vacío. Para evitar contaminación cruzada se cubrieron los tubos con una película de papel adherente (parafilm) al que se le hicieron pequeños orificios.

Reconstitución de las muestras de tejido desparafinado y extracción del DNA.

1. El tejido se reconstituyó con 500 μ L de agua inyectable y se sometió a 70°C durante 30 min en baño María. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 min y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante.

2. Se digirió resuspendiendo el botón en 1 mL del reactivo TRIzol y homogeneizando durante 2 min en vortex. Se observó que siempre la muestra de tejido fuera menor o igual al 10% del volumen de TRIzol.
3. Las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Se agregaron 0.2 mL de cloroformo y los tubos se taparon herméticamente.
5. Se agitaron vigorosamente en vortex durante 1 min y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 min.
6. Los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C, la fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio, para aislar el RNA.
7. El DNA, que se encontraba en la fase orgánica, se precipitó con 0.3 mL de etanol absoluto.
8. Se mezcló por inversión y se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 min.
9. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min a 4°C y se removió cuidadosamente la fase acuosa (fenol-etanol).
10. El botón de DNA se lavó dos veces con 1 mL de solución de Citrato de Sodio 0.1 M en etanol al 10%, colocando los tubos en un rotor a 0.3 rpm durante 30 min a 4°C.
11. En cada lavado, se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min a 4°C y se removió el sobrenadante.
12. El DNA se secó completamente mediante centrifugación al vacío. (Equipo HETO-VAC)
13. El botón de DNA se lavó con 1.5 mL de alcohol al 75%, manteniéndolo en rotor durante 20 min a 4°C.
14. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min a 4°C y se decantó el sobrenadante.
15. El botón de DNA se secó durante 10 min mediante centrifugación al vacío.
16. Se disolvió en 50 µL de NaOH 8 mM.
17. El material insoluble se removió mediante centrifugación a 7 500 rpm durante 10 min a 4°C.
18. El sobrenadante, conteniendo el DNA, se transfirió a un tubo nuevo.
19. Se calentó en baño María a 55°C durante 20 min.
20. Se tomó una alícuota para hacer una dilución 1:100 y se leyó a 260/280 nm.
21. Se determinó la pureza y concentración de las muestras de DNA obtenidas.
22. El DNA se conservó a -70°C.

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADOS POR LA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD, DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA,
APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DIA 17 DE JULIO DE 1998.

PRESIDENTE



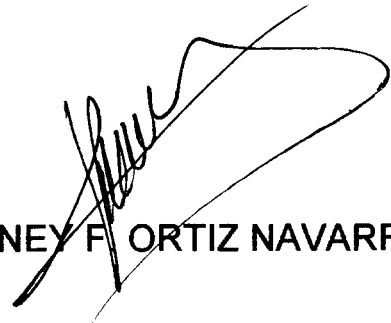
DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO.

VOCAL



DR. RUBEN D. MARTINEZ PEREZ.

SECRETARIO



DR. VIANEY F. ORTIZ NAVARRETE.