



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FRECUENCIA DE FUSION FAGOSOMA-LISOSOMA EN MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON INFECTADOS CON *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium bovis* BCG Y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P O R
JUAN MARIO HERNANDEZ NAVA**



**Asesores: MVZ Raymundo Iturbe R.
MVZ J. Raúl Vázquez M.**

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres.
A quienes debo todo lo que soy.

A mis hermanos: Juan, José.
Ricardo, Francisco. Laura y
Rosa Lila. Para que sigan
adelante.

A mis sobrinos: David, Ricardo.
Pepi, Jonathan y Valeria por su
inocencia.

A la familia Alvarez Ocampo.
Por la alegría y apoyo que
me han brindado.

A Ma. de Lourdes.
Por todo.

A mis asesores: MVZ Raymundo Iturbe R.
y MVZ J. Raúl Vázquez M. Por su cons-
tante apoyo y amistad.

A la Dra. Aurora Velazquez E.
Por sus enseñanzas y por brin-
darme la oportunidad de ser
miembro del Depto. de Virología
e Inmunología.

Al Dr. Carlos Vázquez P.
Por su desinteresada ayuda
en el desarrollo del modelo
estadístico de este trabajo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia. Con eterna gratitud.

A todos mis amigos.

Al Capitán America.

I've got you, I've got you, you'll never get away.

Walking home that night

The sack across my back, the sound of sobbing on my shoulder.

When suddenly it stopped,

I opened up the sack, all that I had

A pool of bubbles and tears-**JUST A POOL OF TEARS.**

All in all you are a very dying race

Placing trust upon a cruel world.

You never had the things you thought you should have had

And you'll not get them now,

And all the while in perfect time

Your tears are falling on the ground-

(Fragmento de la canción "Squonk", Génesis)

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	5
RESULTADOS	10
DISCUSION	14
LITERATURA CITADA	22

RESUMEN

HERNANDEZ NAVA JUAN MARIO. Frecuencia de Fusión Fagosoma-Lisosoma en -- Macrófagos Peritoneales de Ratón Infectados con Mycobacterium vaccae, -- Mycobacterium bovis BCG y Mycobacterium tuberculosis H37Rv. (bajo la dirección de: MVZ Raymundo Iturbe Ramírez y MVZ J. Raúl Vázquez Martínez).

Con el propósito de contribuir al estudio de la patogénesis de la tuberculosis, se determinó la Frecuencia de Fusión Fagolisosomal en - macrófagos peritoneales sin estimular, provenientes de ratones albinos - suizos en una infección sincronizada, empleando M. vaccae (cepa no patógena), M. bovis BCG (cepa atenuada) y M. tuberculosis H37Rv (cepa patógena). La observación de la fusión fagolisosomal se realizó mediante el - colorante fluorescente lisosomatrópico naranja de acridina; se observó - que el número de macrófagos que participaron en la fagocitosis varió de 25% a 80% y la capacidad fagocítica fué de 0.5 a 4.0 bacterias/macrófago dependiendo del microorganismo empleado. La frecuencia de fusión fagoli- sosomal para M. bovis y M. tuberculosis fué similar ($P > 0.01$), excepto a los primeros 15 minutos de la infección y para M. vaccae resultó una - frecuencia de fusión fagolisosomal más baja que las dos anteriores en to- dos los tiempos del experimento ($P < 0.01$). Se concluye que la capaci- dad de evadir la fusión fagolisosomal no es privativa de micobacterias - patógenas como el M. tuberculosis y posiblemente este implicado más de - un mecanismo para poder resistir la fagocitosis por parte del bacilo tu- berculoso pues en este trabajo se observó que M. vaccae fué el bacilo -- que más disminuyó la frecuencia de fusión fagolisosomal.

INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que tiende a la cronicidad y es provocada por cualquiera de las especies del bacilo tuberculoso (22,27,61). Las bacterias de este grupo que se asocian frecuentemente con la enfermedad son M. tuberculosis y M. bovis, tanto en humanos como en los animales, aunque existe también información acerca del potencial patógeno de otras micobacterias consideradas como diferentes del bacilo tuberculoso (grupo MOTT o micobacterias atípicas). El huésped natural de M. tuberculosis es el hombre y el bovino en el caso de M. bovis, aunque ambos agentes pueden causar enfermedad en otras especies domésticas y salvajes (1,5,10,13,22).

El resultado de la interacción entre el agente patógeno y el huésped es una inflamación granulomatosa, lesión característica de la tuberculosis. Dicha lesión consta principalmente de tejido necrótico rodeado de macrófagos (MØs), células epitelioides, células gigantes, linfocitos, fibroblastos y colágena (3,27,44).

Dentro del granuloma, los MØs tienen un papel predominante por su capacidad de fagocitar y procesar al bacilo tuberculoso (1,6,8,15,40,60). Los MØs, que se originan en la médula ósea, se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos, integrando el Sistema Fagocítico Mononuclear (48,56,62).

Una vez que se lleva a cabo la interacción hués---ped-parásito, son varios los mecanismos que emplean los microorganismos (MOOs) patógenos para evitar ser destruidos -- por los MØs; uno de estos, es la evasión de la fagocitosis, que puede ocurrir en cualquiera de las 5 fases que integran este proceso responsable de la destrucción de una amplia variedad de MOOs (45,54,56,58,62). Dicho proceso ocurre principalmente cuando se lleva a cabo la fusión fagosoma-lisosoma (FL), pues esta fusión permite que entren en contacto las enzimas y sustancias bactericidas presentes en los lisosomas (Ls) de los MØs, con el MOO fagocitado previamente y contenido en un fagosoma (F) o vacuola fagocítica (6,13,27,40,44,--53,56,58).

En 1971, Armstrong y D'Arcy Hart, con el uso del microscopio electrónico y técnicas citoquímicas, determinaron que el Mycobacterium tuberculosis H37Rv era capaz de evitar la fusión FL en MØs peritoneales de ratón cultivados in vitro (2). Posteriormente este fenómeno se observó en infecciones causadas por Brucella suis, Toxoplasma gondii, Nocardia asteroides y virus Sendai (16,33,34,46).

Investigaciones posteriores con el bacilo tuberculoso, han sido encaminadas a demostrar el mecanismo por el cual este parásito intracelular evita la fusión FL. Estos estudios han propuesto que podría deberse a un aumento en la producción de AMP cíclico, la presencia de sulfátidos en la pared bacteriana y/o la secreción de amonio (23,25,41). Se ha observado también que el bacilo secreta una sustancia pro

teica capaz de bloquear la acción de la β -Glucoronidasa presente en los Ls de los MØs; además se sospecha de la presencia de otras sustancias que pueden evitar la adherencia del bacilo a la membrana de estos MØs y la producción de enzimas por parte de los mismos una vez infectados con el bacilo tuberculoso, inhibiendo así los procesos de respiración celular (3,36,62).

Un método para el estudio del mecanismo de fusión FL fué ideado por D'Arcy Hart y Young en 1975 (31); éste emplea el naranja de acridina (NA), colorante vital fluorescente que tiene la propiedad de acumularse principalmente en el medio ambiente ácido de los Ls (pH 4.5-5) y cambiar de color de acuerdo al pH del medio en que se encuentre. Así pues, cuando los Ls marcados con este colorante, se unen con uno o más Fs (pH 7-7.4) será posible observar la fusión FL en una escala de color que varía del amarillo verdoso al naranja, dependiendo de la viabilidad de la célula y de la sustancia fijadora empleada (35).

El presente trabajo tiene como propósito contribuir al estudio de la patogénesis del bacilo tuberculoso mediante la determinación de la frecuencia de fusión FL en MØs peritoneales de ratón cuando estos son infectados con M. vaccae (cepa no patógena), M. bovis BCG (cepa atenuada) y M. tuberculosis H37Rv (cepa patógena) utilizando como testigo a Candida albicans.

MATERIAL Y METODOS

Animales: Se utilizaron ratones albinos suizos¹, de 30 g de peso en promedio, clínicamente sanos, a partir de los cuales se obtuvieron los MØs peritoneales.

Bacterias: Se trabajó con las cepas de M. tuberculosis H37Rv², M. bovis BCG³, M. vaccae MY004² y levaduras de Candida albicans⁴.

Obtención de células: Los MØs peritoneales fueron obtenidos de la siguiente manera:
Los ratones fueron anestesiados con eter y sangrados en su totalidad. Se colocaron sobre una tabla de corcho y fueron sujetados con alfileres. La piel abdominal se impregnó de alcohol y se procedió a retirarla dejando al descubierto las masas musculares del abdomen. Con aguja del No. 22 y jeringa estéril se introdujó a cada ratón, via intraperitoneal, - 10 ml de solución salina fosfatada (SSF) con 0.6 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y pH de 7.2 (7). La solución se recolectó en tubos de centrifuga cónicos y se centrifugó a 250 X g/10 minutos (min). El sobrenadante se descartó y se procedió a realizar el conteo celular en un hemocitú

1. Proporcionados por el Depto. de Virología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.
2. Proporcionadas por el Depto. de Bacteriología de la FMVZ, UNAM.
3. Proporcionada por el Instituto de Higiene, SS.
4. Proporcionada por el Ontario Veterinary College, Canada.

metro, usando azul tripano al 0.4%, lo que además permitió - determinar la viabilidad de las células obtenidas.

Cultivo de MØs: El paquete celular se diluyó en - Medio 199 suplementado con 2 mM de L-glutamina (M199), 10% - de suero fetal bovino, 1.5% de bicarbonato de sodio al 3%, - 100 UI de penicilina y 1 mg de estreptomina, con un pH --- final de 7.0, ajustando la concentración celular a 1.25×10^6 células/ml, colocando 1 ml por tubo de fondo plano (13 mm de diámetro y 45 mm de longitud). Se emplearon 40 tubos en total y en cada tubo se colocó previamente un cubreobjetos redondo de 12 mm de diámetro sobre el cual quedaron adheridas las células.

Se purificó a los MØs por su propiedad de adhesión al vidrio (39); por lo que se incubaron los tubos a $37^{\circ}\text{C}/120$ min y después se lavaron tres veces con SSF sin EDTA para -- eliminar las células que no se adhirieron. Se tomó el primer sobrenadante del 10% de los tubos y se cuantificó en estos - el número y la viabilidad de las células que no se adhirie-- ron al vidrio para así establecer la cantidad de MØs adheren-- tes por tubo, encontrando 1×10^6 células, aproximadamente; posteriormente se agregó 1 ml de M199 y se incubaron a 37°C durante 24 hrs. Una vez concluido este lapso se realizó --- otro lavado y otro conteo como en el paso anterior.

Preparación de inóculos: Las cepas de micobacte-- rias y levaduras fueron utilizadas en el punto de la máxima pendiente de la fase de crecimiento logarítmico. M. tuber-- culosis H37Rv y M. bovis BCG se cultivaron por 21 días y ---

M. vaccae por 5 días en medio de Dubos* a 37°C. Las levaduras de C. albicans fueron cultivadas durante 24 hrs en caldo triptosa a 37°C.

Los bacilos se lavaron tres veces con SSF para eliminar cualquier sustancia presente en el cultivo que pudiera interferir con la fusión FL. En el último lavado las micobacterias fueron centrifugadas a 25 X g/5 min para sedimentar los acúmulos de bacilos (63). Las micobacterias disgregadas fueron tomadas de la parte superior de la SSF y se diluyeron en M199 sin antibióticos. Las levaduras también --- fueron lavadas tres ocasiones y resuspendidas en M199. Se ajustó el número de micobacterias por medio de espectrofotometría (37), estableciendo una concentración de 5.2×10^7 -- micobacterias/ml (1 mg de peso seco de micobacterias/ml). En el caso de las levaduras se estandarizó la concentración a 5×10^6 levaduras/ml.

Marcaje de Ls: Los Ls de los MØs se marcaron 30 min antes de ser infectados siguiendo la técnica descrita -- por D'Arcy Hart y Young (31) que emplea 5 µg de NA/ml a 37°C con 5% de CO₂, en la obscuridad. Se verificó la viabilidad de las células antes y después de marcadas usando la tinción de azul tripano.

Infección de los MØs: La infección se realizó con 1 ml de inóculo por tubo. El rango de infección fué de 10 -- micobacterias por MØ y de 4 levaduras por MØ.

Después del marcaje de Ls con NA, se colocaron to-

(*) Difco Labs.

dos los tubos en un recipiente con hielo y agua para mantener la temperatura por debajo de 14°C , temperatura a la cual se detiene el proceso de fagocitosis (35,55). De esta manera se sincronizó la infección de los MØs y se permitió la fijación de las bacterias y levaduras a la membrana celular en los tubos ya infectados durante 60 min.

Posteriormente y con la finalidad de eliminar las micobacterias y levaduras que no se adhirieron, se realizaron tres lavados con M199 frío (4°C), al finalizar el último lavado se elevó la temperatura a 37°C y se procedió a seguir una cinética de tiempos cortos: 0 min, 15 min, 30 min y 60 min, respectivamente. Los cultivos se fijaron con metanol por 5 min a los tiempos arriba mencionados.

Se emplearon MØs sin infectar marcados con NA para establecer las fusiones FL inespecíficas ocurridas antes de la infección debidas a la fagocitosis de partículas extrañas y a la formación de autofagosomas que se están produciendo por el constante reciclaje y/o síntesis de la membrana celular del MØ (55).

También se realizó un testigo de autofluorescencia el cual consistió en MØs sin marcar con NA y sin infectar.

Para obtener la frecuencia de fusión FL fué necesario determinar la capacidad fagocítica de los MØs, para esto, se realizó simultáneamente a la infección de los MØs marcados con NA, otra infección sincronizada en MØs que fueron teñidos con Giemsa y Auramina-O (tinción ácido-alcohol resistente para micobacterias), después de realizar la misma ciné

tica de tiempos, con igual rango de infección. Estas tinciones permitieron establecer la cantidad de bacterias y/o levaduras adheridas (tiempo=0 min) e internalizadas (tiempo>0 min) en las células.

Una vez fijados los cubreobjetos, fueron lavados con agua destilada, se sacaron de los tubos y fueron colocados en portaobjetos.

La observación de los MØs se efectuó en un fotomicroscopio III Carl Zeiss de epifluorescencia, equipado con filtro primario BG12 y filtro barrera K44, para los fluorocromos NA y Auramina-O; las células teñidas con Giemsa se observaron con el microscopio de campo claro.

Análisis estadístico: Se condujo conforme a un diseño de tres caminos de clasificación, el modelo al cual se le atribuyó el total de la variación fué:

$$Y_{ijk1} = \mu + B_i + \delta_{(i)} + M_j + BM_{ij} + T_k + BT_{ik} + MT_{jk} + BMT_{ijk} + E_{(ijk)1}$$

en donde: μ = media poblacional; B_i = efecto de experimento; δ = error de restricción por la azarización de experimentos; M_j = efecto de bacterias; BM_{ij} = interacción entre experimentos y bacterias; T_k = efecto de tiempo; BT_{ik} = interacción de experimento y tiempo; MT_{jk} = interacción de bacterias y tiempo; BMT_{ijk} = interacción de experimentos, bacterias y tiempo; $E_{(ijk)1}$ = error aleatorio suponiendo NID $(0, \sigma^2)$.

RESULTADOS

Los valores que se muestran en los cuadros y gráficas representan el promedio de tres experimentos en los cuales se observaron 100 MØs al azar.

En el Cuadro y Gráfica No. 1 se presenta el porcentaje de MØs involucrados en la fagocitosis de las distintas micobacterias. Se observó que la cantidad de células fué de 24.43%, 35.54% y 59.47% para M. bovis BCG, M. tuberculosis - H37Rv y M. vaccae, respectivamente. Para los MØs infectados con C. albicans se observó el 80.73%.

Empleando la tinción de Auramina-O y Giemsa se determinó la Capacidad Fagocítica de los MØs infectados con micobacterias y C. albicans, respectivamente, esto es, el número de bacterias fagocitadas/100 MØs en los distintos tiempos del experimento (Cuadro y Gráfica No. 2). Se observó que un número similar de bacilos de M. tuberculosis y M. vaccae se adhirieron en el tiempo 0 min ($P > 0.10$) y M. bovis resultó ser la micobacteria que en menor grado se adhirió a la membrana de los MØs a este tiempo ($P < 0.10$). Del tiempo 15 min en adelante, la cepa virulenta de M. tuberculosis y la atenuada de M. bovis fueron internalizadas de manera constante, aunque esta última en menor grado ($P < 0.10$). Con respecto a M. vaccae se observó un incremento lineal a partir del tiempo 0 min ($P < 0.10$). En el caso de los MØs sin infectar fué posible observar "partículas" que tomaron los co-

lorantes de Auramina-O y Giemsa.

El número de fusiones FL observadas con la tinción de NA en los MØs infectados y sin infectar se presenta en el Cuadro y Gráfica No. 3. Los MØs infectados con M. bovis mostraron el mayor número de fusiones FL ($P > 0.01$) a lo largo del experimento. Los MØs infectados con M. vaccae mostraron fluctuaciones en el número de fusiones FL con respecto a --- M. tuberculosis, sin llegar a ser diferentes ($P < 0.01$). En los MØs sin infectar también se observó la presencia de fusiones FL.

Una vez establecida la cantidad de bacterias fagocitadas y el número de fusiones FL en los MØs infectados se procedió a determinar la Frecuencia de Fusión FL (FFFL) empleando para ello la siguiente infección:

$$FFFL = \frac{f(t)}{b(t)}$$

Debido a la incertidumbre presente en los MØs infectados y sin infectar pero más evidente en estos últimos, fué necesario modificar la ecuación para disminuir al mínimo el efecto que produce la ingestión constante y permanente de partículas, así como la generación y fusión también constante de los Ls primarios por parte de los fagocitos, con lo -- cual la ecuación quedó de esta forma:

$$FFFL = \frac{f(t) - f_0(t)}{b(t) - b_0(t)}$$

en donde:

para la tinción con NA:

$f(t)$ = Número de fusiones FL observadas en 100 MØs infectados y contados al azar.

$f_0(t)$ = Número de fusiones FL observadas en 100 MØs sin infectar y contados al azar.

y para la tinción con Auramina-O:

$b(t)$ = Número de micobacterias observadas en 100 MØs infectados y contados al azar.

$b_0(t)$ = Número de partículas observadas en 100 MØs sin infectar y contados al azar.

De esta forma es posible apreciar que $\frac{f(t)}{b(t)}$ --

constituye la señal del fenómeno FFFL y $\frac{f_0(t)}{b_0(t)}$ la de la in

certidumbre o ruido*.

Una vez aplicada la ecuación a los datos obtenidos fué posible establecer la FFFL. Para los MØs infectados con C. albicans la FFFL se obtuvo empleando la misma ecuación pero se usó la tinción de Giemsa para establecer la Capacidad Fagocítica y el número de células involucradas en la fagocitosis. Los resultados de la FFFL se presentan en el Cuadro

(*) noise, background.

y Gráfica No. 4. Se observó que la FFFL más baja correspondió a los MØs infectados con M. vaccae en los cuatro tiempos del experimento ($P < 0.01$). La FFFL de los MØs infectados con M. bovis fué mayor que la de M. vaccae ($P < 0.01$) y únicamente resultó mayor en el tiempo 15 min en comparación con los infectados con M. tuberculosis ($P < 0.10$), no existiendo diferencias en los demás tiempos ($P > 0.10$). Se observó que la FFFL fué constante para cada micobacteria durante los --- tiempos del experimento ($P > 0.10$).

DISCUSION

Los parásitos intracelulares facultativos y obligados son capaces de evadir y/o resistir la fagocitosis porque utilizan mecanismos que evitan una o varias etapas que integran este proceso (adherencia, ingestión, fusión fagolisosomal, digestión y excreción), cada una de las cuales requiere de diversos factores inherentes a la célula huésped y al parásito para su realización.

El testigo de la fusión FL en este trabajo fué C. albicans que ha sido utilizada en investigaciones anteriores (9,11,17,50) porque es fagocitada rápidamente y la fagocitosis puede observarse fácilmente, como ocurrió en este trabajo en el que se pudo observar MØs que fagocitaron y fusionaron a estas levaduras (Ver fotografías).

El número de MØs involucrados en la fagocitosis -- varió de 25% a 80% para las distintas micobacterias y levaduras, posiblemente debido a diferencias en la composición química de estos. Por otra parte se encontró un 35.54% de MØs involucrados en la fagocitosis de M. tuberculosis H37Rv, --- coincidiendo con Zlotnik et al quien informó un 34% para los MØs pleurales infectados con M. bovis BCG (63); resultando - además para este estudio el 24.43% para M. bovis BCG y ----- 54.47% para M. vaccae.

Cabe destacar que en la literatura consultada pocos estudios realizados sobre la fusión FL mencionan el por-

centaje de MØs que fagocitaron y la Capacidad Fagocítica de los mismos, posiblemente debido a los diferentes métodos experimentales empleados (2,3,16,23,25,29,30,31,33,34,38,41,--43,46). Sin embargo, diversos estudios señalan que la cantidad de células que fagocitan en una población y la Capacidad Fagocítica de las mismas varía y nunca llega al 100%. Trabajos recientes confirman este hecho y hacen notar que esta heterogeneidad (morfológica, bioquímica y funcional) existe en MØs de cualquier especie y origen e inclusive en líneas de - MØs de origen murino que se han desarrollado y que se están usando en la actualidad como son la J774.1, PUS-1.8, WEHI-3 y P388-D1 (19,21,28,42,45,50,57,63).

Otra variable que afecta al porcentaje de células fagocíticas y que se debe considerar es el rango de infec---ción; en el Cuadro No. 1 se aprecia que no todos los MØs fagocitaron micobacterias y levaduras en los rangos de infec--ción de 1:10 y 1:4, respectivamente. Esto coincide con lo - informado por otros investigadores, quienes al usar diferen--tes rangos de infección, cepas de micobacterias con diferen--te virulencia, agentes bacterianos, latex, carbón y origen - de los MØs, observaron que en condiciones óptimas de viabilidad (> 95%) no todos los MØs son capaces de fagocitar, aún cuando provienen de animales condicionados con o sin un alto grado de homogeneidad (4,11,14,17,18,19,21,28,32,42,47,50,--51,57,63). En este trabajo se decidió infectar a los MØs -- con una proporción 1:10 puesto que en experimentos previos - (datos no mostrados) se observó que: a) al infectar a los --

MØs con una relación menor (1:4) se fagocitó un número insuficiente de micobacterias, lo que no permitió obtener datos suficientes para ser analizados; b) al infectarlos con una relación mayor (1:100) la cantidad de micobacterias fagocitadas fué tan grande que resultó imposible determinar con precisión cuantas bacterias habían sido ingeridas; c) un aumento en la temperatura ($> 15^{\circ}\text{C}$) no permitió sincronizar la infección y d) al aumentar el tiempo de adherencia a 4°C por arriba de 60 min se inició un desprendimiento de los MØs, -- por lo que no había población a estudiar.

En la adsorción de bacterias a la membrana celular de MØs, se sabe que participan propiedades inherentes a la superficie de ambas (49). Con respecto al fagocito, se sabe que la adherencia de diversas bacterias se facilita empleando MØs previamente estimulados o cuando se opsonizan las bacterias con inmunoglobulinas G. En este trabajo, se emplearon MØs peritoneales sin estimular, Wago menciona que la adherencia en este tipo de células se realiza principalmente por receptores inespecíficos de baja afinidad (59). En relación con las bacterias, se informa que las cargas electrostáticas y las características hidrofílicas e hidrofóbicas de la superficie juegan un papel importante en la adherencia a otra superficie celular (49). Se conoce que el género Mycobacterium posee una gruesa capa lipídica, lo que les confiere a estas bacterias una fuerte hidrofobicidad que se manifiesta por la formación de agregados cuando los bacilos se encuentran en medio líquido (2,3,5,19,63). Esta observación

fué evidente en este trabajo pues hubo la necesidad de recurrir al empleo de detergentes como el Tween 80 (en concentraciones que no afectaran a la membrana celular), perlas de vidrio y tiempos prolongados de agitación para disgregar a los bacilos. Aún así, es necesario señalar la persistencia de estos agregados en los MØs infectados con las diferentes micobacterias empleadas, fenómeno que no se observó con los MØs infectados con C. albicans.

La menor cantidad de bacilos de M. bovis adherida a la membrana de los MØs respecto a M. tuberculosis y M. vaccae sólo podría ser explicada con base a diferencias en la conformación externa de M. bovis. Goren señala menor concentración de sulfátidos en la superficie de los bacilos de M. bovis en comparación con M. tuberculosis (24,25). Por el otro lado, M. vaccae y M. tuberculosis se adhirieron en igual forma, lo que sugiere similitud en las características superficiales de ambas con respecto a su adherencia a MØs peritoneales de ratón. En la literatura consultada no fué posible encontrar información sobre las características superficiales de M. vaccae.

Es importante señalar que Goren sugiere que la fuerte propiedad hidrofóbica conferida por los glicolípidos de la pared bacteriana del género Mycobacterium contribuyen a dificultar la adhesión y por consiguiente la ingestión de las distintas especies de este género (26).

Con relación a la fusión FL se observó que la temperatura menor de 14°C permitió sincronizar la infección, --

pues como lo informa Kielian et al la fagocitosis no ocurre a esta temperatura (35), sin embargo, debido al empleo de -- MØs peritoneales provenientes de animales condicionados no -- fué posible eliminar las fusiones inespecíficas que pueden -- ser el resultado de: a) la adhesión e ingestión de diferen-- tes partículas, muchas de las cuales se pusieron de manifiesto con las tinciones de Auramina-O y Giemsa y b) de la formación y fusión de Ls primarios con Fs que se estan produciendo constantemente en estas células con capacidad fagocítica marcada y capaces de internalizar la totalidad de su membranna plasmática en aproximadamente 30 min, como parte de su -- fisiología (35). Lo anterior se manifiesta al observar los datos de los MØs sin infectar donde diversas partículas ca-- paces de reaccionar con el colorante Auramina-O y Giemsa proporcionaron un promedio de 0.07 ± 0.01 por MØ y de $0.35 \pm -- 0.09$ de fusiones FL por MØ.

La importancia del fenómeno antes mencionado es -- tal que a pesar de tener una idea clara de él, de la utilización de los testigos necesarios y de una ecuación que tiende a eliminar la incertidumbre, ésta siempre se hizo evidente -- como se puede apreciar en el tiempo 0 min del Cuadro No. 4.

Se observa que los valores más significativos de -- fusión FL se manifiestan en los 15 min y 30 min de estos ex-- perimentos. Esto coincide con lo expresado por Geisow et al en el sentido de que la fusión FL con bacterias y partículas ocurre en estos tiempos (20), después de iniciada la fagoci-- tosis y que los eventos que se presentan después serán el re-

sultado de la degradación o no del material ingerido (35,---56).

Con respecto a la FFFL de las distintas micobacterias, propósito de este estudio, es necesario mencionar que los MØs infectados con M. vaccae presentaron la FFFL más baja en estas condiciones, además, M. bovis y M. tuberculosis mostraron una FFFL similar, salvo en el min 15 en el que la primera mostró el valor mayor.

En estudios previos, con otro diseño experimental, se observó que M. tuberculosis H37Rv y M. bovis BCG fueron capaces de disminuir la fusión FL (2,3,25,29,30); no así con M. vaccae, micobacteria no patógena, con la que no se ha informado de ningún estudio de este tipo con anterioridad.

Considerando otros métodos y condiciones que se --han empleado para evaluar la FFFL, se encontró que Armstrong et al (2,3) analizó este fenómeno por medio de la microscopía electrónica, técnica con la que para establecer la presencia o ausencia de fusiones FL es necesario observar un número considerable de muestras para obtener hallazgos importantes que permitan afirmar cuantitativamente que la fusión FL ha o no ocurrido.

Otro método de estudio de la fusión FL es determinar si las enzimas contenidas en los Ls han entrado en contacto con el sustrato presente en el F por lo cual es necesario medir la forma en la que desaparece el sustrato o medir el producto resultante de la acción de la enzima. Este método, exacto y preciso, tiene el inconveniente de que al mismo

tiempo que evalúa la fusión FL también esta determinando la digestión o no del sustrato utilizado, siempre y cuando éste último sea susceptible a la acción de las enzimas lisosomales.

Con respecto a la técnica de NA utilizada en este trabajo, se debe comentar que la observación de las fusiones FL cuantificadas se ve sujeta a errores de interpretación -- por parte del observador pero estos se ven reducidos a su mínima expresión debido principalmente al tamaño de la muestra analizada.

Debe señalarse que: 1) no es posible extrapolar -- los datos aquí mostrados, referentes a la fagocitosis de las diferentes micobacterias empleadas en este trabajo, con los obtenidos por otros autores al utilizar latex, eritrocitos, levaduras y otras micobacterias para evaluar la fusión FL, - dadas las diferencias entre géneros bacterianos, entre las especies de micobacterias y aún las posibles diferencias entre cepas de la misma especie; 2) se emplearon MØs peritoneales sin estimular, células heterogéneas y sin activar, con las que entran en contacto por primera vez los diversos MOOs cuando ingresan a un huésped determinado; 3) es posible concluir que la capacidad de inhibir la fusión FL no es privativa de parásitos intracelulares obligados como M. tuberculosis y M. bovis, que de esta forma evaden y/o resisten la fagocitosis además de utilizar otros mecanismos para lograrlo, sino que esta propiedad se puede encontrar también en M. vaccae, MOO apatógeno para el cual sólo se encontró un informe

21

de su participación en un proceso clínico de telitis nodular (52).

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1.- Acha, P.N. and Szyfres, B.: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Pan Am. Health Org., World Health Org., Washington, 1980.
- 2.- Armstrong, J.A. and Hart, P.D.: Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observation of fusion of lysosomes and phagosomes. J. Exp. Med., 134:713-740 (1971).
- 3.- Armstrong, J.A. and Hart, P.D.: Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J. Exp. Med., 142:1-16 (1975).
- 4.- Anderson, L.C., Rush, H.G. and Glorioso, J.C.: Strain differences in the susceptibility and resistance of Pasteurella multocida to phagocytosis and killing by rabbit polymorphonuclear neutrophils. Am. J. Vet. Res., 45:1193-1198 (1984).
- 5.- Barksdale, L. and Kim, K-S.: Mycobacterium. Bacteriol. Rev., 41:217-372 (1977).
- 6.- Bates, J.H.: Tuberculosis: Susceptibility and resistance. Am. Rev. Resp. Dis., 125:20-24 (1982).
- 7.- Blussé Van Oud Alblas, A. and Van Furth, R.: Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. J. Exp. Med., 149:1504-1518 (1979).
- 8.- Boros, D.L.: Granulomatous inflammations. Prog. Allergy., 24:183-267 (1978).
- 9.- Bridges, C.G., Da Silva, G.R. and Yamamura, M.: A radiometric assay for the combined measurement of phagocytosis and intracellular killing of Candida albicans. Clin. Exp. Immunol., 42:226-233 (1980).
- 10.- Bruner, D.W. and Gillespie, J.H.: Hagan and Bruner's -- infectious disease of domestic animals. 7th ed. Cornell University Press, Ithaca, 1981.
- 11.- Cech, P. and Lehrer, R.I.: Heterogeneity of human neutrophil phagolysosomes: functional consequences for candidacidal activity. Blood., 64:147-151 (1984).

- 12.- Chaparas, S.D.: Immunity in tuberculosis. Bull. World Health Org., 60:447-462 (1982).
- 13.- Chapman, J.S.: The atypical mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis., 125:119-124 (1982).
- 14.- Charley, B., Leclerc, C., Petit, E. and Chedid, L.: In vitro effects of lipopolysaccharides and mycobacterial cell wall components on swine alveolar macrophages. --- Res. Vet. Sci., 34:212-217 (1983).
- 15.- Dannenberg, A.M. Jr., Ando, M. and Shima, K.: Macro- --- phage accumulation, division, maturation, and digestive and microbicidal capacities in tuberculous lesions. --- III. The turnover of macrophages and its relation to -- their activation and microbial immunity in primary BCG lesions and those of reinfection. J. Immunol., 109:1109-1121 (1972).
- 16.- Davis-Scibiensky, C. and Deaman, B.L.: Interaction of - alveolar macrophages with Nocardia asteroides: Immunological enhancement of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion, and microbicidal activity. Infect. Immun., 30:--578-587 (1980).
- 17.- Fontenla de Petrino, S.E. and Sirena, A.: Release of -- lysosomal enzymes in Candida albicans phagocytosis by - rat peritoneal macrophages. Mycopathol., 84:103-106 ---- (1984).
- 18.- Gangadharam, P.R.J. and Pratt, P.F.: In vitro response of murine alveolar and peritoneal macrophages to Mycobacterium intracellulare. Am. Rev. Resp. Dis., 128:1044-1047 (1983).
- 19.- Garcia, E., Iturbe, R. and Goodsaid-Zualduondo, F.: Intracellular parasite virulence modulates the kinetics - of cointernalization and recycling of cell-surface proteins in the macrophages. J. Cell Biol., 99:375a (1984).
- 20.- Geisow, M.J., Hart, P.D. and Young, M.R.: Temporal ---- changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy. J. Cell Biol., 89:645-652 (1981).
- 21.- Goldman, R.: Effect of retinoic acid on the prolifer--- ation and phagocytic capability of murine macrophage- - like cell lines. J. Cell Physiol., 120:91-102 (1984).
- 22.- Good, R.C.: Nontuberculous mycobacteria. Clin. ----- Microbiol. Newsletter., 1:1-4 (1979).
- 23.- Gordon, A.H., Hart, P.D. and Young, M.R.: Ammonia in---

- hibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. Nature, 286:79-80 (1980).
- 24.- Goren, M.B.: Phagocyte lysosomes: interactions with infectious agents, phagosomes, and experimental perturbations in function. Ann. Rev. Microbiol., 31:507-533 --- (1977).
 - 25.- Goren, M.B., Hart, P.D., Young, M.R. and Armstrong, J.A.: Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 73:2510-2514 (1976).
 - 26.- Goren, M.B., Swendsen, C.L. and Henson, J.: In: Mononuclear phagocytes; functional aspects. R. Van Furth, --- pp. 999-1038, Nijhoff, The Hague, 1980.
 - 27.- Grange, J.M.: Mycobacterial diseases. (Current topics - in infection, No. 1), The Pittman Press, London, 1980.
 - 28.- Ha, C., Miller, L.T. and Kerkvliet, N.I.: The effect of vitamin B₆ deficiency on cytotoxic immune responses of T cells, antibodies, and natural killer cells, and phagocytosis by macrophages. Cell. Immunol., 85:318-329 --- (1984).
 - 29.- Hart, P.D. and Armstrong, J.A.: Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun., 10:742-746 (1974).
 - 30.- Hart, P.D., Armstrong, J.A., Brown, C.A. and Draper, P.: Ultrastructural study of the behaviour of macrophages - toward parasitic mycobacteria. Infect. Immun., 5:803-807 (1972).
 - 31.- Hart, P.D. and Young, M.R.: Interference with normal -- phagosome-lysosome fusion in macrophages, using ingested yeast cells and suramin. Nature, 256:47-49 (1975).
 - 32.- Hulub, M., Fornusek, L., Vetvicka, V. and Chalupna, J.: Enhanced phagocytic activity of blood leukocytes in --- athymic nude mice. J. Leukocyte Biol., 35:605-615 (1984).
 - 33.- Jakab, G.J., Warr, G.A. and Sannes, P.L.: Alveolar macrophage ingestion and phagosome-lysosome fusion defect associated with virus Pneumonia. Infect. Immun., 27:960-968 (1980).
 - 34.- Jones, T.C.: Interactions between murine macrophages -- and obligate intracellular protozoa. Am. J. Pathol., --- 101:127-132 (1980).
 - 35.- Kielian, M.C. and Cohn, Z.A.: Phagosome-lysosome fusion,

Characterization of intracellular membrane fusion in -- mouse macrophages. J. Cell Biol., 85:754-765 (1980).

- 36.- Kiyotani, K., Tasaka, H. and Matsuo, Y.: Purification and characterization of β -Glucuronidase inhibitor from Mycobacterium tuberculosis. Microbiol. Immunol., 27:695-708 (1983).
- 37.- Kunz, R. und Gundermann, K-O.: Zur Überlebensdauer von Mycobacterium tuberculosis auf Oberflächen bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit. Zbl. Bakt. Hyg., B176:105-115 (1982).
- 38.- Leake, E.S., Myrvik, Q.N. and Wright, M.J.: Phagosomal membranes of Mycobacterium bovis BCG-immune alveolar -- macrophages are resistant to disruption by Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Infect. Immun., 45:443-446 ---- (1984).
- 39.- Leake, E.S., Wright, M.J. and Gristina, A.G.: Comparative study of the adherence of alveolar and peritoneal macrophages and of blood monocytes to methyl methacrylate, polyethylene, stainless steel, and vitallium. ---- J. Reticuloendothel. Soc., 30:403-414 (1981).
- 40.- Lowrie, D.B.: The macrophage and mycobacterial infections. Trans. Royal Soc. Trop. Med., 77:646-655 (1985).
- 41.- Lowrie, D.B., Aber, V.R. and Jackett, P.S.: Phagosome-lysosome fusion and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in macrophages infected with Mycobacterium microti, Mycobacterium bovis BCG or Mycobacterium lepraemurium. J. Gen. Microbiol., 110:431-441 (1979).
- 42.- Mørland, B. and Midtvedt, T.: Phagocytosis, peritoneal influx, and enzyme activities in peritoneal macrophages from germfree, conventional, and ex-germfree mice. --- Infect. Immun., 44:750-752 (1984).
- 43.- Myrvik, Q.N., Leake, E.S. and Wright, M.J.: Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of Mycobacterium tuberculosis: a -- correlate of virulence. Am. Rev. Resp. Dis., 129:322-338 (1984).
- 44.- Narayanan, R.B., Badenoch-Jones, P. and Turk, J.L.: Experimental mycobacterial granulomas in Guinea pigs ---- lymph nodes: Ultrastructural observations. J. Pathol., - 134:253-265 (1981).
- 45.- Nelson, D.S.: Macrophages: progress and problems. Clin. Exp. Immunol., 45:225-233 (1981).

- 46.- Oberti, J., Caravano, R. and Roux, J.: Attempts of quantitative determination of phagosome-lysosome fusion --- during infection of mouse macrophages by Brucella suis. Ann. Immunol. (France), 132D:201-206 (1981).
- 47.- Rabatic, S., Sabioncello, A. and Dekaris, D.: Comparison of Guinea-pig peritoneal and lung phagocytes: in vitro migration, spreading and phagocytosis before and after induction of cell-mediated immunity. Period. Biol., 85:167-168 (1983).
- 48.- Ryan, G.B. and Majno, G.: Acute inflammation. Am. J. Pathol., 86:185-264 (1977).
- 49.- Ryter, A. and De Chastellier, C.: Phagocyte-pathogenic microbe interactions. Inter. Rev. Cytol., 85:287-327 --- (1983).
- 50.- Sasada, M. and Johnston Jr., R.B.: Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of Candida by macrophages. J. Exp. Med., 152:85-98 (1980).
- 51.- Sharp, A.K. and Banerjee, D.K.: Attempts at cultivation of Mycobacterium leprae in macrophages from susceptible animal hosts. Inter. J. Leprosy, 52:189-197 (1984).
- 52.- Shimizu, K., Masaki, S-I. and Hirose, T.: Studies on mycobacterial infection of cows in Hokkaido. Jpn. J. Vet. Sci., 43:13-19 (1981).
- 53.- Soderberg, L.F. and Solotorovsky, M.: Host-parasite interactions with macrophages in culture. In: Phagocytes and cellular immunity. Gadebosch, H.H. 101-136, CRC Press, Florida, 1979.
- 54.- Spitznagel, J.R.: Microbial cells as determinants of intraleukocytic degradation. In: Microbiology-1979. --- Schlessinger, D., 101-104, Am. Soc. Microbiol., ----- Washington, 1979.
- 55.- Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A. and Cohn, Z.A.: Endocytosis and the recycling of plasma membrane. J. Cell Biol., 96:1-27 (1983).
- 56.- Tizard, I.R.: An introduction to veterinary immunology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1977.
- 57.- Van Furth, R., Van Schdewijk-Nieuwstad, M., Elzenga- - Claasen, I., Cornelisse, C. and Nibberring, P.: Morphological, cytochemical, functional, and proliferative -- characteristics of four murine macrophages-like cell -- lines. Cell. Immunol., 90:339-357 (1985).

- 58.- Van Furth, R., Van Zwet, T.L. and Leijh, G.J.: In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In:--- Molecular immunity. Weir, D.M., 32.1-32.19, 3th ed., -- Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1979.
- 59.- Wago, H.: In vitro evidence for the requirement of filopodial elongation for the progress of phagocytosis by phagocytic granular cells of the silkworm, Bombyx mori. Develop. Comp. Immunol.,8:7-14 (1984).
- 60.- Walker, L. and Lowrie, D.B.: Killing of Mycobacterium microti by immunologically activated macrophages. ----- Nature,293(5827):69-71 (1981).
- 61.- Wayne, L.G.: Microbiology of tubercle bacilli. Am. Rev. Resp. Dis.,125:31-41 (1982).
- 62.- Woolcock, J.B.: Bacterial infection and immunity in --- domestic animals. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1979.
- 63.- Zlotnik, A. and Crowle, A.J.: Lymphokine-induced myco-- bacteriostatic activity in mouse pleural macrophages. Infect. Immun.,37:786-793 (1982).

Quadro No. 1

PORCENTAJE DE CELULAS INVOLUCRADAS EN LA FAGOCITOSIS.

	tiempo (min)			
	0	15	30	60
M. tb. H37Rv	38.32	36.76	32.80	34.77
M. bovis BCG	22.70	20.20	27.75	27.05
M. vaccae	41.61	54.18	65.75	76.31
C. albicans	74.61	83.29	83.03	82.28

Quadro No. 2

CAPACIDAD FAGOCITICA PROMEDIO DE LAS CELULAS EN CULTIVO (NUMERO DE BACTERIAS/100 M2s).

	tiempo (min)			
	0	15	30	60
M. tb. H37Rv	1.79	1.94	1.23	2.23
M. bovis BCG	0.51	0.35	0.67	0.58
M. vaccae	1.83	3.51	4.75	6.25
C. albicans	2.40	3.80	3.18	3.68
Sin infectar	0.08	0.06	0.10	0.07

Cuadro No. 3

NUMERO DE FUSIONES FAGOLISOSMALES EN 100 M0s.

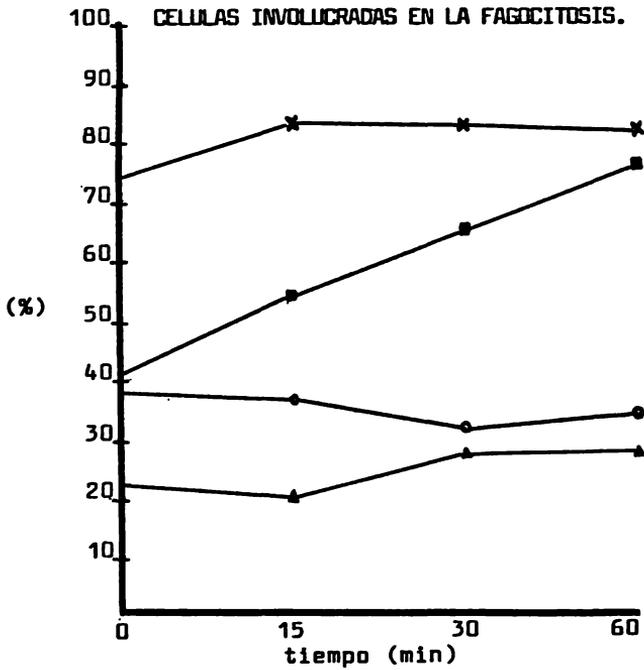
	tiempo (min)			
	0	15	30	60
M. tb. H37Rv	0.98	0.82	0.78	1.09
M. bovis BCG	1.31	1.38	1.30	1.62
M. vaccae	1.30	0.65	1.24	0.72
C. albicans	0.58	0.85	1.02	1.26
Sin infectar	0.33	0.35	0.5	0.25

Cuadro No. 4

FRECUENCIA DE FUSION FAGOLISOSMAL (FFFL).

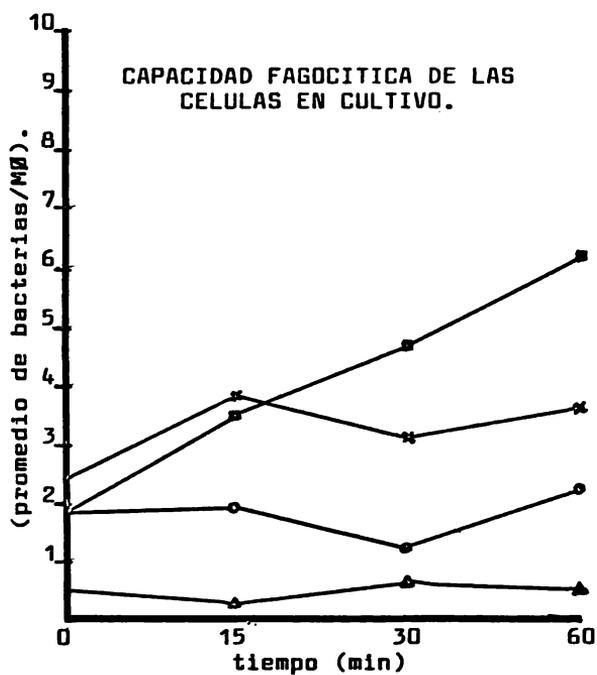
	tiempo (min)			
	0	15	30	60
M. tb. H37Rv	2.41	1.16	1.99	1.77
M. bovis BCG	2.53	3.41	1.84	2.16
M. vaccae	0.41	0.09	0.16	0.06
C. albicans	0.11	0.04	0.32	0.18

Gráfica No. 1



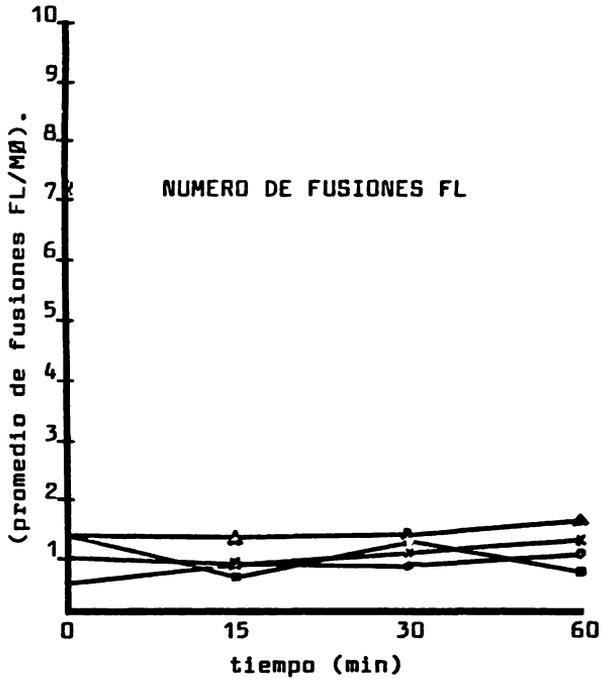
(○) M. tuberculosis H37Rv
(△) M. bovis BCG
(■) M. vaccae
(*) C. albicans

Gráfica No. 2



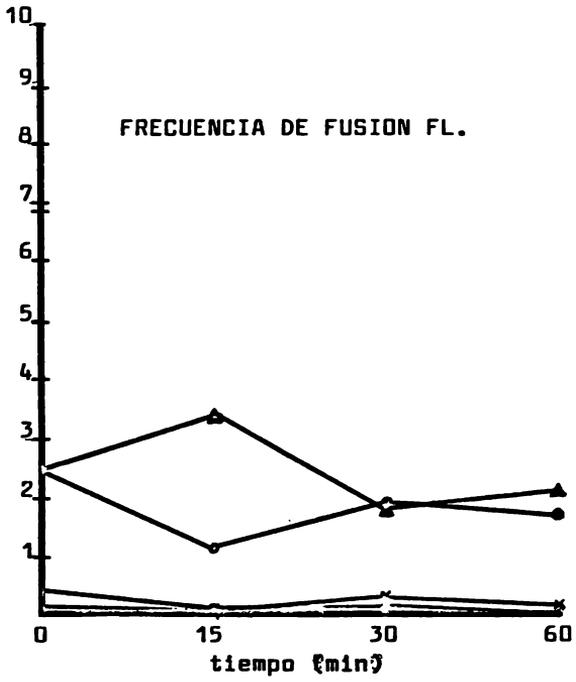
- (○) M. tuberculosis H37Rv
- (△) M. bovis BCG
- (□) M. vaccae
- (*) C. albicans

Gráfica No. 3



- (-O-) M. tuberculosis H37Rv
- (-▲-) M. bovis BCG
- (-■-) M. vaccae
- (-*) C. albicans

Gráfica No. 4



- (○) M. tuberculosis H37Rv
- (△) M. bovis BCG
- (□) M. vaccae
- (★) C. albicans

**Fotografía No. 1. MØs infectados con C. albicans.
Se observa una levadura contenida en un fagosoma.
Tinción de Giemsa. 1250X.**

Fotografía No. 2. MØs infectados con C. albicans.
Se observa una fusión fagolisosomal. Tinción con
NA. 1600X.

Fotografía No. 3. MØs infectados con M. bovis.
Se observan 3 bacilos. Tinción con Auramina-O.
1250X.

Fotografía No. 4. MØs infectados con M. bovis.
Se observan tres fusiones fagolisosomales.
Tinción con NA. 1250X.

Nota; Las fotografías se tomaron con película KodacolorVR
ASA 100. El tiempo de exposición fué automático para la
fotografía No. 1 y de 60 segundos para las de tinción ---
fluorescente.