

5

2EJ I



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

UTILIZACION DE LA SAL DE TETRAZOLIO,
3(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio
(MTT) PARA DETERMINAR LA PROLIFERACION
in vitro DE LINFOCITOS DE BOVINO (*Bos taurus*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ELIZABETH ACOSTA GARCIA



DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS RAMON BAUTISTA GÁRPIAS

1998



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "UTILIZACION DE LA SAL DE
TETRAZOLIO, 3(4,5-dimetiltiazolil-2-il)2,5bromuro difeniltetrazolio (MTT) PARA
DETERMINAR LA PROLIFERACION in vitro DE LINFOCITOS DE BOVINO (Bos taurus)

realizado por

ELIZABETH ACOSTA GARCIA
con número de cuenta 3022577-1 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis DR. CARLOS RAMON BAUTISTA GARFIAS
Propietario

Propietario M. en C. ICELA IVONNE TOLEDO GARCIA

Propietario M. en C. Ma del PILAR TORRES GARCIA

Suplente M. en C. CLAUDIA KARINA TORRES VILLASENOR

Suplente Biol. TERESA SOSA RODRIGUEZ

Edna M. Suarez D.
Consejo Departamental de Biología

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

A mi Maestro por su apoyo y confianza

A mi Maestra, que con su entusiasmo, amistad y dedicación, me ayudó a lograr la meta más preciada.

Para dos maravillosas Mujeres que me ayudaron a reafirmar el valor de la palabra AMISTAD.

Para mi hermano por sus palabras de aliento cuando lo necesitaba.

Pero sobre todo a mi madre por brindarme la oportunidad de estudiar y realizarme como Profesionista, GRACIAS.

Y a todas las personas que de manera directa o indirecta me apoyaron y asistieron con su conocimiento, entusiasmo y compañerismo. MUCHAS GRACIAS

Todas las preguntas tienen una respuesta y todos los problemas una solución.
Las metas se logran trabajando en ellas y no esperando que sucedan.

Este trabajo fué realizado bajo la dirección del Dr. Carlos Ramón Bautista Garfias, en las instalaciones del CENID-PAVET-INIFAP, en Jiutepec, Morelos, y bajo la asesoría de la M. en C. Iceia Ivonne Toledo García del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM, en Cuernavaca, Mor.

El presente trabajo fué financiado con recursos del proyecto
CONACYT-INIFAP: "Evaluación de la respuesta inmune celular en
bovinos infectados con *Anaplasma marginale*", clave N° K0009-
B9710.

UTILIZACION DE LA SAL DE TETRAZOLIO, 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT) PARA DETERMINAR LA PROLIFERACION *in vitro* DE LINFOCITOS DE BOVINO (*Bos taurus*).

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

OBJETIVOS

ANTECEDENTES

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

INTRODUCCION

El origen de la Inmunología (ciencia que estudia los mecanismos de defensa de los seres vivos), surgió del conocimiento común de que las personas habían sobrevivido a una enfermedad infecciosa, raramente volvían a contraerla durante su vida. Tucídides relata que, cuando la peste hizo estragos en Atenas, los enfermos y los moribundos no hubieran recibido ninguna clase de cuidados, de no ser por la dedicación de aquellos que ya habían sufrido la enfermedad y habían sanado, partiendo de la experiencia de que nadie la padecía por segunda vez (Humphrey, 1964).

En 1733, Voltaire describió la costumbre china practicada en el siglo XV sobre la inducción profiláctica de la viruela, por la aspiración a través de la nariz de polvos secos procedentes de las costras de la viruela, además de mencionar a los turcos que habían adoptado la costumbre de la inoculación de las pústulas, escogidas entre las mas corrientes.

Esta práctica llamada "Variolación", no era considerada muy segura ya que podía originar riesgos con resultados tal vez fatales. Riesgo aceptable en esa época si se tiene en cuenta que, en la Inglaterra de ese tiempo, 60 personas de cada 100 padecían la viruela y de estas 60, unas 20 morían en la flor de la vida y 20 más sobrevivían con las desagradables huellas de la misma (Humphrey, 1964).

Así, el primer paso hacia un procedimiento más racional, fué el de sustituir la procedencia del material inoculable, obteniéndolo de las lesiones producidas en las vacas por la misma enfermedad. Fué en 1774, cuando Benjamín Jesty, granjero de Dorsetshire, UK, obtuvo el virus en Chinttenhall, cerca de Yetmiste, (directamente de las vacas del granjero Eldford), con lo que inoculó a su esposa en el brazo debajo del codo con un alfiler. (Humphrey, 1964).

El primer médico que se dedicó de forma metódica a experimentar, para la comprobación del poder profiláctico de la vacuna para prevenir la viruela, fué Edward Jenner, nacido en Gloucestershire, UK, en 1749. Él publicó en 1798 su primera memoria "Investigación sobre las causas y efectos de la vacuna de la viruela" y aunque las experiencias acumuladas por Jenner parecían concluyentes, la práctica de

aquellas chocó con una oposición violenta. Posteriormente, logró su aceptación por una declaración pública hecha por más de 70 de los principales médicos y cirujanos de Londres. Estos conocimientos dieron pauta al desarrollo de la Teoría del origen de las enfermedades, que fué el objetivo de los estudios de Pasteur, quien, aunque estaba interesado en el estudio de los gérmenes, tenía más interés en el origen de las enfermedades causadas por estos, naciendo así el primer Inmunólogo Experimental (Humphrey, 1964).

El primer experimento surgió de un accidente de laboratorio. El cólera del pollo es debido al bacilo del mismo nombre (*Vibrio cholerae*), y Pasteur poseía un cultivo que había sido abandonado en un banco del laboratorio durante unas vacaciones; dichos gérmenes, al ser utilizados posteriormente demostraron haber perdido mucha de su capacidad para producir la enfermedad en el pollo. Además, los cultivos frescos dejaron también de infectar a los pollos que previamente habían sido inoculados con el cultivo viejo, mientras que producían la enfermedad en las aves que no habían sido tratadas con aquél cultivo. Estos resultados le indicaron que los gérmenes virulentos habían sido atenuados. Este cambio, Pasteur lo reprodujo más tarde en otros cultivos manteniéndolos bajo condiciones anaerobias bastante tiempo.

Por la semejanza entre las condiciones y el método de Jenner con la Variolación, Pasteur llamó a su tratamiento "Vacunación", término acuñado desde entonces para designar la inyección de bacterias, virus y productos como el polen, como métodos para producir una inmunidad para la enfermedad futura.

Fué cuestión de meses lo que se necesitó para descubrir el mismo fenómeno con el ántrax (*Bacillus anthracis*) con el mismo procedimiento, es decir, mantener al agente infectivo bajo condiciones adversas "in vitro", esta vez se mantuvo el cultivo entre 42°C-43°C, así se obtuvieron bacilos modificados que se utilizaron para preparar la vacuna usada para el famoso experimento de Pouilly- Lefort, en el cual, 24 carneros, una cabra y seis becerros, fueron protegidos para tolerar la dosis virulenta del bacilo de ántrax, que por otra parte mató a la mayoría de los animales no vacunados. Otro método de atenuación fué desarrollado mediante pases en seric, de el mismo germen a conejos. Los conejos desarrollaron la infección y murieron, pero, los gérmenes recuperados, fueron menos virulentos para los cerdos, aunque fueron más para las especies homólogas (como el conejo). El pase del germen por palomas produce el efecto contrario, ya que aumenta la virulencia con respecto al cerdo. Partiendo de esto,

el procedimiento de vacunación de Pasteur consistió en una serie preliminar de inyecciones de bacilos atenuados por pases a través de conejos, seguida de otra serie con gérmenes de virulencia aumentada por pases a través de palomas.

Pero el más dramático de todos los procedimientos de vacunación de Pasteur, fué el que utilizó para combatir la enfermedad humana de la Hidrofobia o "rabia". La atenuación de este virus fué obtenida, secando al aire las médulas espinales de conejos infectados. Pasteur, pudo demostrar que, con inyecciones diarias de la emulsión de dichas médulas (que fueron sustituidas por médulas secadas durante un breve espacio de tiempo), no solo protegían a los perros del virus de la máxima virulencia, si no también contra la enfermedad inducida por inyección de la saliva del conejo (Humphrey, 1964).

Además, con el fin de darle una utilidad práctica, la vacuna tenía que obrar, aún cuando la enfermedad provocada por el virus ya estuviese presente en el organismo. Por fortuna, la incubación del virus es excepcionalmente larga ya que dura de una a tres semanas. El experimento de vacunar a un perro después de una mordedura rabiosa, demostró que la protección era posible si se efectuaba al principio del periodo de incubación.

Después de estos experimentos preliminares, se presentó la oportunidad para probar el procedimiento en un paciente humano ya que en Julio de 1875, le fué llevado a Pasteur un muchacho con graves y múltiples mordiscos de un perro que con seguridad era rabioso. La primera de la serie de 13 inyecciones de emulsión de médula, le fué administrada tres días después de las mordeduras y el muchacho sobrevivió.

El riesgo que implicaba el uso de una agente atenuado solo podía medirse en la práctica veterinaria, pero para el hombre era preciso buscar un procedimiento mas seguro. Así, en 1886, tuvo lugar un notable avance gracias a Salmón y Theobal Smith, quienes demostraron que los cultivos del vibrión colérico procedente de pollos, muertos por acción del calor, eran también capaces de prevenir la infección en las palomas. Esto les demostró que la inmunidad, también se lograba por la introducción de materia orgánica muerta.

La inmunología por este tiempo, llegó al descubrimiento de la formación de un

anticuerpo durante el proceso de inmunización y, es en 1888, que Roux y Yesin descubren que, un filtrado libre de gérmenes de un bacilo diftérico, contenía la exotoxina de este germen, lo que sugirió que la inmunidad podría desarrollarse contra tal toxina y que ello se debía, a la formación de una sustancia específica neutralizante (antitoxina), y que la inmunidad podría ser transferida a otro animal es decir, que podía ser conferida pasivamente.

Este resultado fué obtenido por primera vez, con la antitoxina tetánica por Von Behring y Kitasato; el primero demostró también lo mismo con la antitoxina diftérica. El organismo probó ser capaz de producir anticuerpos específicos (designados anticuerpos) y se demostró también que podían formarse antitoxinas contra antitoxinas, aunque no tuvieran origen bacteriano.

Por otro lado, Richard Pfeiffer en 1894, demostró que en un animal inmunizado contra el vibrión colérico, aparecen anticuerpos específicos que originan la muerte y lisis de dichos gérmenes y que, mediante el suero de este animal, la inmunidad podía ser transferida a otro animal sano. Poco después, se descubrieron otros dos fenómenos propios del suero antibacteriano, la aglutinación y la precipitación. En 1896, Widal aplicó a la clínica esta reacción aglutinante para el diagnóstico de la fiebre tifoidea y en 1897, Kraus demostró que el tipo de anticuerpo llamado "precipitina" podía formarse con regularidad después de la inyección de una gran variedad de proteínas y polisacáridos complejos, (siendo condición esencial, que fueran ajenos al animal al cual eran inyectados) y sobre estas bases, nació la era de la sueroterapia que condujo a posteriores conocimientos respecto a las propiedades inmunológicas del suero.

En 1893, Buchner demostró que el suero en estado fresco, era capaz de matar ciertos gérmenes además de que perdía esa facultad después de haber sido calentado a 56°C. El agente termolábil que ayudaba a su acción bacteriana fué llamada "Alexina" (su sinónimo moderno es el de complemento). El hecho evidente de la presencia de una actividad antitóxica y antimicrobiana, se consideró suficiente para explicar el mecanismo de inmunidad a las enfermedades infecciosas. Punto de vista vigorosamente combatido, ya que se atribuía a las células el principal papel en la inmunidad más que a los factores humorales.

Defensor de esta idea fué el ruso Elie Metchnikoff, quién estaba convencido de que la fagocitosis realizada por los leucocitos constituía el factor preponderante de la inmunidad. El, si bien admitía la función de los componentes del suero, negaba que

contribuyeran en absoluto a la inmunidad innata o no específica, así que, al aceptar el concepto de que la fagocitosis era importante para la resistencia a las infecciones fué un proceso gradual.

Hoy día, se acepta ampliamente que, la importancia de la fagocitosis y de los factores humorales difieren con la especie del huésped y con la naturaleza del elemento patógeno.

Almroth Wright, propone que la principal acción de un anticuerpo específico (que existe en grandes cantidades después de la infección), es la de reforzar la acción destructiva de los fagocitos, propiedad que llamó "opsónica" del griego *opsono* (preparo alimento para) y a la substancia misma, la "opsonina".

Hasta aquí, se ha considerado la relación entre el concepto de inmunidad y la resistencia a las infecciones. Sin embargo, se debe hacer notar la característica primordial de los anticuerpos que es su especificidad. Cuando los inmunólogos se dieron cuenta de la selectividad de tal mecanismo, pronto lo utilizaron para analizar la composición antigénica de los gérmenes y otros complejos antigénicos.

En 1900, Landsteiner empleó el antisuero natural, para el conocimiento de los diferentes componentes antigénicos en los hematíes de varias personas, (estos son los grupos sanguíneos A, B y O), poco después, Uhlenhuth en 1901, publicó varios trabajos sobre la diferenciación de las claras del huevo de diversas especies de pájaros por el método de la precipitina, preparando el camino para la aplicación de esta reacción con fines forenses, para poder reconocer la presencia de sangre humana en las manchas de sangre. Existe sin embargo un límite a esta precisión (como las globulinas del suero humano y de mono inyectadas a conejos), los anticuerpos de un antígeno pueden reaccionar con otro aunque generalmente con menos intensidad a lo que se le llama "reacciones cruzadas".

A principios de este siglo, varias investigaciones centraron su interés en los aspectos fundamentales sobre la manera por la cual, el anticuerpo actúa con su antígeno homólogo. Fué una contribución importante la hecha por Paul Ehrlich, (que puede considerarse pionero de la Inmunoquímica), cuando en 1897, concibió la teoría general de la inmunidad, la cual bajo el nombre de la teoría de "La cadena lateral" o

"del receptor", tuvo una profunda influencia para estimular los trabajos fundamentales sobre el mecanismo de la producción del anticuerpo.

La opinión teológica sostenida de que la formación de un anticuerpo era destinada específicamente a proteger al huésped infectado, tuvo una franca oposición como consecuencia de la observación de que a veces, la entrada del antígeno en el organismo ocasionaba una sintomatología grave y aún la muerte. Este fenómeno por el cual una respuesta inmunitaria conduce a reacciones nocivas por las células del organismo, se le conoce con el nombre de Hipersensibilidad.

Datos proporcionados por Porter-Richerd en 1902, llamaron al desarrollo de la sensibilidad por substancias relativamente inocuas, (las reacciones anafilácticas), así como las tentativas para establecer su patogenia, fueron objeto de gran interés antes de la primera Guerra Mundial, dando origen a hipótesis muy semejantes. Se sugirió y experimentó para comprobarlo, que cuando un antígeno y un anticuerpo reaccionaban juntos en el plasma, activaban una enzima proteolítica latente que, provocaba la sedación y diseminación de fragmentos altamente tóxicos del antígeno, a esto se debía la sintomatología propia de la anafilaxis. Es difícil dar una explicación lógica a este fenómeno, por el hecho de que un animal que ha sido sensibilizado con el fin de someterlo a un choque anafiláctico mediante la inyección del antígeno, a veces no presenta ningún anticuerpo circulante detectable.

Dale, en 1910, descubrió las propiedades farmacológicas de la histamina y demostró que las inyecciones de la misma, reproducían muchos si bien no todos, a los síntomas de la anafilaxis. La histamina estaba presente en la sangre o en las células de los tejidos pero no en el plasma y la interacción del antígeno con el anticuerpo dañando a estas, originaban la liberación de la histamina y quizás otras manifestaciones, lo que parecía proporcionar una explicación satisfactoria de este fenómeno.

La idea se ratificó cuando se comprobó que tanto la teoría celular como la humoral son válidas en diferentes aspectos. Muchas investigaciones, algunas sistemáticas y otras exploratorias, fueron llevadas a cabo sobre la capacidad de diversas células (generalmente hematíes) y de tejidos de diferentes especies, para producir anticuerpos, realizándose repetidos ensayos para observar hasta que punto ocurrían reacciones cruzadas entre los anticuerpos y los extractos de tejidos obtenidos de diferentes especies. La consecuencia de este estudio fué en buena parte debido a Witedski, quien demostró que algunos tejidos (cristalino, páncreas, tiroides y cerebro), contenían

materias antigénicas específicas del tejido pero que eran, al menos en parte, comunes a muchas especies como en el caso del cristalino. Los anticuerpos preparados contra el tejido extraño reaccionaban "*in vitro*" con el correspondiente tejido de la especie donde se habían creado los anticuerpos; los intentos para inmunizar animales contra los tejidos obtenidos de la misma especie no tuvieron éxito, por lo general, en ningún caso fué posible atribuir alteraciones patológicas a la autoinmunización, ya que el organismo no reaccionaba contra sus propios constituyentes. Para la mayoría de los inmunólogos, esta opinión permaneció incólume hasta que Coombs, en 1954, introdujo la prueba de la antiglobulina para los anticuerpos RH y al año siguiente Boorman, Lout y Dodd, utilizaron la prueba para demostrar que ciertos pacientes de Anemia Hemolítica Adquirida poseen anticuerpos contra sus propios hematíes.

El interés hacia las investigaciones sobre la patología de las reacciones inmunológicas, realizadas en animales de experimentación, aumentó en gran manera y ha recibido hoy, un nuevo ímpetu y constante estímulo para el desarrollo de la inmunología, la cual constituye una gran esperanza para lograr eficaces medios para defender al hombre y a los animales domésticos contra las enfermedades.

Con la aparición de las sulfamidas en 1936 y de la penicilina en 1941, seguida de una variedad de antibióticos y agentes quimioterapéuticos, se sobrepasaron en mucho a las esperanzas de antaño. Al mismo tiempo que se fué comprobando de manera evidente el éxito de la terapéutica (Quimioterapia) contra infecciones bacterianas, se puso de relieve sus deficiencias para combatir enfermedades producidas por virus. El perfeccionamiento de ciertos métodos para conseguir el crecimiento y la purificación de los virus, unido a una mejor comprensión de su epidemiología, han hecho que la inmunización activa contra varios virus, sea inofensiva, fácil y eficaz. Al mismo tiempo, se cuenta con métodos perfeccionados de cultivos y con una mejor conservación de los componentes antigénicos importantes y con un mínimo de factores tóxicos.

Del estudio de las enfermedades Inmunológicas en todas sus facetas, se han derivado la mayor parte de los conocimientos que hoy poseemos de los grupos sanguíneos y uno de estos fue, el conocimiento de que los anticuerpos (Acs) se unían con sus antígenos (Ags) correspondientes, dejando de producir no obstante, la aglutinación subsiguiente, conduciendo este hecho, al desarrollo de una teoría para el conocimiento de tales Acs desarrollada por Coombs, Mourant y Race en 1945. Dicha prueba consistía en la

sensibilización de la antiglobulina, aplicando a las células cubiertas con el anticuerpo no aglutinante Rh, el anticuerpo preparado en contra de la globulina humana, con el fin de hacerlas en un segundo proceso.

Se ha demostrado hace muy poco, la existencia de varios Ags específicos, en células como leucocitos o células epiteliales. Además de la individualidad antigénica de los animales no necesariamente los llamados pura sangre. Es de vital importancia dicha individualidad, en los trabajos sobre el transplante de tejidos como la piel y órganos.

El proceso para explicar el mecanismo de la interacción Ag-Ac y su introducción en la práctica, ocurrió independientemente del conocimiento de la naturaleza química de los Acs ó de las células en las que se forman. Fué hasta 1938, que Tiselius y Kabat demostraron que los Acs eran gamaglobulinas, que poseen ciertas propiedades comunes como las de emigrar en un campo electroforético de manera diferente y que se conocen como α , β y γ globulinas.

¿En dónde se originan los anticuerpos? Ya en 1898, Pfeiffer y Mark habían deducido que la mayor parte de ellos debían de tener su origen en el bazo, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el pulmón. Sin embargo, las células productoras de Acs no fueron identificadas sino hasta que Fagraeus en 1948, demostró que la formación de Acs no sólo estaba más íntimamente ligada con el desarrollo de las células de la serie plasmática, sino además, con otras variedades citológicas como las de la pulpa roja del bazo (que también producían Acs si se cultivaban "*in vitro*").

Sin embargo, ciertas clases de hiperreactividad a los antígenos no están asociadas a una circulación apreciable de Acs, ni a la formación de células plasmáticas, como la llamada hipersensibilización de la reacción del paciente tuberculosos a la tuberculina, la dermatitis eczematosa y numerosos procesos importantes en clínica.

Zinsser, hizo especial hincapié en el hecho de que la reintroducción de bacterias en el organismo, provocan una respuesta que difiere de la producida por el organismo a simples Ags protéicos (anafilaxia o respuesta de Arthus). La importancia de la alergia bacteriana (así llamada) en la tuberculosis, fué reconocida por Koch en 1890, siendo más tarde estudiada y destacada por Rich.

En 1928, Dienes demuestra que los Ags de proteínas simples pueden también provocar una respuesta similar bajo ciertas condiciones (si se inyectan en el mismo justo antes de que aparezcan los Acs circulantes) pudiendo ser más activas que otras.

En resumen, tenemos que en los años que siguieron al descubrimiento de las bacterias y en los que fué comprobada la formación de Acs, se realizaron rápidamente progresos en Inmunología, (por ejemplo, se describió la existencia de un factor auxiliar, el complemento).

La siguiente generación fué testigo de un proceso de consolidación y ampliación de los conocimientos y de la aplicación de los mismos a la práctica. Fué hasta 1930, que volvió a acelerarse el ritmo con el descubrimiento del concepto fundamental de la naturaleza de los Abs y su interacción con los Ags, al igual que sobre la dinámica del metabolismo de los Acs y la naturaleza de las células que actúan en la producción de la inmunidad. Ya era el tiempo adecuado para intentar reunir todos los hechos conocidos en un armazón teórico-general, pero se necesitaba una hipótesis para explicar no sólo como ó por qué se produce la respuesta inmunitaria debida a la introducción de sustancias antigénicas extrañas, sino también el por qué no se produce con los constituyentes del propio organismos animal que puedan ser antígenos activos en otras especies.

En nuestros días, casi el 10% de los trabajos científicos, están relacionados con la Inmunología ó con el empleo de métodos inmunológicos; el ritmo de avance se ha acelerado y es tan grande, que es imposible evitar aspectos de controversia o ideas que estan cada día cambiando constantemente, ya que lo que hoy puede ser considerado como verdadero, podría ser falso a la vuelta de la hoja.

Por Inmunidad se entiende al conjunto de las propiedades de un organismo gracias a las cuales, este puede ofrecer resistencia contra agentes nocivos, dichos mecanismos son varios y aumentan de forma creciente dependiendo de el grado de agresividad del invasor. Así tenemos a:

- 1).- Factores innatos (Inmunidad Natural).
- 2).- Fagocitos.
- 3).- Inflamación.
- 4).- Inmunidad Específica.
- 5).- Sistemas Complementarios y Amplificadores (Complemento, Properdina e Interferón).

Para efectos del presente trabajo, la Inmunidad Específica es la que nos reporta un interés especial, ya que dicha respuesta contribuye a reforzar la acción defensiva de los primeros mecanismos de defensa. Está integrada por los Linfocitos que circulan en la sangre, por los órganos, los tejidos y por lugares específicos como son el Timo y el Bazo. Estos últimos dan origen a diferentes poblaciones celulares dependiendo de su origen; así los linfocitos T son timo dependientes y se originan en la médula ósea, que posteriormente migran al Timo, en donde reciben algunas modificaciones adicionales para entrar en circulación. Los otros dan lugar a una serie llamada Linfocitos B que maduran en la Bolsa de Fabricio (en las aves) o en la médula ósea (en los mamíferos) y al recibir un estímulo adecuado, se transforman en células plasmáticas responsables de la producción de anticuerpos.

LINFOCITOS T

A diferencia de los B, los linfocitos T cumplen muchas funciones diferentes que son esenciales para la protección contra bacterias intracelulares, contra virus, contra injertos y contra algunas células tumorales (respuesta celular). Su crecimiento progresivo podemos seguirlo desde su etapa pre-tímica, después en el timo y posteriormente en los órganos linfoides secundarios. Puede demostrarse que los receptores de superficie de los linfocitos T y los antígenos de la membrana celular, son formados en etapas específicas del proceso; así, cada subpoblación de linfocitos, se caracteriza por sus antígenos de superficie celular y por sus receptores, como resultado de esto, todos los linfocitos T maduros tienen antígenos CD2 y CD3 en su superficie. dos terceras partes de los linfocitos tienen antígenos CD4 y cumplen funciones de células cooperadoras y el tercio restante, tiene otro antígeno llamado CD8 y funcionan

como células supresoras o como citotóxicas. Estos linfocitos T supresores tienen receptores Fc para IgG, en tanto que las células T colaboradoras tienen receptores Fc para IgM.

Si bien los linfocitos B se unen a un antígeno y responden a él, si está en una membrana celular ó en solución, los linfocitos T sólo responden a un antígeno de histocompatibilidad de clase I o II sobre otras células. Tanto los linfocitos T como sus células blanco, deben tener idénticos antígenos de histocompatibilidad, por eso, los T citotóxicos (CD8) sólo puedan matar a blancos que compartan con ellos los antígenos de histocompatibilidad tipo I y, los linfocitos T colaboradores (CD4), sólo promoverán una respuesta inmunitaria si el antígeno comparte con ellos antígenos de la clase II. Por lo tanto, el receptor para los antígenos de los linfocitos T debe ser capaz de reconocer no sólo el antígeno exógeno, sino también a un antígeno de histocompatibilidad, por lo que éstos receptores están formados por varias proteínas. Para que un linfocito responda de manera óptima a un antígeno, se necesita la interacción de tres células; 1.- La que presenta al antígeno. 2.- Un linfocito T efector (CD8), (célula que es en verdad la mediadora de las respuestas) y 3).- Un linfocito T colaborador (CD4), o cooperador, (Tizard,1989).

OBJETIVOS:

GENERAL

Demostrar que la sensibilidad de la prueba colorimétrica de la Incorporación de MTT es semejante a la del método radioactivo de Timidina- H^3 a linfocitos, con el fin de erradicar el uso de esta segunda técnica tan costosa y agresiva por naturaleza.

PARTICULARES

1) Evaluar el uso de un método colorimétrico (Incorporación de MTT en el núcleo celular) para medir la proliferación *in vitro* de linfocitos de bovino frescos y congelados ($-70^{\circ}C$) y descongelados en respuesta al mitógeno Concanavalina A (Con A).

2) Determinar la proliferación de linfocitos de bovinos resistentes a la infección por *Anaplasma marginale*, en respuesta a un antígeno de esta rickettsia, por medio de la incorporación de Timidina tritiada (H^3) y MTT.

ANTECEDENTES

Aspectos inmunológicos de la relación huésped-parásito. (H-P)

La relación huésped-parásito es un vínculo de naturaleza dinámica, lo cual implica que ésta, constantemente cambia. Por una parte, el huésped, por medio de sus mecanismos de defensa (específicos e inespecíficos) trata de eliminar al parásito, pero por el otro lado, el parásito, cuando invade las células u órganos internos del huésped, utiliza sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune para sobrevivir.

En términos generales, la respuesta inmune en los mamíferos, se inicia con el reconocimiento, la internalización, la digestión y el procesamiento de sustancias extrañas (antígenos) ejecutado por los macrófagos o células presentadoras de antígeno (CPA), las que presentan en su superficie membranal, determinantes antigénicos (epitopos) de la sustancia extraña, en combinación con las moléculas de Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH). A continuación, los linfocitos T cooperadores (Th, $CD4^+$), por medio del receptor de T, reconocen dicha combinación y posteriormente los macrófagos o las CPA liberan la interleucina 1 (IL1) que influye sobre los linfocitos Th, de los cuales hay dos subclases: los Th1 y los Th2. Los primeros, producen esencialmente interleucina 2 (IL-2) e interferón-gamma (IFN- γ), mientras que los Th2 producen Interleucinas 4 (IL-4), 5 (IL-5), 6 (IL-6) y 10 (IL-10). El IFN- γ , entre sus muchas actividades, activa macrófagos, los que incrementan su fagocitosis y producen radicales libres reactivos del Oxígeno, así como también Oxido Nitroso (ON) y el Factor de la Necrosis Tumoral-alpha (TNF- α), que son unas moléculas letales para muchos microorganismos, (como por ejemplo los Tripanosomas). Por su parte, las IL-4 e IL-5 actúan sobre los linfocitos B para que produzcan anticuerpos, mientras que la IL-10 reduce la secreción de las citocinas de los Th1. En este sentido, recientemente se ha demostrado la participación de los linfocitos Th1 en la protección contra diferentes enfermedades como son: la tuberculosis, la leishmaniasis, la toxoplasmosis y la malaria, entre otras.

La relación huésped-parásito es multifactorial y como se indicó anteriormente, bastante compleja, cabe señalar que cuando se confrontan el huésped y el parásito, pueden ocurrir las siguientes consecuencias generales:

- 1).- El parásito no se establece en el huésped debido, entre otras causas, a que no dispone de ligandos (moléculas de adhesión), específico para receptores sobre el huésped; o bien el parásito es incapaz de franquear los mecanismos de defensa (inespecíficos y específicos) del huésped.
- 2).- El parásito mata al huésped, debido a que la biomasa de los parásitos es muy grande o a que el sistema del huésped, entre otras razones, no puede eliminar al parásito.
- 3).- El parásito se establece y el huésped se recupera de la infección. En este caso, el Sistema Inmune del huésped genera una respuesta específica que elimina al parasitismo, sin embargo, en la mayoría de los casos, no se elimina a la totalidad de las infecciones crónicas.
- 4).- El parásito se establece, el huésped genera una respuesta inmune pero que lo daña a él mismo, es decir se producen manifestaciones inmunológicas, y:
- 5).- Se establece un equilibrio entre el huésped y el parásito; o sea, ocurre una coexistencia entre ambos miembros de la relación. Por una parte, el parásito disminuye su inmunogenicidad (que es parte de sus mecanismos de inmunoevasión) y por otra, el huésped ofrece una menor respuesta (se hace tolerante) al parasitismo.

La Anaplasmosis bovina como ejemplo de la relación H-P.

La Anaplasmosis, es una enfermedad infecciosa no contagiosa, transmitida por artrópodos hematófagos. Los bovinos, ovinos y algunos ruminantes silvestres son susceptibles a la enfermedad, la cual es causada por rickettsias del género *Anaplasma* que infecta a los eritrocitos de los animales antes mencionados, causando: elevadas temperaturas, anemia severa, múltiples disturbios fisiológicos e incluso la muerte. La distribución de la enfermedad es mundial. Su importancia como enfermedad del ganado es mayor en las zonas tropicales y subtropicales.

Como ya se mencionó, la transmisión del agente puede ser de tipo biológica o mecánica. En la primera, se encuentran involucrados varios géneros de garrapatas, los más importantes son *Boophilus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes spp.* y *Rhipicephalus spp.*

La transmisión del organismo, puede ocurrir de manera mecánica a través de la intervención de insectos hematófagos como serían las moscas de establo (*Stomoxys calcitrans*), mosquitos de los géneros *Siphona spp.*, *Psorophora spp.* y los tábanos (*Tabanus spp.*).

Los cuerpos iniciales, invaden a los eritrocitos maduros del hospedero después de su inoculación directa por los insectos chupadores. El periodo de prepatencia (periodo comprendido entre la inoculación y el momento de la detección del agente por observación de éste al microscopio de laminillas de sangre infectada), es de 41 días. Son parásitos intracelulares obligados, que aparecen en el eritrocito como cuerpos de inclusión de 0.3 a 1 mm que se sitúan marginal o centralmente dependiendo de la especie (*A. marginale* o *A. centrale*). Los únicos vectores biológicos conocidos hasta ahora son las garrapatas ixódidas. El ciclo continúa cuando el vector se infecta al consumir sangre del hospedero, las formas infectivas, se transportan probablemente de la hemolinfa a las glándulas salivales, desde donde son inoculadas al hospedero vertebrado. El periodo de presentación clínica es más intenso en los animales adultos que en los terneros. Durante el periodo de patencia, los eritrocitos infectados son removidos de la circulación por las células fagocíticas del Sistema Reticuloendotelial, particularmente del bazo.

La anemia máxima ocurre entre el 1 y el 6 día, posteriores a la máxima parasitemia, en este momento, un número de eritrocitos aparentemente sanos parece ser removido por macrófagos del bazo y de la médula ósea roja. La remoción puede persistir de 4 a 10 días y un animal puede perder hasta el 75% de sus eritrocitos circulantes. La convalecencia puede durar de 1 a 2 meses, sin embargo en animales viejos, esta se puede prolongar hasta por 3 ó 4 meses debido a recrudescencias de los parásitos. Los animales jóvenes sólo son receptores y sólo se enferman si se les extirpa el bazo. (Bautista, 1996).

El ganado que sobrevive, usualmente permanece sub-clínicamente infectado y son portadores, siendo inmunes a subsecuentes infecciones por al menos varios años y puede ser retenida esta inmunidad, por al menos ocho meses después de la eliminación de la parasitemia latente con quimioterapias. La protección contra varias Anaplasmosis puede ser inducida por vacunación, usando parásitos muertos purificados o por infección de becerros con las especies menos patógenas de *A. centrale* (Theiler, 1912).

Los anticuerpos anti-*Anaplasma* son rápidamente detectados en becerros infectados con *A. marginale* sin embargo, Gale *et al*, en 1992, demostraron que la transferencia de suero inmune contra éste patógeno de becerros infectados o vacunados hacia bovinos susceptibles, no confería protección contra la infección. Zaig y Kutiker, en 1984, también reportaron que los anticuerpos "per se", no son protectores contra la

Anaplasmosis bovina, al observar que becerros nacidos de madres inmunes, no eran protegidos por los anticuerpos del calostro, por lo que se puede inferir que la inmunidad contra *A. marginale*, es conferida por la respuesta inmune mediada por células (CMI), tales como las células -T específicas, mediadas por la activación de macrófagos, la cual opera durante la resolución de muchas otras infecciones bacteriales y rickettsiales intracelulares (Kiderlen *et al*, 1984; Li, *et al*, 1987; Zhan y Cheers, 1993). Por lo que se deben desarrollar métodos adecuados para analizar dicha respuesta.

Entre las pruebas que se utilizan para verificar la funcionalidad del sistema inmune de un vertebrado en general, se encuentra el ensayo de linfoproliferación '*in vitro*', en respuesta a un antígeno en particular o a un mitógeno.

El método más utilizado en los últimos años para verificar la linfoproliferación, es el de la Incorporación de timidina tritiada, sin embargo, para realizarlo se requiere del uso de isótopos radioactivos los cuales pueden ser un contaminante para el medio ambiente. Además del peligro que representa esto para la persona y el area donde se lleva a cabo dicho ensayo, se presenta la necesidad de algún lugar especial para los desechos radioactivos después de cada prueba. Por esta razón, la tendencia actual es la de sustituir en lo posible, todas estas pruebas de alto riesgo, con el uso de otras sustancias inocuas como el MTT, que se utiliza en lugar del isótopo en un ensayo similar, para los mismos fines. El MTT es una sal de Tetrazolio que ha sido usada para desarrollar un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia y proliferación de células de mamífero (Mosmann, 1983).

MATERIAL Y METODOS:

-Material biológico: Se trabajó con diez bovinos, raza Holstein de 12 meses de edad y con un peso aproximado de 300Kg cada uno, que fueron obtenidos de los estados de Querétaro y Chihuahua, los cuales fueron mantenidos en corrales dentro de las instalaciones de el INIFAP-SAGAR, del estado de Morelos.

-Concanavalina A, marca SIGMA Mo. USA (sol. stock de 1 mg/ ml) en RPMI no complementado.

-Antígeno de *Anaplasma marginale* (500 µg / ml), aislado de Morelos y donado por el Dr. Miguel Angel García del CENID-PAVET, INIFAP-SAGAR, Morelos.

METODOS DESARROLLADOS

- a) Obtención de linfocitos de sangre periférica.
- b) Método de congelación y de descongelación de linfocitos
- c) Ensayo de linfoproliferación.
- d) Determinación de la concentración óptima de la Concanavalina A en el ensayo.
- e) Proliferación inducida por un antígeno específico.
- f) Incorporación de Timidina- H^3 .

a) Obtención de linfocitos de sangre periférica

Se tomó la muestra de sangre por punción rectal o yugular (10ml) y se colocó en tubos estériles con una concentración conocida de EDTA para evitar su coagulación y se identificaron para cada espécimen. Para la obtención de las células mononucleares se utilizó el método reportado por Gasbarre *et al*, 1985, modificado. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de completa esterilidad, (campana de flujo laminar).

Procedimiento: Primero se colocan 5 ml de una sol. de Hanks balanceada, (sin Ca^{++} y Mg^{+}) SIGMA, adisionada con 10mM de EDTA, dentro de una jeringa de 10ml, a este volumen se le añaden 5 ml de muestra sanguínea en EDTA, en una relación 1:1, v / v y se mezclan ambos volúmenes dentro de la jeringa por inversión (5 veces), posteriormente se colocan los 10ml de la mezcla sobre 5ml de Ficol (Hypaque) colocados previamente en un tubo estéril cónico de centrifuga de 15ml de capacidad, teniendo cuidado al depositarlos, de no perturbar la interfase.

Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm x 20 min a 10°C y seguido de esto se colectan gentilmente con una pipeta Pasteur estéril, tratando de no arrastrar con la interfase formada únicamente por linfocitos y así, los transferimos a un nuevo tubo estéril, para lavarlos con 10 ml de solución estéril de Hanks, a 1500 rpm x 10 min a 20°C y por 3 ocasiones .

Descartando el sobrenadante, nos quedamos con el paquete celular, que se resuspende en 0.1 ml de RPMI complementado con suero fetal bovino (inactivado por calor a 56°C x 30 min, al 10%, v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina- estreptomycin (200UI-200 μg /ml), HEPES, 2.38 g/l, 2-mercaptoetanol , 50 μM , bicarbonato de sodio 27 mM, L-arginina, 116 mg/l y L- asparagina, 36 mg / l.

b).- Método de congelación y descongelación de linfocitos

Después de obtener las células como se indica en el inciso a), fueron resuspendidas en 0.1 ml de RPMI a una concentración de 6×10^7 / ml y colocadas en un criotubo, inmediatamente después, se les añadió 0.9 ml de SFB (90%) y DMSO (10%) y se congelaron a -70°C para su uso posterior. En el momento de su utilización, se descongelaron a temperatura ambiente y fueron centrifugados a 1000 rpm x 10 min a

10°C descartando el sobrenadante y resuspendiendo el paquete celular en RPMI complementado, ajustando las células a una concentración de 1×10^6 para cada ensayo (Gale *et al*, 1996).

c) Ensayo de linfoproliferación

Se comenzó por determinar la viabilidad celular por adición de 90 μ l de Azul de tripano al 0.4% a 10 μ l de suspensión celular en RPMI, (dil 1:10). Se colocaron 10 μ l de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se procedió a leer al microscopio los cuadrantes exteriores. Las células muertas se distinguieron de las vivas porque el colorante penetra muy fácilmente a su interior.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células viables} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células vivas contadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas}} \times 100$$

Nota: El conteo debe hacerse dentro de los 10 primeros min de preparada la muestra, por ser el colorante tóxico a las células, dando un falso aumento en el número de células muertas, (azules).

Una concentración conocida de células vivas se colocan en las microplacas de cultivo celular, (de 96 pozos con fondo plano), en todos los casos se colocaron 5×10^5 de células. (Gale *et al*, 1996).

d).- Determinación de la concentración óptima de la concanavalina A en el ensayo.

Se utilizaron concentraciones crecientes de Concanavalina A (Sigma, Mo, EUA) en el ensayo, es decir: 5, 10, y 20 $\mu\text{g/ml}$ que se añadieron a los diferentes pozos con suspensión celular y por duplicado, además de dos pozos sin el mitógeno como testigos.

También se prepararon pozos libres de suspensión celular (solamente con medio de cultivo), como controles de esterilidad. El volumen final de reacción en todos los pozos fué de 200 μl .

Estas placas se colocaron dentro de una incubadora, en condiciones controladas como son: Temperatura de 37^o C, flujo de aire constante al 95% , con 5% de N₂ y humedad constante, durante 7 días. Al finalizar este período de tiempo se le añadió a cada pozo, 20 μl de MTT, 3 (4,5- dimetildiazoil-2-il) 2,5, bromuro de difeniltetrazolio, solubilizado en RPMI, a razón de 5mg/ml, después de esto, se continuó la incubación por 1 hora más.

Posteriormente las placas se sometieron a centrifugación a 1500 rpm x 10 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente se les añadió 300 μl de DMSO a cada pozo para solubilizar las membranas y así, posteriormente leer la placa en un detector de ELISA utilizando el filtro de 570 nm, para poder determinar la cantidad de colorante incorporado al interior de las células.

e).- Proliferación inducida a un antígeno específico

Con las células obtenidas como se indica en el inciso a) y colocándolas como se describe en el inciso d), se sembraron por duplicado las células, pero en presencia del antígeno obtenido de *A. marginale* y añadiendo a cada pozo problema 20 μ l del mismo, con una concentración de 0.10 mg/ml (stock 0.5 mg/ml), usando como control 20 μ l de RPMI sin ningún inductor y con el mismo número de células en todos los casos.

f).- Incorporación de Timidina Tritiada (H^3)

Después de incubadas las placas por 6 días, en vez de añadir MTT, se adiciona metil-Timidina H^3 , (185 GBq-nmol, Amersham, UK), en 25 μ l de PBS, conteniendo 0.026 Mbq, (18 hrs antes de la cosecha de las células). Estas se colectan sobre filtros de fibra de vidrio (WHATMAN GF-A). Se contó inmediatamente la incorporación de la Timidina tritiada (H^3) después de añadir 3ml de líquido de centelleo (PPO-tolueno, 0.4%) a los viales de vidrio conteniendo una muestra c/u.

La tasa de proliferación celular inducida, se expresó directamente como cuentas por minuto, (cpm). (Gale *et al*, 1996).

RESULTADOS

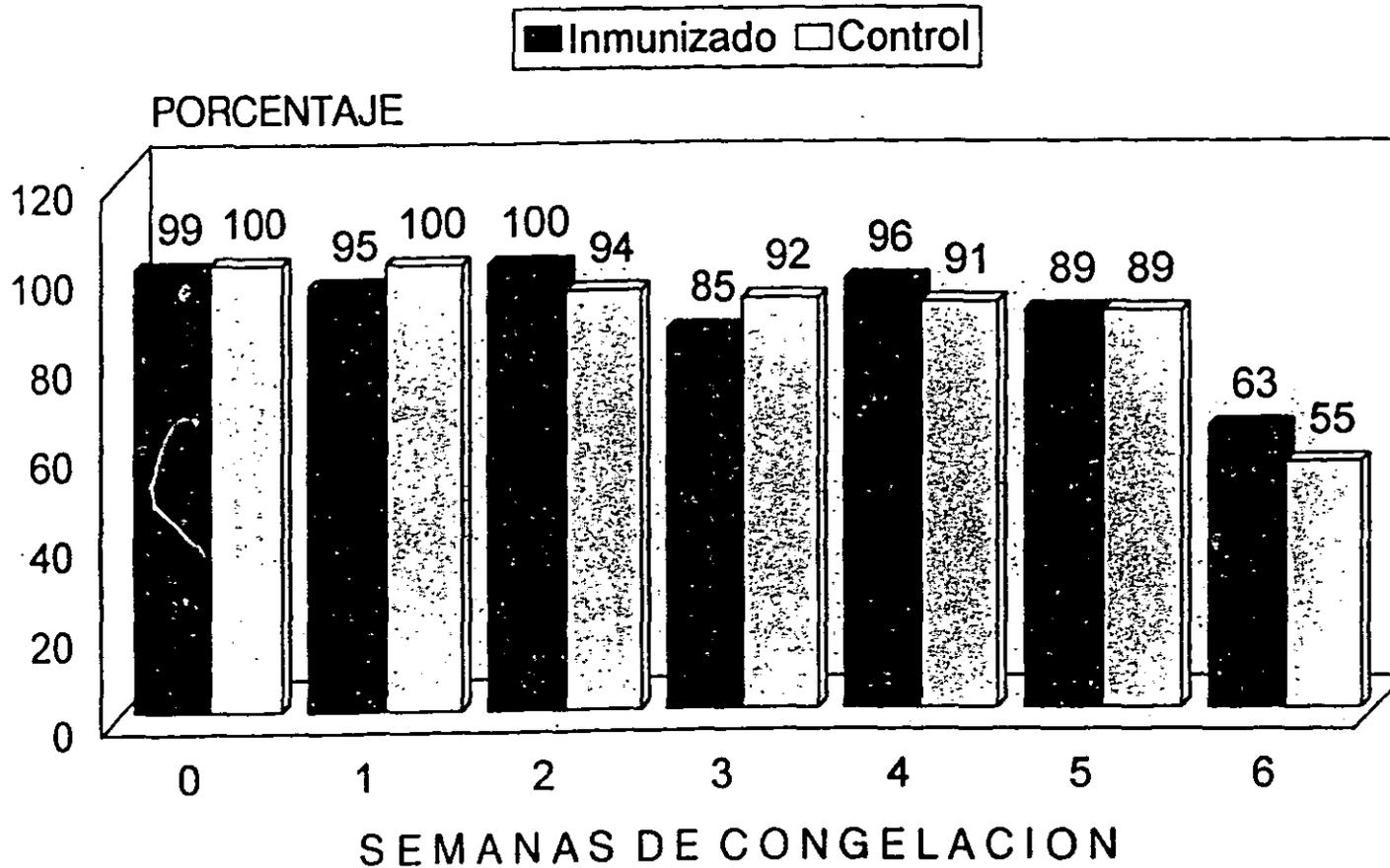
Como se puede observar en la tabla 1 y fig 1, a partir de la cuarta semana de congelación, se va disminuyendo el porcentaje de viabilidad de una manera drástica, independientemente de que el animal esté infectado o no, con un parásito intraeritrocitario. Por lo que creemos posible según estos datos, trabajar con muestras congeladas no más de 1 mes y bajo estas condiciones, corroborándose los reportes de Gale *et al* de 1996, aunque estos no mencionaron en su reporte el período que estudiaron.

TABLA 1
PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LINFOCITOS DE BOVINO
CONGELADOS A -70°C

BOVINO	SEMANAS						
	0	1	2	3	4	5	6
1 (inmunizado)	99	95	100	85	96	89	63
2 (control)	100	100	94	92	91	89	55

Porcentajes de células vivas vs semanas de congelación, determinado por el método de Azul de tripano.

FIGURA 1. PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LINFOCITOS DE BOVINO CONGELADOS A -70 C



Inmunizado: Bovino inmunizado vs *Anaplasma marginale*, Control: Bovino normal

Para el análisis de la estimulación para la proliferación de los linfocitos, se consideró como positivo cualquier Índice de Estimulación (IE) igual o mayor a 1.5 (Bautista y Garrido, 1995). Como podemos observar en la tabla 2 y fig 2, se pueden utilizar 20 µg de Concanavalina A en el ensayo para evaluar nuestros métodos. En este ensayo se utilizó el método del MTT para valorar el IE.

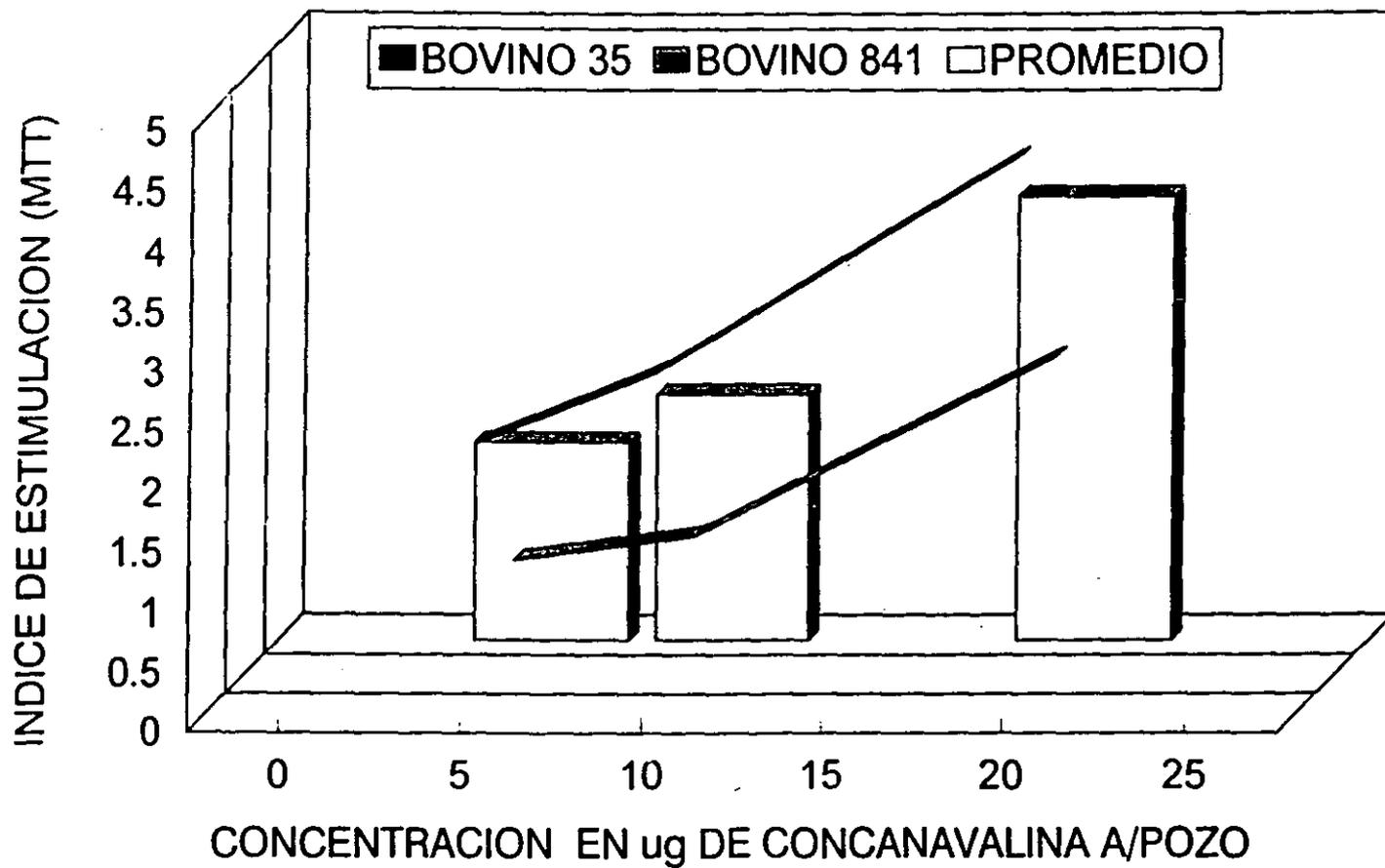
TABLA 2

INDICE DE ESTIMULACION (IE) DE LINFOCITOS DE BOVINO DESPUES DE 7 DAS DE CULTIVO " in vitro" en presencia de Concanavalina A

BOVINO	ConA 5 µg/pozo	ConA 10 µg/pozo	ConA 20 µg/pozo
1 (841-inmune)	1.0	1.2	2.7
2 (35-inmune)	2.3	2.9	4.7

Determinación de la cantidad óptima de ConA adecuada para el ensayo
Lectura promedio de dos pozos en microplacas de cultivo de 96 pozos.

FIGURA 2. INDICE DE ESTIMULACION (IE) DE LINFOCITOS DE BOVINO DESPUES DE SIETE DIAS DE CULTIVO *in vitro* EN PRESENCIA DE CONCAVALINA A



SE CONSIDERA COMO POSITIVO UN IE IGUAL O MAYOR A 1.5

TABLA 3

**INDICE DE ESTIMULACION (IE) DE LINFOCITOS DE BOVINO
DESPUES DE 3 SEMANAS DE CONGELACION Y LINFOCITOS FRESCOS
+ 20 μ g / p o z o DE ConA.**

I E : D.O. 570 nm linfocitos frescos
y congelados sin tratar con MTT

BOVINO	FRESCOS	CONGELADOS
1	1.17	2.00
2	2.08	1.35
3	2.73	1.06
Promedio	1.99	1.47
D.S .	0.78	0.48

Se consideró como positivo un IE igual o mayor a 1.5 (Bautista y Garrido, 1995)

Como se puede observar en la tabla 3, aparentemente la congelación de 3 semanas no afecta la respuesta a la ConcanavalinaA, ya que observamos proliferación en ambos grupos y a una concentración de 20 mg del mitógeno. El ensayo se llevó a cabo utilizando MTT.

TABLA 4

**I.E: D.O.: 570 nm o cpm de Linfocitos retados con Ag de
A. marginale / D.O. o cpm de Linfocitos no retados.**

BOVINO	MTT	T i m i d i n a	H³
1	1.13	- - -	(inmunizado)
2	1.75	1.48	(inmunizado)
3	- - - - -	1.00	(no inmunizado)

Indice de estimulación de linfocitos de bovino en presencia de antígeno de *A. marginale* utilizando para su comparación ambas técnicas.

Se consideró como positivo un IE igual o mayor a 1.5 (Bautista y Garrido, 1995).

En este ensayo , como nos indica la tabla 4, nos permite observar dos datos:
Primero observamos el reconocimiento del antígeno por el linfocito sensibilizado respondiendo con el evento de la proliferación en el caso de el bovino que había sido inoculado con *A. marginale* y había presentado los signos de la anaplasmosis, a diferencia del resultado del animal sano que no presenta tal evento. También se compara en el bovino 2

INDICE DE ESTIMULACION:

D.O. DEL VALOR EXPERIMENTAL (CON ANTIGENO O MITOGENO)

D:O DEL VALOR DEL TESTIGO (SIN ANTIGENO O MITOGENO)

DISCUSION

Basándonos en los resultados observados y presentados en la fig 1, podemos inferir que, la viabilidad celular se puede mantener dentro de un rango de tiempo considerable (1 mes a -70°C) y obtener óptimos resultados independientemente de las condiciones de salud del animal, (infectado o sano), por lo que coincidimos con Gale *et al.*, (1996), respecto a poder trabajar con linfocitos congelados siempre y cuando, el período de congelación no sea mayor a un mes, ya que el porcentaje de viabilidad nos indica que podemos obtener resultados confiables si nos atenemos a ello.

El trabajar con una concentración de mitógeno óptima adecuada, (fig2), nos aseguraba el tener una buena respuesta celular, sin que estas se vieran afectadas en su metabolismo, ya que debe existir un límite de inducción y un límite de concentración tolerable por las células, antes de empezar a contender con la toxicidad del compuesto. En este ensayo, ambos bovinos (inmunes), respondieron satisfactoriamente a la inducción "*in vitro*" en presencia del mitógeno, con lo que se comprobó que la transformación blastoide ocurre cuando se añade un mitógeno (fig 2) ó un antígeno como se observa en la tabla 4, siendo en este segundo caso, donde el antígeno es reconocido por los receptores específicos de los linfocitos, los cuales envían una señal al núcleo para que este a su vez, inicie la proliferación de los linfocitos que reconozcan a ese antígeno.

Comparando el factor de congelación vs linfocitos recién obtenidos, que se presentan en la tabla 3, podemos inferir que, siempre que se trabaje con el doble de concentración de linfocitos congelados, podemos obtener una respuesta similar a la de los no congelados, la razón de esto, no es la viabilidad de estos, ya que siempre se analizó esta, antes de iniciar cada ensayo. Cabe mencionar también que el índice de estimulación se midió con el método colorimétrico de la incorporación de la sal de tetrazolio MTT, método que tiene como principio el desdoblamiento de dicha sal de color amarillo a cristales de formazan de color púrpura, la transformación se produce por la actividad de la deshidrogenasa que se lleva a cabo en las mitocondrias, que sólo puede ocurrir en las células vivas. La señal generada es el resultado de la actividad de las células (Mosmann, 1983).

Como se muestra en la tabla 4, se pudo comprobar la proliferación de linfocitos retados (estimulados) con el antígeno de *A. marginale* al comparar la incorporación de la timidina tritiada y el MTT, donde se observó que ambas técnicas son iguales de sensibles y efectivas (bovino 2). De este resultado podemos inferir que, la inmunidad protectora contra *Anaplasma marginale* y contra muchas otras infecciones

rickettsiales y bacterianas, depende de la activación celular llevada a cabo por los macrófagos, que realizan la fagocitosis, mecanismo clave que inicia la respuesta celular en la cual es procesado el antígeno por estas células. (Bautista, 1996; Gale *et al.*, 1996).

Creemos que podemos recomendar ampliamente el uso de el MTT en la técnica de la detección de la proliferación celular, como indicadora de la misma, por tener la sensibilidad o exactitud necesaria y comparable, a la presentada por la técnica de la incorporación de la timidina tritiada.

Siendo muchos los requerimientos para el manejo de radioisótopos, así como muchas las normas de seguridad a seguir por el laboratorio y el personal que los manipula, más el costo que conlleva, (que es mucho menor en el caso del MTT) y sobre todo, la facilidad y el riesgo nulo que presenta en su realización la prueba con MTT, permite el poder establecerla fácilmente, casi en cualquier tipo de laboratorio, por lo que resulta muy ventajoso el uso de esta técnica colorimétrica.

Por otro lado, el poder partir de muestras de linfocitos congelados, puede permitir trabajar con un gran número de muestras obtenidas y almacenadas adecuadamente, de localidades lejanas a la nuestra, sin el riesgo de la pérdida de su capacidad de respuesta como observamos en nuestros ensayos dándonos un margen de hasta 3 semanas de viabilidad bajo ultracongelación, lo que permite realizar el método de linfoproliferación, con fechas espaciadas, mientras se conjunta el número de muestras suficientes, para utilizar toda nuestra de proliferación sin pérdida de espacios no utilizados, optimizando así el costo de la prueba. Todo esto sumado al bajo costo del reactivo MTT, redundan en la posibilidad de efectuar dicho ensayo con mucho menor problemática que la que presentaría el tener que utilizar el isótopo radioactivo.

CONCLUSION

Debemos apoyar la tendencia que existe en la actualidad en todos los laboratorios, tanto de análisis clínicos como de investigación, de no seguir utilizando material radioactivo, para evitar la contaminación por este tipo de materiales peligrosos y costosos para todos en general.

Gracias al uso de una técnica inocua y el uso de un antígeno de *A. marginale*, nos permitió corroborar el papel protector que la inmunidad celular pudiera representar frente a este organismo y frente a otros relacionados como son: *Cowdria ruminantium*, *Rickettsia tsutsugamushi*, *Ehrlichia risticii*, *Theileria parva* y especies de *Plasmodium* y otros protozoarios parásitos. Y aunque la respuesta humoral también se induce, presenta un índice menor de protección, (Bautista, 1996; Gale et al, 1996).

Gracias a este método barato, sensible y fácil de llevar a cabo, podremos seguir avanzando en el estudio de la respuesta celular involucrada en esta enfermedad que es de importancia económica para el ganado bovino ya que, se reportan pérdidas importantes en la ganadería de México a causa de la Anaplasmosis. Tan sólo en 1980 se estimaron pérdidas por más de tres mil millones de pesos en costos actuales, dicha cifra representaría aproximadamente 400 millones de pesos. (Bautista, 1996).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

- 1.-Bautista Garfias C.R., Garrido Pérez M. 1995. Efecto mitogénico de los antígenos somático y de excreciones/secreciones de *Fasciola hepatica* adulta en linfocitos normales de ratón BALB/c. *Tec. Pecu. Mex.*, 33:25-28.
- 2.-Bautista Garfias C. R. 1996. Los parásitos y la respuesta inmune del huésped. En : Manual del Curso Regional de Diagnóstico, Prevención y Control de la Anaplasmosis y Babesiosis bovina. SAGAR ed. Pag 20-25.
- 3.-Bautista Garfias C.R. 1996. La respuesta Inmune de los bovinos contra *Anaplasma marginale*. En: Manual del Curso Regional de Diagnóstico, Prevención y Control de la Anaplasmosis y Babesiosis bovina. SAGAR ed. Pag 26-29.
- 4.-Buening G.M.1976. Cell-mediated immune response in anaplasmosis as measured by a micro cell mediated cytotoxicity assay and leukocyte migration-inhibition test., 37: 1215-1218.
- 5.-Ferrari M., Fornasiero M.C. y Isetta A.M. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods.*, 131: 165-172.
- 6.- Gasbarre, L.C., Romanowski, R.D.y Douvres, F.W. 1985. Suppression of antigen- and mitogen-induced proliferation of bovine lymphocytes by excretory-secretory products of *Oesophagostomum radiatum*. *Inf. Imm.*, 48: 540-545.
- 7.-Gerlier D. y Thomasset N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods.* 94:57-63.
- 8.- Green L.M., Reade J.L. y Ware C.F. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods.* 70: 257-268.
- 9.- Humphrey J.H. 1964. *Inmunología Médica*. Ed. Toray S.A. Barcelona, España. Pag 3-24.

10.- Gale K.R., Gartside M.G., Dimmock Ch.M. Zakrzewski H. y Leatch G. 1996. Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. Parasitol. Res. 82: 551-562.

11.- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65: 55-63.

12.- Rodríguez-Camarillo S.D., Aboytes-Torres R. y García-Ortiz M.A. 1996. Anaplasmosis bovina. En: Manual del Curso Regional de Diagnóstico, Prevención y Control de Anaplasmosis y Babesiosis bovina. SAGAR ed. Pag 1-4.

13.- Tizard I. 1989. Inmunología veterinaria. Ed. Interamericana, México D.F. pag 5-49.