



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia

EL USO DE LA LACTATO DESHIDROGENASA COMO
INDICADOR DE DAÑO CELULAR *IN VITRO* CAUSA-
DO POR *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense*, y
Mycoplasma spp. proteolítico EN CULTIVO CELULAR
PRIMARIO DE GLANDULA MAMARIA.

T E S I S
Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p r e s e n t a
ESTELA TERESITA MENDEZ OLVERA



Asesores:

M. en C. Rosa Elena Miranda Morales
Dr. Francisco Suárez Güemes
Dr. Francisco Trigo Tavera

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

**El uso de la lactato deshidrogenasa como indicador de daño celular
in vitro causado por *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense* y
Mycoplasma spp. proteolítico en cultivo celular primario
de glándula mamaria.**

**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 obtención del Título de

Médico Veterinario Zootecnista

por

Estela Teresita Méndez Olvera

Asesores:

M en C. Rosa Elena Miranda Morales

Dr. Francisco Suárez Güemes

Dr. Francisco Trigo Tavera

México, D.F.

1999

II

DEDICATORIAS

En memoria de mi abuelo "Tachito", quien siempre vivirá en mi corazón.

A mis padres, esas dos maravillosas personas que admiro y respeto tanto y a quienes les debo todo lo que soy.

A mis hermanos Bernardo y Adriana por todo su cariño y apoyo.

A toda mi familia en general.

Gracias.

III

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Elena Miranda M., a quien le agradezco mi formación profesional.

Al Dr. Roberto Cervantes O. con todo respeto y gratitud por haberme brindado todo su apoyo de manera incondicional.

A la Dra. Graciela Tapia por haberme apoyado con la parte estadística de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos de trabajo, que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas y que de un modo u otro colaboraron en mi formación e hicieron posible este trabajo.

Gracias.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES	15
APENDICE	16
LITERATURA CITADA	19
FIGURAS	25
CUADROS	28

RESUMEN

MÉNDEZ OLVERA ESTELA TERESITA. El uso de la lactato deshidrogenasa como indicador de daño celular *in vitro* causado por *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense* y *Mycoplasma spp.* proteolítico en cultivo celular primario de glándula mamaria. (Bajo la dirección de: M en C. Rosa Elena Miranda Morales, Dr. Francisco Suárez Güemes y el Dr. Francisco Trigo Tavera).

Se resalta la importancia de la Mastitis Bovina como una de las enfermedades más comunes y costosas que padece el ganado bovino productor de leche, en especial, se hace referencia a la mastitis causada por micoplasmas. En este estudio, se evaluó el posible daño *in vitro* ocasionado por *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense* y *Mycoplasma spp.* proteolítico, en células epiteliales de glándula mamaria de bovino. Se establecieron cultivos celulares primarios, donde se determinó por medio de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), el daño celular producido por el patógeno.

Los resultados demostraron que debido a la cantidad de LHD liberada, *Mycoplasma spp.* proteolítico causó mayor alteración en las células epiteliales de glándula mamaria de bovino, a comparación de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se considera a *Mycoplasma spp.* proteolítico, como una especie con mayor capacidad patogénica.

INTRODUCCIÓN

La mastitis sigue siendo una de las enfermedades más comunes y costosas que padece el ganado bovino especializado en la producción de leche. La mastitis bovina causada por micoplasmas ha adquirido mayor importancia debido a las pérdidas atribuidas al costo empleado en diagnóstico, tratamiento, desecho de animales enfermos, eliminación de leche contaminada, y gastos por concepto de reemplazos ^(1, 2, 3)

Los micoplasmas son organismos procariotes de la clase Mollicutes y de la familia Micoplasmataceae que carecen de muchas capacidades normalmente expresadas por otras bacterias. La diferencia más notable es la ausencia de pared celular, sin la cual quedan únicamente rodeados por una membrana trilaminar, lo que da lugar a la característica morfológica colonial de "huevo frito" en medio sólido; además la falta de proteínas asociadas a la pared celular los hace resistentes contra los antibióticos que actúan a este nivel. Tienen un tamaño pequeño de aproximadamente 300 nm., logrando pasar por filtros bacteriológicos de 450 nm. hasta 220 nm. Tienen genomas pequeños con bajos contenidos de guanina y citosina (23-40%). Como consecuencia de su limitado potencial genético necesitan de una íntima asociación con la superficie celular del huésped para poder satisfacer sus requerimientos nutricionales ^(4, 5, 6, 7, 8)

Los miembros del género *Mycoplasma* obtienen su energía a través de diferentes vías, siendo que existen micoplasmas glucolíticos o fermentadores de la glucosa por ejemplo, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* PG1, que utiliza la glucosa o algún otro carbohidrato en el ciclo de la glucólisis para formar lactato y piruvato. Por otro lado, existen micoplasmas que ocupan como única fuente de energía a la arginina por ejemplo, *Mycoplasma canadense*, que metaboliza la arginina por medio de un sistema de tres enzimas para formar amoníaco, dióxido de carbono y adenosín trifosfato (ATP). Por último, se encuentran los micoplasmas que ocupan tanto la glucosa como la arginina por ejemplo, *Mycoplasma bovis*, el cual es capaz de oxidar el lactato, el piruvato, o ambos, para formar acetato y dióxido de carbono ^(6, 8, 9, 10) Todas estas reacciones se ven principalmente involucradas en las vías de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) y Hexosamonofosfato (HMP) ^(11, 12)

Existen 18 especies de micoplasmas en bovinos, 10 de ellas se consideran patógenas y se les asocia con problemas de mastitis bovina como son: *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma bovigenitalum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma arginini* ^(2, 4, 13), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* PG1, *Mycoplasma* sp. F38 y *Mycoplasma* spp. proteolítico. Este último se considera como una nueva especie del género *Mycoplasma* ⁽¹⁴⁾. La mastitis causada por micoplasmas se caracteriza por un descenso brusco en la producción láctea, una tumefacción notable de la glándula mamaria, la secreción láctea es pardusca, con grumos abundantes y un sedimento oscuro. La mayoría de los micoplasmas producen daño en la glándula mamaria a nivel del epitelio de los conductos colectores, el cual consiste en dos placas de células (una de ellas con forma hexagonal y provista de microvellosidades y la otra con forma redonda y desprovista de microvellosidades), que se extienden desde el orificio del pezón hasta el tejido alveolar, donde los alvéolos y los conductos colectores forman una sola placa de células epiteliales en donde generalmente se produce fibrosis ^(2, 4, 5, 15).

Para poder estudiar la interacción del micoplasma con las células de la glándula mamaria bovina es necesario utilizar modelos *in vitro* como el cultivo celular primario o de línea. Un cultivo celular primario se prepara inicialmente a partir de tejidos directamente obtenidos de los animales, estos muestran una capacidad limitada de crecimiento *in vitro*, a lo sumo 5 ó 10 divisiones; mientras que las líneas celulares continuas pueden propagarse *in vitro* indefinidamente mediante el subcultivo a intervalos regulares ^(5, 16).

El trabajar con cultivos primarios tiene desventajas ya que pueden presentarse problemas de contaminación con bacterias, hongos y virus ⁽⁸⁾. Dentro del grupo de bacterias que contaminan los cultivos celulares, alterando a las células, se encuentra el género *Mycoplasma*: *M. orale* (37.4%), *M. arginini* (21.4%), *M. hyorhinis* (15.9%), *Acholeplasma laidlawii* (8.5%), *M. hominis* (6.1%), *M. fermentans* (0.4%) ^(17, 18), y en menor proporción la presencia de *M. salivarium*, *M. pneumoniae* y *M. gallisepticum* ⁽¹⁹⁾ por ello es necesario el uso de antibióticos para inhibir la contaminación que pudiese estar presente en el cultivo celular primario ⁽²⁰⁾.

Para la determinación de la muerte o daño celular provocado por algún patógeno, existen varias pruebas entre ellas tenemos a las que ocupan tinciones vitales como el azul de tripan, bromuro de etidio y eosina Y, en donde las células viables son discriminadas de las muertas por un diferencial de tonalidad; este método es un tanto complicado ya que es limitado el número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo y no identifica a las células lisadas. Por otro lado tenemos el uso de isótopos radioactivos como el [^{51}Cr], [^3H]-timidida, [^{75}Se]-metionina y el marcaje con tinciones fluorescentes como bicarboxietil-carboxifluoresceína (BCECF), que presentan varias desventajas como son el manejo de elementos radioactivos, su alto costo y la necesidad de personal calificado. Por último, está el uso de enzimas citoplasmáticas liberadas de las células dañadas; entre ellas están las fosfatasas, transaminasas, hidrolasas y las oxidoreductasas, en este último grupo se encuentra la lactato deshidrogenasa, que es una de las enzimas más estables ^(21, 22, 23).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática presente en la mayoría de las células eucariotas y procariotas, la cual es liberada inmediatamente después de que existe lisis o daño a nivel de membrana celular ^(24, 25, 26, 27). La LDH se considera una enzima oligomérica formada por la unión de una molécula de adenina, dos de ribosa, dos de ácido fosfórico y una de nicotinamida ⁽²⁸⁾ pertenece al grupo de las desmolasas y al subgrupo de las deshidrogenasas ^(27, 29). Mediante estudios de separación electroforéticos con gel de almidón se han encontrado cinco isoenzimas de la LDH que catalizan a la misma reacción, pero difieren en su estructura molecular ya que son controladas por diferentes genes y son órgano - específicas ⁽³⁰⁾ presentando la siguiente composición: LDH-1 ⁽⁴⁾(HHHH; H4) predomina en corazón, eritrocitos, cerebro y riñón, LDH-2 (HHHM; H3M) en riñón, bazo, páncreas y corazón. LDH-3 (HHMM; H2M2) en leucocitos, adrenales y tiroides, LDH-4 (HMMM; HM3) en hígado, músculo esquelético y riñón, por último LDH-5(MMMM; M4) en músculo esquelético e hígado ^(24, 25, 30, 31, 32).

⁴ H = corazón y M = músculo, asignaciones dadas por Kaplan NO, et al. 1960.

La LDH es una enzima que cataliza de manera reversible en el ciclo de la glucólisis la reducción del dinucleótido de adenina (NAD) a dinucleótido de adenina reducido (NADH) en la conversión de lactato a piruvato en la etapa terminal de la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas ^(28, 33)

Por lo expresado anteriormente y para contribuir al estudio de patogenicidad de *Mycoplasma spp.* proteolítico, se realizaron estudios de daño celular en cultivos celulares primarios de glándula mamaria de bovino, utilizando como indicador del daño a la LDH.

HIPOTESIS

Mycoplasma spp. proteolítico causa alteración en células epiteliales de un cultivo celular primario de glándula mamaria de bovino, lo que origina liberación de LDH.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el daño celular *in vitro* causado por *Mycoplasma spp.* proteolítico, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense* en cultivo primario de células epiteliales de glándula mamaria de bovino, por medio de la cuantificación de LDH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecimiento de un cultivo celular primario a partir del epitelio de glándula mamaria de bovino.
2. Infección del cultivo celular primario con *M. spp.* proteolítico, *M. bovis*, *M. canadense* y cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, todas ellas en su fase logarítmica de crecimiento.
3. Cuantificación y cálculo de la liberación de LDH por medio del paquete comercial: Cytotoxicity Detection Kit (LDH). ^A

^ACytotoxicity Detection Kit [LDH]. Cat No. 1644793, Lab. BOEHRINGER MANNHEIM.

MATERIAL Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS DE ESTUDIO

Mycoplasma bovis y *Mycoplasma canadense* (cepas productoras de mastitis bovina, donadas por la Universidad de Aarhus, Dinamarca). *Mycoplasma* spp. proteolítico (cepa aislada de leches mamitosas en un hato lechero de Tizayuca, Hidalgo y trabajadas en el departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM) ⁽¹⁴⁾ Todas estas cepas se hicieron crecer en medio líquido Hayflick (Apéndice 1). Como cepas controles se utilizaron a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (cepas aisladas de casos clínicos de donadas por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM) las cuales se mantuvieron en medios sólidos de cultivo Mac Conkey y TSA respectivamente para su crecimiento.

CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Para la curva de crecimiento de los micoplasmas se ocuparon 12 tubos conteniendo 1.8 ml de medio Hayflick sin rojo de fenol + 0.2 ml de micoplasma (título de 1×10^6 micoplasmas / ml), los tubos se incubaron a 37 C y 90% de humedad ^A por 12 hrs. En el espectrofotómetro se efectuaron las lecturas cada hora por 24 hrs. de crecimiento. Para las cepas de *E. coli* y *S. aureus* se realizó el mismo procedimiento, en caldo infusión cerebro corazón como medio de cultivo .

CULTIVO CELULAR PRIMARIO

Se colectaron glándulas mamarias de bovinos sacrificados en el rastro de Tlalnepanitla, Edo. de México, y se transportaron al Laboratorio de Microbiología de la FMVZ, UNAM, donde se procesaron de acuerdo a la técnica propuesta por Sastrowidjojo S. y Frost A. ⁽¹⁵⁾ Al mismo tiempo se les tomó una muestra bacteriológica, la cual fue sembrada en Agar Hayflick para descartar la presencia de micoplasmas y en Agar Sangre para determinar otros microorganismos presentes. Cuando se observó un desarrollo moderado o abundante, se desecharon las células epiteliales de

^A Forma Scientific CO₂ Incubator, Model 3028.

la glándula mamaria trabajadas hasta ese momento, si por el contrario no se observaba desarrollo alguno o este era escaso, se continuaba con el procesamiento.

Las células que fueron obtenidas se contaron en un hemocitómetro, usando el Azul de Tripán para establecer el número de células viables, hasta que se obtuvo una suspensión de 2×10^6 cel/ml. Posteriormente se reconstituyó la suspensión de células en medio HEPES 199^A (Apéndice 2), y se cultivó en microplacas de 96 pozos^B, cada pozo contenía 150 μ l del medio HEPES 199 y 50 μ l de la suspensión de células. Las microplacas se sellaron perfectamente y se metieron a incubar^C a 37 C con una atmósfera del 10% de CO₂ por 7 días para obtener una monocapa.

INFECCIÓN DEL CULTIVO CELULAR

Una vez que se obtuvo la monocapa, se eliminó el sobrenadante del cultivo celular, dejando únicamente a las células adheridas, inmediatamente después se lavó cada pozo de células con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Apéndice 3) para eliminar posibles detritus celulares. Posteriormente se preparó el inóculo infectante con las cepas de *M. bovis*, *M. canadense* y *Mycoplasma spp.* proteolítico, ajustadas a su fase logarítmica de crecimiento con un título de 1×10^6 micoplasmas/ml de PBS. Las cepas de *S. aureus* y *E. coli* (controles positivos) se ajustaron de igual manera a su fase logarítmica crecimiento y se estandarizaron con el 0.5 del Nefelómetro de McFarland; el PBS se manejo como control negativo, ya que no interfirió en la liberación de LDH. Además de los controles establecidos, el "kit" necesitaba un control bajo, el cual provee información de la LDH liberada de las células no tratadas, es decir, PBS + células; y un control alto, que provee información de la máxima liberación de LDH en las células, es decir, Triton X-100^A al 2 % + células.

La infección de las células adheridas se realizó por triplicado poniendo en cada pozo 100 μ l de: *M. bovis*, *M. canadense*, *M. spp* proteolítico (cepas problema), *S. aureus* y *E. coli* (controles positivos), PBS (ontrol bajo) y Triton X- 100 (control alto).

^A Medium 199 HEPES Modification. Cat No. M-2520, SIGMA.

^BTC Microwell 96 F. SIW/LID. Cat. No. 037572. NUNCLON

^C Thermolyne Compact CO₂ Series 5000.

La microplaca se incubó a 37 C, 5% CO₂ y 90% de humedad ^A por 2, 6, 9, 15, 18, 22 y 24 hrs. En cada tiempo de infección de manera aséptica se tomó el sobrenadante y se transfirió a una nueva microplaca para poder determinar la acción de la LDH liberada, debido al daño causado por los microorganismos.

De la microplaca donde se efectuó la infección se desprendieron las células adheridas para verificar que efectivamente el daño había sido producido por los micoplasmas, esto se pudo comprobar sembrando las células desprendidas en Agar Hayflick a 37 C en microaerobiosis, donde se observaron colonias con la forma característica de "huevo frito".

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DEL "KIT"

- Solución ❶: Catalizador (Mezcla estable de Diaforasa / NAD⁺).

Se reconstituyó el liofilizado en 1 ml de agua destilada estéril y se mezcló por 10 minutos.

La solución reconstituida permanece estable a 4 C.

- Solución ❷: Tinción (contiene yoduro de tetrazolio clorado (INT) y lactato de sodio).

La solución se dejó descongelar a temperatura ambiente. La tinción INT puede permanecer estable por varias semanas a 4 C.

- Mezcla Reactiva para 100 pruebas:

Se usaron 250 µl de la solución ❶ + 11.25 ml de la solución ❷. Se mezcló perfectamente antes de usarse.

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LDH

Para poder determinar la actividad de LDH, se añadieron 100 µl de la mezcla reactiva a cada pozo que contenía los sobrenadantes y de igual manera al control negativo, que se agregó en esta microplaca para después incubarse a temperatura ambiente por 30 minutos protegido de la luz. Durante esos 30 minutos las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo (Fig. 1).

^A Triton X-100. Cat No. 83892122-50, Lab BOEHRINGER MANNHEIM

El mismo procedimiento se realizó con: *M. bovis*, *M. canadense*, *M. spp* proteolítico, *S. aureus* y *E. coli*, para descartar la presencia de LDH ⁽²⁶⁾.

El incremento de la enzima se correlaciona directamente con la cantidad de formazan formado y al número de células dañadas durante ese tiempo. Por ser un ensayo colorimétrico, se ocupó un lector de ELISA^B a una longitud de onda de 490-492 nm. con una longitud de onda de referencia de 600nm para la obtención de los datos expresados en densidad óptica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se elaboró un Modelo de Bloques aleatorio utilizando a las diferentes glándulas mamarias como bloques, donde se incluyó el efecto de la cepa, hora, y la interacción cepa/hora. El modelo se analizó por el Modelo de Cuadrados Mínimos con el programa SAS[®] (Statistical Analysis System) en su procedimiento GLM (General Linear Models Procedure). Se obtuvieron las medias mínimas cuadráticas para evidenciar las diferencias entre ellas por el método de separación de medias de Tukey ⁽³⁴⁾.

^A Forma Scientific CO₂ Incubator, Model 3028.

^B Microplate Reader, Model 3550, BIO-RAD.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LDH

Se determinó la cantidad de LDH que pudiesen liberar los microorganismos por sí solos sin la interacción con las células, para ver si existía interferencia, pero la liberación de LDH fue parecida al control negativo.

En el presente trabajo se demostró que de los micoplasmas utilizados en la infección, *Mycoplasma spp.* proteolítico sobrepasa el daño producido por *M. bovis* y por *Mycoplasma canadense* (Fig.2).

Los resultados del comportamiento de las cepas de *Mycoplasma* en comparación con las cepas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se dividieron en dos grupos (Fig.3), siendo de esta manera que *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense* se comportaron similarmente a *E. coli*, mientras que *Mycoplasma spp.* proteolítico se alejó claramente de éste grupo, situándose con un patrón semejante a *S. aureus*. en cuanto a liberación de LDH se refiere. La evaluación de este comportamiento se presenta en el Cuadro 1. De esta manera se pudo confirmar que realmente existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre *Mycoplasma spp.* proteolítico y los controles, pero lo más importante fue que *Mycoplasma spp.* proteolítico no comparte analogía alguna con las cepas de *M. bovis* y *M. canadense* lo que la convierte en una posible nueva cepa más agresiva en problemas de mastitis bovina.

Como el cultivo celular se infectó a diferentes horas, se determinó la relación entre la cepa y hora de infección, para ello se utilizó un modelo de bloques aleatorio, ya que las glándulas mamarias no fueron las mismas en cada ensayo (Cuadro 2) . Aunque no se observó una diferencia significativa en el efecto hora, y cepa x hora, se pudo apreciar que en general el daño se empezó a producir a partir de las dos primeras horas de infección y el pico máximo se dio entre las 15 y las 18 hrs.

DISCUSIÓN

Durante los últimos 10 años ha cambiado el papel que desempeña *Mycoplasma* en problemas de mastitis bovina, antes se le consideraba como un patógeno raro, pero hoy en día ha adquirido mayor importancia debido a que cada vez son más los hatos lecheros involucrados con este microorganismo⁽³⁵⁾. Un ejemplo de ello es la Cuenca de Tizayuca, Hidalgo, de donde se obtuvo el aislamiento de *Mycoplasma spp.* proteolítico^(12, 14), el cual se comportó en varios estudios realizados como una posible nueva especie del género *Mycoplasma*^(36, 37). De esta manera surgió el interés de determinar si *Mycoplasma spp.* proteolítico producía el mismo daño que *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense* a nivel de glándula mamaria.

Las bacterias que causan Mastitis Bovina se adhieren a las células epiteliales de la glándula mamaria, jugando un papel muy importante en la patogénesis^(38, 39). La relación biológica entre los micoplasmas y la célula eucariota ha sido estudiada por varios investigadores^(40, 41, 42, 43), en donde se habla de los factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad. Estos eventos pueden incluir adherencia a las células del huésped, la elaboración de productos metabólicos, o ambos; y que pueden llegar a dañar o interferir el metabolismo del huésped. Ejemplo de estos mecanismos: toxinas, proteínas de membrana, cápsulas, vellosidades y proyecciones de la superficie^(42, 43, 44). *M. bovis* produce una toxina (polisacárido compuesto de glucosa, glucosamina o galactosamina) que es responsable de los problemas inflamatorios en la mastitis bovina⁽⁴⁵⁾. De igual manera *S. aureus* y *E. coli* producen toxinas (hemolisinas y endotoxinas, respectivamente) involucradas en la enfermedad^(35, 46). Tanto de *Mycoplasma canadense* como de *Mycoplasma spp.* proteolítico se desconocen los mecanismos de virulencia que pudiesen estar presentes, pero lo que sí es claro es que ambos produjeron liberación de LDH, lo que indicó una alteración *in vitro* de las células epiteliales de la glándula mamaria.

Existen referencias donde se informa que el daño producido tanto por *S. aureus* como por *E. coli* depende del tipo de células epiteliales de la glándula mamaria, esto se aprecia mejor en aquellas obtenidas de los ductos colectores^(38,39), por ello, para este trabajo se utilizaron ese particular tipo de células.

Existen varias técnicas para determinar la integridad celular^(21, 22, 47, 48, 49) pero se decidió el uso de la detección de LDH, como una alternativa a las otras técnicas que presentan diversas desventajas (manejo de elementos radioactivos, alto costo, baja sensibilidad, daño mecánico de la membrana celular y la necesidad de personal calificado)^(26, 49, 50, 51). Por otro lado existen informes científicos médicos de la importancia de ésta enzima a nivel clínico, cuya actividad se incrementa en varios estadios patológicos cardíacos (daño del miocardio), pulmonares (enfisema pulmonar), hepáticos (cirrosis hepática), renales (daño renal) y musculares (hipoxia). El incremento de la enzima se debe al daño tisular o a la proliferación de tejido neoplásico. Muchas veces las isoenzimas ayudan a localizar el órgano dañado; siendo de esta manera que la actividad de la LDH puede ser útil en el diagnóstico de la enfermedad^(27, 31, 53).

Se observó que las células epiteliales de la glándula mamaria al ser infectadas con las cepas de *Mycoplasma*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* liberaron LDH, de tal manera que funcionó como un parámetro disponible en la estimación del estado fisiológico de la célula.

Por otra parte en el presente trabajo se pudo determinar que no existe relación alguna entre las diferentes cepas de *Mycoplasma*, debido a la cantidad de LDH liberada.

Las únicas cepas que mostraron diferencias significativas fueron *Mycoplasma spp.* proteolítico y *Staphylococcus aureus*, lo que respalda la hipótesis de considerar a *Mycoplasma spp.* proteolítico como una cepa diferente⁽¹⁴⁾ y a la vez más agresiva que las demás, siendo que *Mycoplasma bovis* es mundialmente reconocido por causar mayor daño a nivel de glándula mamaria. En cuanto a las diferentes horas de infección, se observó que la liberación de LDH en general se pudo cuantificar desde las dos primeras horas de infección, y entre las 15-18 hrs. se observó un incremento notable, lo que indicó que la alteración de las células fue mayor en ese lapso.

Con respecto a *E. coli*, existen datos que indican que después de 2 hrs posinfección se observan cambios en las células de la glándula mamaria⁽⁵⁴⁾ y que el daño máximo se produce entre las 15-18 horas de infección⁽⁵⁵⁾. Por otra parte se ha visto que los micoplasmas tienen un tropismo muy marcado por la membrana plasmática del huésped^(56, 57), y una vez allí pueden entrar al espacio intracelular, localizándose en el citoplasma o en regiones perinucleares después de 1 - 2 hrs hasta 7 días posinfección^(42, 52), lo que se reafirma con los resultados obtenidos

Con base en lo anterior se puede considerar a *Mycoplasma spp.* proteolítico como una especie con mayor potencial patógeno que *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense* en la producción de mastitis bovina.

En Medicina Veterinaria hay muy pocos trabajos con respecto al uso de la LDH^(58, 59, 60, 61), y no se le ha dado tanta importancia como en Medicina Humana, pero a través de esta investigación se pudo confirmar que la LDH es una prueba sensible, rápida, económica y cuantitativa^(31, 50). Por lo tanto con este trabajo se sugiere la determinación de la LDH como una herramienta en el estudio de la patogenicidad bacteriana.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que:

1. La medición de la liberación de LDH en el cultivo celular primario de células epiteliales de glándula mamaria fue exitoso, ya que permitió determinar el daño o lisis celular.
2. *Mycoplasma spp.* proteolítico, *Mycoplasma bovis*, y *Mycoplasma canadense* fueron capaces de producir daño en la membrana de las células epiteliales del cultivo celular primario de glándula mamaria.
3. *Mycoplasma spp.* proteolítico demostró producir mayor daño a comparación de las otras dos cepas de micoplasmas, considerándose como una especie con mayor capacidad patogénica.

APÉNDICE 1

PREPARACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO HAYFLICK.

Sustancia	Cantidad
• PPLO Broth ^A	1.89 g
• Agua Destilada	90 ml

Esterilizar en autoclave a 121 C, 15 libras de presión por 15 minutos. Se deja enfriar y adicionar asépticamente:

• (1) Solución de acetato de tallo ^B	0.25 ml
• (2) Solución de rojo de fenol ^C	0.25 ml
• (1) Solución de glucosa al 10% ^D	1 ml
• (1) Suero equino	20 ml
• (1) Extracto de levadura	10 ml
• (1) Penicilina G sódica ^E	1 ml

(1) Esterilizado por filtración 0.22 μ m (millipore).

(2) Esterilizado en autoclave.

^A Bacto PPLO Broth, Laboratorio DIFCO.

^B Acetato de Tallo, Laboratorios SIGMA.

^C Rojo de Fenol, Laboratorios MERCK.

^D Glucosa (Bacto dextrose), Laboratorios DIFCO.

^E Penicilina G Sódica (Penprocilina de 800000 UI), Laboratorios LAKESIDE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE 2

PREPARACIÓN DEL MEDIO HEPES- 199.

Sustancia	Cantidad
• Agua Destilada	1000 ml
• Medio 199-HEPES ^A	15.06 g
• Bicarbonato de Sodio (10 g en 100 ml)	0.5 ml
• Gentamicina (5 mg / ml) ^B	0.5 ml
• Penicilina (100000 UI / ml) ^C	10 ml
• Suero Fetal Bovino al 10 % Inactivado ^D	70 ml

Esterilizar por filtración 0.22 μ m (millipore).

^A Medium 199 HEPES Modification. Cat. No. M-2520, Laboratorios SIGMA.

^B Gentamicina (Gentocin \oplus Lite, 100 ml), Laboratorios SCHERING-PLOUGH.

^C Penicilina G Sódica (Penprocilina 800000 UI), Laboratorios LAKESIDE.

^D Newborn Calf Serum. Cat. No. N-4673, Laboratorios SIGMA.

APÉNDICE 3

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS. (PBS pH 7.2)

Sustancia	Cantidad
• Agua Destilada	1000 ml
• Cloruro de sodio NaCl ^A	8.5 g
• Fosfato de sodio dibásico anhidro Na ₂ HPO ₄ ^B	1.1 g
• Fosfato de sodio monobásico - cristales NaH ₂ PO ₄ ^C	0.32 g

• Si el Fosfato de sodio monobásico - cristales NaH₂PO₄ tiene una molécula de agua NaH₂PO₄·H₂O se deberá agregar 0.36 g.

La solución se esterilizó en autoclave .

^A Cloruro de Sodio, Laboratorios Baker.

^B Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro, Laboratorios Baker.

^C Fosfato de Sodio Monobásico - Cristales, Laboratorios Baker.

LITERATURA CITADA

1. Jasper DE. Bovine Mycoplasma Mastitis. *Avd Vet Sci Comp Med* 1981; 25: 121-157.
2. Jasper DE. The role of Mycoplasma in bovine mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 158-162.
3. Avila TS. Mastitis y producción de leche en el trópico húmedo. México: FMVZ, SUA, 1991.
4. Gyles CL, Thoen CO. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2nd edition. New York: Iowa State University Press / AMES, 1993.
5. Whitford WH, Rosenbusch FR, Lauerman HL. Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis. New York: Iowa State University Press / AMES, 1994.
6. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Revised Minimum Standards for Description of New Species of Class Mollicutes (Division Tenericutes). *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45: 605-612.
7. Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J, Maniloff J, Woese CR. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* 1989; 171: 6455-6467.
8. Taylor DR, Tully JG. Mycoplasma, Ureaplasmas, Spiroplasmas and Related Organisms, In Collier L, Balows A, Sussman M, editors. *Microbiology and Microbial Infections*: Arnold, 1998: 799-827.
9. Pollack DJ. Carbohydrate Metabolism and Energy Conservation. In: Mc Elhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editors. *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992: 181-200.
10. Beaman KD, Pollack DJ. Synthesis of adenylate nucleotides by Mollicutes (Mycoplasmas). *J Gen Microbiol* 1983; 129: 3103-3110.
11. Carter RG. Fundamentos de bacteriología y micología veterinaria. España: Editorial Acribia, 1989.
12. Desantis D, Tryon VV, Pollack DJ. Metabolism of Mollicutes: the Embden - Meyerhof - Parnas pathway and the Hexose Monophosphate Shunt. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 683-691.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

13. Thomas CB, Jasper DE, Willberg P. Clinical bovine mycoplasma mastitis. An epidemiologic study of factors associated with problem herds. *Acta Vet Scand* 1982; 23:53-54.
14. Miranda MRE. *Micoplasmas involucrados en la mastitis bovina*. (tesis Maestría en Ciencias Veterinarias). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
15. Sastrowidjojo S, Frost AJ. Cell cultures derived from bovine mammary ductular epithelium for the investigation of mastitis. *Aust Vet J* 1986; 63: 191.
16. Fenner F, Bachmann AP, Gibbs JPE, Murphy AF, Studdert JM, White OD. *Virología Veterinaria*. Primera edición. España: Editorial Acibla, 1992.
17. Jeansson S, Brorson JE. Elimination of Mycoplasmas from Cell Culture Utilizing Hyperimmune Sera. *Exp Cell Res* 1985; 161: 181-188.
18. Marcus M, Lavi V, Nattenberg A, Rottem S, Markowitz O. Selective killing of Mycoplasmas from contaminated mammalian cells in cell cultures. *Nature* 1980; 285: 659-661.
19. Schmitt K, Däubener W, Bitter-Suermann D, Hadding V. A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *J Immunol Methods* 1988; 109: 17-25.
20. Buskirk HH. Control of pleuropneumonia - like organisms in cell culture. *Appl Microbiol* 1967; 15: 1442-1446.
21. Jauregui HO, Hayner NT, Driscoll JL, Williams-Holland R, Lipsky MH, Galetti PM. Trypan Blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes - freshly isolated cells, cell suspension cultures and primary monolayer cultures. *In Vitro* 1981; 12: 1100-1110.
22. Kolber AM, Quinones RR, Gress ER, Henkart AP. Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J Immunol Methods* 1988; 108: 255-264.
23. Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiamont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D, Hache J. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *J Bacteriol* 1992; 25: 231-243.
24. Moss DW, Henderson AR. *Enzymes*. Textbook of Clinical Chemistry. 2nd edition. Philadelphia: Saunders Co. 1986.

25. Lott JA, Nemensanszky E. Lactate dehydrogenase. In Lott JA, Wolf PL, editors. *Clinical Enzymology. A Case Oriented Approach*. 1987.
26. Decker T, Lohmann-Matthes M. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 15: 61-69.
27. Drent M, Cobben NAM, Henderson RF, Wouters EFM, Dieijen-Visser Van M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J* 1996; 9: 1736-1742.
28. Garvie EI. Bacterial Lactate Dehydrogenases. *Microbiol Rev* 1980; 44: 106-139.
29. Conn EE, Stumpf PK. *Bioquímica Fundamental*. 3^{era} ed. México: Editorial Limusa, 1991.
30. Cahn RD, Kaplan NO, Levine L, Zwilling E. Nature and Development of Lactic Dehydrogenases. *Science* 1962; 136: 962-969.
31. Price CN, Stevens L. *Fundamentals of Enzymology*. 2nd ed. New York: Oxford Science Publications, 1989.
32. Kaplan NO, Ciotti MM, Hamolsky M, Bieber RE. Molecular heterogeneity and evolution of enzymes. *Science* 1960; 131: 392-397.
33. Villee CA, Salomon EP, Martin CE, Martin DW, Berg LR, Davis PW. *Biología*. 2da edición. México: Interamericana Mc Graw-Hill. 1992.
34. Milton JS. *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. 2^{da} ed. México: Interamericana Mc Graw-Hill, 1994.
35. Posadas ME, Aguilera CI, Hernández JC. Mastitis Bovina. *Memorias del curso de Farmacología Aplicada en la Clínica Bovina*; 1996 octubre; México (DF) México: Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas del D.F, AC, 1996: 31-55.
36. Sandoval MH. Caracterización Parcial de *Mycoplasma spp.* proteolítico Mediante Electroforesis Desnaturalizante e Inmunotransferencia. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
37. Miranda MRE, Suárez GF, Trigo TF. Patogenicidad *In vitro* de micoplasmas aislados de leches de bovino. *Memorias de XXIV Congreso anual de la Asociación Mexicana de Infectología y*

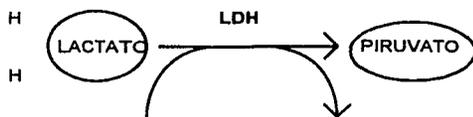
- Microbiología Clínica. VI Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia; 1999 junio/julio 30-3; Morelia (Michoacan) México. México (DF): Asociación Mexicana de infectología y Microbiología Clínica, AC, 1999: S57.
38. Frost AJ. Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. *Infect Immun* 1975; 12: 1154-1156.
39. Frost AJ, Wanasinghe DD, Woolcock JB. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect Immun* 1977; 15: 245-253.
40. Razin S, Jacobs E. Mycoplasma adhesion. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 407-422.
41. Krause DC, Leith DK, Wilson RM, Baseman JB. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemoadsorption and virulence. *Infect Immun* 1982; 35: 809-817.
42. Tryon VV, Baseman JB. Pathogenic determinants and mechanisms. In: Mc Elhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editors. *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992: 457-471.
43. Dybvig K, Voelker LL. Molecular Biology of Mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 25-57.
44. Almeida AR, Rosenbusch FR. Capsulelike Surface Material of *Mycoplasma dispar* Induced by In Vitro Growth in Culture with Bovine Cells Is Antigenically Related to Similar Structures Expressed In Vivo. *Infect Immun* 1991; 59: 3119-3125.
45. Geary JS, Tourtellote EM. Inflammatory Toxin from *Mycoplasma bovis*: Isolation and Characterization. *Science* 1981; 212: 1032-1033.
46. Brooker BE, Frost AJ, Hill AW. At least two toxins are involved in *Escherichia coli* mastitis. *Experientia* 1981; 37: 290-292.
47. Krüger-Krasagakes S, Garbe C, Kossman P, Orfanos EC. A rapid and sensitive fluorometric microassay for determining cell mediated cytotoxicity to adherent growing cell lines. *J Immunol Methods* 1992; 156: 1-8.
48. Kroesen BJ, Mesander G, Haar JG, The TH, Leij L. Direct visualisation and quantification of cellular cytotoxicity using two colour fluorescence. *J Immunol Methods* 1992; 156: 47-54.
49. Korzeniewski C, Callewaert MD. An Enzyme - Release Assay for Natural Cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983; 64: 313-320.

50. Sepp A, Binns MR, Lechler IR. Improved protocol for colorimetric detection of complement-mediated cytotoxicity based on the measurement of cytoplasmic lactate dehydrogenase activity. *J Immunol Methods* 1996; 196: 175-180.
51. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium formazan assay to measure viability and profile ration of lymphokine-dependent cell-lines. *J Immunol Methods* 1993; 157: 233.
52. Simecka JW, Davis JK, Davidson MK, Ross SE, Städtlander CT, Cassell GH. Mycoplasma diseases of animals. In: Mc Elhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editors. *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992: 391-415.
53. Schreiber WE. Laboratory assessment of myocardial damage: which test is best ? *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 383-384.
54. Frost JA, Hill WA, Brooker EB. The early pathogenesis of bovine mastitis due to *Escherichia coli*. *Proc R Soc Lond B* 1980: 431-439.
55. Brooker EB, Hill WA, Frost JA. Epithelial regeneration in the bovine mammary gland: the closure of lesions produced by *Escherichia coli*. *Proc R Soc Lond B* 1981: 81-91.
56. Carson JL, Hu P-C, Collier AM. Cell structural and functional elements. In: Mc Elhaney RN, Finch LR, Baseman JB, editors. *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992: 63-72.
57. Baseman JB, Lange M, Criscimagna NL, Giron JA, Thomas CA. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microbial Pathogenesis* 1995; 19: 105-116.
58. Oliveros R, Cutillas C, Arias P, Guevara D. Morphologic, biometric, and isoenzyme characterization of *Trichuris suis*. *Parasitol-Res* 1998; 84: 513-515.
59. Goddard PJ, Keay G, Grigor PN. Lactate dehydrogenase quantification and isoenzyme distribution in physiological response to stress in red deer (*Cervus elaphus*). *Res-Vet-Sci* 1997; 63: 119-122.
60. Rathour NP, Singh PP, Singh VN. Changes in LDH isozyme pattern in uterine fluid of mice during early pregnancy. *Horm Metab Res* 1997; 29: 462-464.

61. Van-Lunteren E, Brass EP. Metabolic profiles of cat and rat pharyngeal and diaphragm muscles. *Respir Physiol* 1996; 105: 171-177.

FIGURAS

Paso # 1



Paso # 2

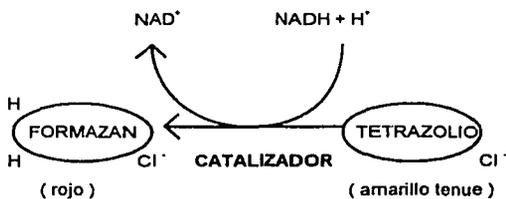


Fig. 1: En el paso 1, la LDH liberada reduce el NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ por la oxidación del lactato a piruvato. En el segundo paso se transfieren dos hidrógenos del $\text{NADH} + \text{H}^+$ a la sal de tetrazolio por medio de un catalizador.

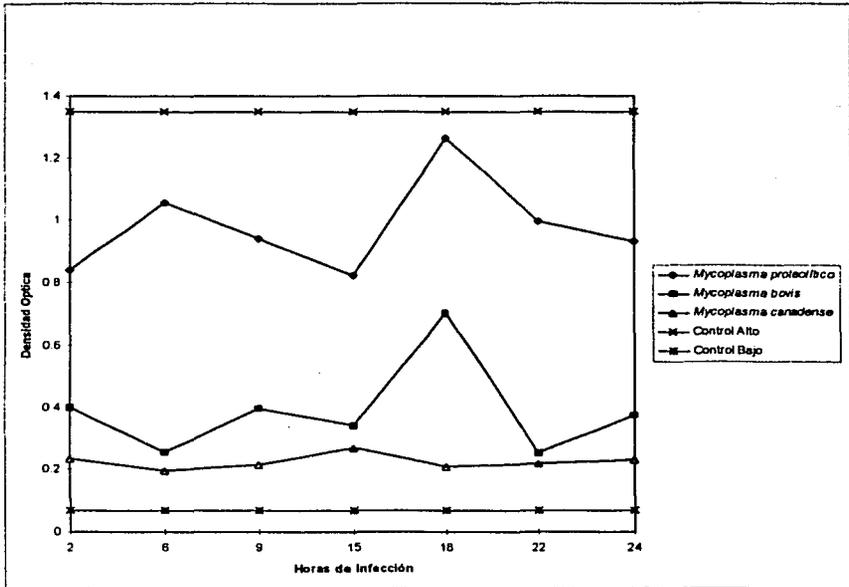


Fig. 2: Muestra las diferencias que existen entre las cepas problema y las horas de infección. *Mycoplasma* spp. proteolítico produjo mayor liberación de LDH a comparación con *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense*. En general el máximo daño producido se detectó de las 15 a las 18 hrs de infección.

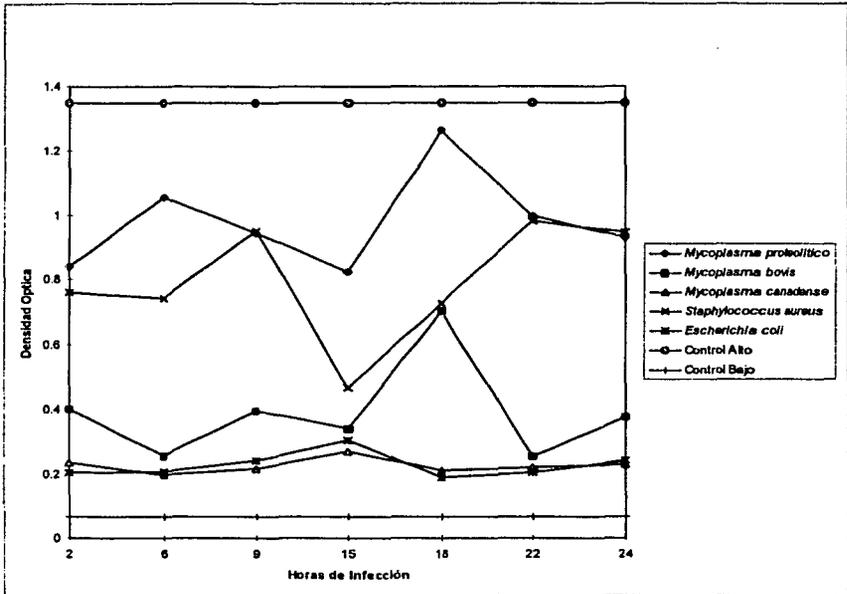


Fig. 3: Muestra el comportamiento de las cepas de *Mycoplasma* con respecto a los controles positivos (*S. aureus* y *E. coli*), control alto (daño de las células con Triton X-100) y el control bajo (PBS), notándose una vez más que *Mycoplasma spp. proteolítico* causó daño, pero esta vez mayor que los controles positivos.

CUADROS

CUADRO 1: Medias Mínimo Cuadráticas por Cepas.

CEPA	MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS
<i>Mycoplasma spp. proteolítico</i>	0.978 ^a
<i>Mycoplasma bovis</i>	0.388 ^b
<i>Mycoplasma canadense</i>	0.222 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.795 ^c
<i>Escherichia coli</i>	0.224 ^{ab}

^{a, b, c, d} Literales distintas denotan diferencias significativas.

CUADRO 2: Modelo de Bloques Aleatorios.

VARIABLE	CUADRADO MEDIO	SIGNIFICANCIA
Cepa	11.06	0.0001
Hora	0.16	0.6690
Cepa x Hora	0.17	0.8195

Cuadro 2: Muestra que tanto la variable hora como cepa x hora no obtuvieron valores significativos, sin embargo la variable cepa si obtuvo valores significativos, lo que demuestra una vez más que existen diferencias entre cepas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN