

00346
6



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**INMUNOBIOLOGIA DE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA DE
LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (LPMN) DEL
ARMADILLO DE NUEVE BANDAS
(*Dasypus novemcinctus*).**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
BIOL. MARCELA LOPEZ HURTADO**

DIRECTOR DE TESIS: DR. EN C. FERNANDO M. GUERRA INFANTE

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Primer Vocal

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Segundo Vocal

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo

Tercer Vocal

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

Secretario

Dr. Fernando Martín Guerra Infante

Suplente

Dr. Ricardo Lascuráin Ledesma

Suplente

Dr. Raúl Chávez Sánchez

la Dirección General de Bibliotecas •
UNAM a difundir en formato electrónico e impresa
contenido de mi trabajo recepción

NOMBRE: Marcela López
Hortado

FECHA: 15 ABR 02

FIRMA: Marcela López H.

Comité Tutorial:

Dr. Fernando Martín Guerra Infante

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

A Fernando, la persona más importante para mí,
con la que comparto la VIDA, lo que vivimos día a día,
por todo lo que somos y hacemos JUNTOS.

A una gran mujer, de quien
admiro sus cualidades y a quien quiero
con todo mi corazón, mi mamá (Lidia).

A mi papá, quien es una de las personas
más importantes en mi vida, por apoyarme y
animarme a seguir adelante.

A Roberto, Héctor, Carlos y Jaime, mis
"hermanastros", con todo mi cariño, por
lo que hemos compartido y porque sé
que cuento con ellos en las buenas y en
las malas.

A Sandy y Marifer, "las niñas de mis ojos",
simplemente porque las quiero.

A ...

Oscar, Pamela, Hugo, Bruno y Sofía

Marisa, Andrea, Karina y Adrián

Carlos y Carla

Jaime y Omar

Marcos

... mis sobrinos, por ser una
fuente invaluable de alegría y
sinceridad

A Adolfo... donde quiera que te encuentres,
estamos a mano.

A Benedicto... por devolverme la FE
cuando lo necesito.

A mis amigas: Tere, Paty y Carmen,
por los buenos tiempos... cuando planeábamos la vida cada cinco años.

A Elizabeth y Vero: Con estimación

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Saúl Flores Medina, por toda su ayuda en la realización de este trabajo y por contar con su amistad.

Al Dr. Fernando Guerra Infante, por todas sus aportaciones para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Gerardo Vázquez Nin, Dra. Concepción Sánchez Gómez, Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, Dr. Fernando Martín Guerra Infante, Dr. Ricardo Lascurain Ledesma y Dr. Raúl Chávez Sánchez, por enriquecer y hacer más valioso este estudio.

INDICE GENERAL

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Índice de abreviaturas	iii
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	10
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	23
Evaluación de la actividad quimiotáctica hacia diversas sustancias quimioatrayentes	23
Determinación de la capacidad fagocítica	24
Medición del estallido respiratorio mediante la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (rNBT)	25
Capacidad bactericida de los LPMN de armadillo	26
Producción de un factor con actividad similar al TNF	28
Búsqueda de un factor con actividad similar a la IL-1	31
Detección del RNAm para IL-6 en leucocitos de armadillo estimulados con PMA	34
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	48
APÉNDICE	49
BIBLIOGRAFÍA	59

INDICE DE FIGURAS**Página**

Figura 1. Efecto del suero de armadillo sobre la cinética de viabilidad de <i>S. aureus</i>	27
Figura 2. Porcentaje de mortalidad de <i>S. aureus</i> por LPMN de armadillo y humano	28
Figura 3. Curva tipo de TNF	29
Figura 4. Porcentaje de citotoxicidad de TNF en células L-929	30
Figura 5. Curva tipo de IL-1	32
Figura 6. Corrimiento electroforético del RNA total de leucocitos totales de armadillo	33
Figura 7. RT-PCR del RNA de leucocitos de armadillo activados con PMA y/o PHA para IL-1	35
Figura 8. RT-PCR del RNA de LPMN de armadillo activados con PMA y/o PHA para IL-6	35

INDICE DE TABLAS**Página**

Tabla 1. Índice de migración de LPMN de armadillo y de humano hacia diferentes quimioatrayentes	23
Tabla 2. Porcentaje de fagocitosis de LPMN de armadillo y humano	24
Tabla 3. Porcentaje de rNBT de LPMN de armadillo y humano	25
Tabla 4. Porcentaje de fagocitosis y rNBT de LPMN de armadillo	26
Tabla 5. Porcentaje de citotoxicidad y concentración del TNF producido por los LPMN de armadillo estimulados con diferentes inductores	30
Tabla 6. Porcentaje de citotoxicidad y concentración de TNF en sobrenadantes de LPMN de armadillo estimulados con diferentes citocinas recombinantes de humano y/o ratón	31
Tabla 7. Índice de proliferación de timocitos de ratón con diferentes inductores de la producción de IL-1	32
Tabla 8. Índices de migración de LPMN de diferentes especies animales hacia diferentes factores quimiotácticos	37
Tabla 9. Porcentajes de fagocitosis de LPMN de diversas especies contra diferentes microorganismos	39
Tabla 10. Porcentajes de rNBT de leucocitos de diferentes especies contra diversos patógenos	41
Tabla 11. Porcentaje de muerte intracelular (%M.I) de diferentes microorganismos por LPMN de diversas especies	43

ABREVIATURAS

- C3b**: Fracción 3b del complemento
- CTL**: Lisis mediada por células T
- Fc**: Fracción cristalizante de los anticuerpos
- fMLP**: Formil metionil leucil fenil alanina
- G-CSF**: Factor estimulador de colonias de granulocitos
- GM-CSF**: Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago
- Ig G**: Inmunoglobulina G
- Ig M**: Inmunoglobulina M
- IL-1**: Interleucina 1
- IL-1ra**: Antagonista del receptor de interleucina 1
- IL-1 α y β** : Interleucina 1 alfa y beta
- IL-2rh**: Interleucina 2 recombinante humana
- IL-3rR**: Interleucina 3 recombinante de ratón
- IL-6**: Interleucina 6
- IL-6rh**: Interleucina 6 recombinante humana
- IL-4**: Interleucina 4
- IL-8**: Interleucina 8
- IL-12**: Interleucina 12
- IL-16**: Interleucina 16
- INF- γ** : Interferon gama
- INF- γ rh**: Interferon gama recombinante humano
- LPMN**: Leucocitos Polimorfonucleares
- LPS**: Lipopolisacárido bacteriano (*E. coli*)
- MHC-1**: Complejo 1 mayor de histocompatibilidad
- M-CSF**: Factor estimulador de colonias de monocitos
- M. leprae***: *Mycobacterium leprae*
- NADPH**: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- PHA**: Fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*
- PWM**: Mitógeno de *Phytolacca americana*

PMA: Ester de forbol miristato acetato

ROS: Reactivos intermediarios de oxígeno

SAA: *E. coli* activado con suero de armadillo

SHA: *E. coli* activado con suero humano

TGF- β 1: Factor de crecimiento de células T beta 1

TPA: 12-0-tetradecanoylforbol-13-acetato

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta

RESUMEN

El armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) es de gran interés en la biomedicina, ya que es el único animal en el que crece *Mycobacterium leprae*, y que además presenta lesiones similares a las de la lepra lepromatosa de humano, por lo que es un modelo experimental útil para evaluar aspectos de tipo inmunológico y/o biológico de la enfermedad.

El objetivo del presente estudio fue evaluar los diversos mecanismos funcionales (quimiotaxis, capacidad fagocítica, mecanismos oxidativos, actividad bactericida y producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 e IL-6) de los LPMN del armadillo de nueve bandas no infectado con *M. leprae*.

Nuestros resultados mostraron que la actividad quimiotáctica, evaluada por el paso de células a través de una membrana en respuesta a una sustancia quimioatrayente, fue significativamente mayor hacia el suero de armadillo activado con *Escherichia coli* que hacia cualquier otro de los quimioatrayentes. En cuanto a la capacidad fagocítica, valorada por adherencia y empleando *Sacharomyces cerevisiae* opsonizada como la partícula a fagocitar, el porcentaje obtenido fue 57 (± 21.2 %), el cual no presenta una diferencia significativa con respecto al porcentaje obtenido con los leucocitos de humano (70.9 \pm 9.5%). La evaluación de los mecanismos oxidativos (analizados mediante la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio [rNBT]) mostró que el 70.5 (\pm 18.8%) de los leucocitos de armadillo activan mecanismos oxidativos para la destrucción de *S. cerevisiae*, este porcentaje fue menor que el de humanos (85.5 \pm 7.4%), encontrándose diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$). La capacidad bactericida y/o muerte intracelular de los neutrófilos de armadillo (mediante

conteo de colonias de *Staphylococcus aureus* incubado con los leucocitos de armadillo por 30, 60 y 120 min) mostró que el mayor porcentaje de muerte intracelular fue a los 120 min.

En cuanto a la evaluación de la producción de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, se evidenció que los sobrenadantes de los LPMN de armadillo estimulados con PMA (25, 50, 75 y 100 ng/ml) liberaron un factor con actividad citotóxica que podría ser TNF (valorado por el efecto citotóxico sobre la línea celular L-929). En lo que respecta a la producción de un factor con actividad similar a la IL-1 (determinado por la proliferación de timocitos de ratón) no se logró demostrar esta. No obstante, con el empleo de RT-PCR para IL-1 humana se logró identificar la presencia de RNAm para IL-1 en los LPMN estimulados con PHA y PMA. En cuanto a la IL-6, se identificó la presencia de RNAm para IL-6 en los LPMN de armadillo activados con PHA.

Con los resultados obtenidos, podemos describir que los LPMN de armadillo de nueve bandas tienen la capacidad y los elementos necesarios (al igual que otros mamíferos) para destruir microorganismos y liberar citocinas proinflamatorias, aunque cabe señalar que muestran una deficiencia en la producción de radicales libres de oxígeno, necesarios para la destrucción de diversos patógenos, la cual podría ser una de las causas para el establecimiento y crecimiento de *M. leprae*.

INTRODUCCIÓN

En 1873, Armauer Hansen¹ descubrió el bacilo de la lepra, describiéndolo como "cuerpos de forma redonda" en nódulos de un paciente con lepra lepromatosa, los cuales ya habían sido reportados en la "enfermedad de la lepra en ojo", el descubrimiento de Hansen estableció el carácter infeccioso de la lepra y originó la búsqueda de un modelo animal adecuado, la cual fue difícil porque este animal debía de ser susceptible a la infección con *M. leprae* de la misma manera que los humanos, es decir, que la infección se desarrollara en todos los órganos del cuerpo igual que en un paciente con lepra lepromatosa, y que para esto no hubiera la necesidad de que el animal estuviera sujeto a la inmunosupresión². En 1971, Kirchheimer y Storrs³, fueron los primeros en descubrir que el armadillo (*D. novemcinctus*) era susceptible a la infección experimental con *M. leprae*, este modelo presenta una infección con características bacteriológicas e histopatológicas semejantes a las de los pacientes con lepra lepromatosa, contribuyendo para ello las siguientes características del armadillo:

- 1) Los armadillos tienen un periodo de vida de 12 a 15 años, el cual es mayor al de otras especies en las que trató de crecer *M. leprae*.
- 2) Tienen una temperatura (rectal) de 30 a 36° C, y la temperatura de su tejido cambia de acuerdo a la temperatura del medio ambiente.
- 3) *Dasypus novemcinctus*, tiene un potencial único para la investigación de la lepra debido a que al nacimiento da origen a cuádruples monocigotos, lo cual hace posible la replicación de los experimentos con animales genéticamente iguales^{3,4}.

El armadillo es un mamífero cuyo habitat se encuentra localizado exclusivamente en el continente Americano, pertenece a la subclase Eutheria, super orden Edentata, orden Xenarthra y a la Familia Dasypodidae, la cual comprende 9 géneros. La familia Dasypodidae se ha clasificado por el número de bandas que muestran en su caparazón y se han dividido en dos tribus: la Prodontini, que es de 11 a 13 bandas y la Dasypodini, que presenta de 7 a 11 bandas^{5,6}.

En Norteamérica se encuentra el armadillo de nueve bandas (*D. novemcinctus*), el cual se ha dividido en 4 subespecies: *Dasypus novemcinctus davisii*, *D. n. fenestratus*, *D. n. hoplites* y *D. n. mexicanus*^{7,8}.

CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS DE *D. novemcinctus*

En el armadillo de nueve bandas *M. leprae* causa lesiones con características bacteriológicas e histopatológicas semejantes a las de pacientes con lepra lepromatosa en: piel, tejido nervioso periférico, nódulos linfáticos, bazo, hígado, ojos y testículos⁹, en los cuales forma infiltrados de macrófagos que contienen numerosos bacilos alcohol ácido resistentes. Sin embargo, solo el 80% de estos animales pueden desarrollar una infección diseminada, lo que sugiere que existen algunos mecanismos de resistencia en éstos. Debido a que *M. leprae* no crece en medios sintéticos, el armadillo se ha utilizado para obtener grandes cantidades de este microorganismo, lográndose de esta manera estudiar diversas características antigénicas y metabólicas de esta bacteria^{10,11}.

Estudios de los nervios periféricos de *D. novemcinctus*^{9,12} infectado experimentalmente con *M. leprae* reportaron mediante microscopia electrónica que las células infectadas fueron macrófagos, mientras que los neutrófilos no aparecieron parasitados, y que la

composición celular de los lepromas era: macrófagos ($74.7 \pm 2.6\%$), linfocitos ($13.9 \pm 5.7\%$), células plasmáticas ($4 \pm 0.4\%$) y neutrófilos ($0.7 \pm 0.1\%$)¹³.

Los armadillos de nueve bandas que han sido capturados en el campo presentan un espectro de respuesta histopatológica con las dos formas polares de la lepra, la tuberculoide y la lepromatosa, así como las manifestaciones intermedias de la enfermedad, las cuales son similares a los diferentes tipos de lepra que se han reportado en humanos¹⁴. Además de *D. novemcinctus*, también se ha descrito la infección experimental con lepra en otras dos especies de armadillos: *Dasyus hybridus* (de 7 bandas¹⁵) y *Dasyus sabanicola* (de 8 bandas¹⁶).

De esta manera, una vez que se estableció que el armadillo de nueve bandas era susceptible a la transmisión experimental con *M. leprae*, se iniciaron los estudios sobre su sistema inmune. Los primeros reportes¹⁷ indicaron que en la sangre de los armadillos (*D. novemcinctus*) adultos sanos en cautiverio predominaban los linfocitos, y en los armadillos silvestres los neutrófilos.

En el armadillo de nueve bandas se han logrado identificar por lo menos dos tipos de inmunoglobulinas, que por su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (PAGE) se parecen a las inmunoglobulinas de humanos, sugiriendo que corresponden a los isotipos Ig M e Ig G¹⁸. También se sabe que un porcentaje ($9.6 \pm 6.6\%$) de los linfocitos de sangre periférica presentan receptores para eritrocitos de carnero (rosetas E)¹⁹, y esas mismas células pueden ser estimuladas para transformación blastoide con mitógenos que estimulan a los linfocitos T y B de humanos, tales como la PHA y PWM²⁰. Los resultados de estimulación obtenidos con estos mitógenos sugieren pueden sugerir la presencia de diferentes poblaciones de linfocitos en los armadillos^{18,21} tal y como sucede en el humano. Además, poseen receptores Fc²² y receptores para la fracción del complemento C3b^{22,23}.

El reconocimiento de linfocitos B ha sido posible gracias a la detección de inmunoglobulinas de superficie, y se ha sugerido que en animales en cautiverio el porcentaje de esos linfocitos es del 20%²¹.

Otras características que se han estudiado en el armadillo son: circulación fetal dentro de la placenta, número de cromosomas, número y tamaño de vasos umbilicales, características de la hemoglobina, estructura y desarrollo de la placenta hemocorial, glándulas adrenales y salivales, así como características anatómicas de piel, sistema nervioso central y aparato reproductor²⁴.

Además, estudios inmunohistológicos realizados en el armadillo han permitido determinar las características anatómicas generales de su sistema inmunológico y determinar que posee órganos linfoides de apariencia idéntica a otros mamíferos^{25,26,27,28}.

Los estudios histopatológicos e inmunológicos de armadillos con lepra adquirida de manera experimental sugieren que existe un defecto en la inmunidad mediada por células similar al defecto que ocurre con la lepra lepromatosa en humanos, e investigaciones previas acerca de la inmunidad mediada por células en armadillo se han concentrado en conocer como los linfocitos de sangre periférica y macrófagos responden a los diferentes antígenos de *M. leprae*²⁹. Actualmente se conoce poco sobre el papel que juegan los leucocitos polimorfonucleares (LPMN), que son las primeras células que participan de manera importante en la eliminación de muchos patógenos y en el desarrollo del fenómeno inflamatorio. Puesto que las células fagocíticas juegan un papel importante en el control y/o progreso de muchas enfermedades infecciosas³⁰ es importante estudiar los mecanismos a través de los cuales participan en la respuesta inmune. Los neutrófilos constituyen entre 60 y 75% de los leucocitos sanguíneos en la mayor parte de los carnívoros, sin embargo en otros mamíferos como el caballo, solo representan el 50% de los leucocitos, mientras en

los rumiantes como los bovinos, ovejas y roedores de laboratorio el porcentaje es de 20 a 30%^{31,32}. En los armadillos el porcentaje de neutrófilos es del 33 y 57% en condiciones de cautiverio y silvestres respectivamente²⁰.

Se ha visto que en pacientes con lepra lepromatosa los LPMN no parecen tener ninguno defecto cuando son comparados con LPMN de controles normales, y aún cuando estas células muestran funciones fagocíticas normales no existe una explicación del por qué pacientes con lepra lepromatosa muestran una devastación progresiva y una respuesta inflamatoria deprimida, pues se ha reportado que aún cuando los fagocitos de pacientes con lepra lepromatosa son intrínsecamente normales, su capacidad endocítica esta disminuída por "factores" presentes en el suero de estos pacientes³⁰.

Los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) son células fagocíticas profesionales cuya función combinada explica la muerte de microorganismos invasores. La muerte de microorganismos debida a las células fagocíticas depende de una variedad de mecanismos, entre los cuales algunos son dependientes de oxígeno y otros no. Los mecanismos dependientes de oxígeno incluyen la generación de especies de oxígeno altamente reactivas (radicales libres) y el sistema de mieloperoxidasa. Entre los mecanismos microbicidas que no dependen de oxígeno se encuentran: el medio ácido del interior del fagolisosoma, la actividad hidrolítica de hidrolasas ácidas y neutras, el efecto de otras proteínas catiónicas más que las enzimas hidrolíticas, y la actividad de factores que incrementan la permeabilidad de la pared celular bacteriana³³.

FUNCIONES DE LOS LPMN

Los LPMN son liberados normalmente de la médula ósea como células maduras con la habilidad para migrar, adherirse, fagocitar partículas y dar muerte a microorganismos, también se ha sugerido que pueden tener efecto citotóxico sobre células tumorales³⁴.

La función primordial de los LPMN es la de fagocitosis, además de desempeñar un papel importante en los procesos inflamatorios ya sea normales o de defensa, o anormales como en los procesos alérgicos y enfermedades autoinmunes³⁵. Estos eventos se caracterizan por la infiltración de leucocitos al sitio del daño. La acumulación de leucocitos desde el torrente sanguíneo al sitio del daño es un proceso que comprende varios pasos y requiere de la expresión y activación coordinada de moléculas de adhesión, así como la generación de gradientes quimiotácticos por parte de las células del compartimento extravascular.

El resultado de la interacción entre los LPMN y el microorganismo depende de la integridad de los mecanismos de reconocimiento del fagocito hacia la partícula, opsonización sérica del microorganismo, adhesión de la partícula a la superficie de la célula, ingestión y mecanismo microbicida en el fagocito³⁴.

CITOCINAS

Todas las células del sistema inmune necesitan estar comunicadas entre sí para elaborar de forma conjunta y ordenada una respuesta inmune que termine en la eliminación del patógeno. Para ello, las células utilizan dos medios principales de comunicación: 1) el contacto directo mediante las distintas moléculas de membrana; y 2) la síntesis de pequeñas proteínas que reciben el nombre genérico de citocinas. Estas proteínas son producidas en los primeros instantes de la activación celular, alertando a las diferentes células que poseen receptores de citocinas en la membrana de que hay una respuesta inmune en marcha. Las funciones de las citocinas son: regular la duración y la amplitud de la respuesta inmune, tanto innata como específica; reclutar células a la zona de conflicto, e inducir la generación de nuevas células a partir de los precursores hematopoyéticos, siendo el objetivo primordial el de eliminar al patógeno y reparar los tejidos dañados³⁶.

Si un patógeno consigue atravesar las barreras físicas y químicas de un organismo y alcanzar un determinado tejido, se encontrará primero con los LPMN y posteriormente con los macrófagos y los mastocitos que se localizan en ese tejido. La unión del patógeno provoca la síntesis de diversas citocinas. Dentro de estas citocinas (llamadas monocinas, ya que son producidas principalmente por células del linaje monocito-macrófago) se encuentran la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 y el TNF- α .

El TNF- α es uno de los principales iniciadores de la respuesta inflamatoria, ya que actúa sobre los vasos sanguíneos de la zona infectada, provocando un incremento del diámetro y la permeabilidad vascular, permitiendo con ello la acumulación de inmunoglobulinas, complemento y otras proteínas sanguíneas. Algunos de los inductores más conocidos en la producción de TNF, son sustancias como el LPS y los esteres de forbol (como PMA y TPA).

Las principales funciones biológicas del TNF a bajas concentraciones son: 1) Expresión de nuevos receptores de superficie de las células del endotelio vascular (moléculas de adhesión) que hacen que la superficie de estas células sea adhesiva para los leucocitos, inicialmente para neutrófilos y subsecuentemente para monocitos y linfocitos. También actúa sobre los neutrófilos para incrementar su adhesividad por células endoteliales. Estas acciones contribuyen a la acumulación de leucocitos en el sitio de inflamación, 2) Activación de los leucocitos para una mayor muerte intracelular. Es un potente activador de neutrófilos, pero también afecta a los eosinófilos y fagocitos mononucleares, 3) Estimulación de fagocitos mononucleares y de otros tipos de células para producir citocinas (IL-1, IL-6, el mismo TNF y quimiocinas) y 4) Efecto protector similar al del interferon contra

virus, promoviendo la expresión de moléculas del MHC clase I y potenciando la lisis mediada por CTL de células infectadas por virus³⁷.

La IL-1 y la IL-6 actúan sobre distintas células, tejidos y órganos para coordinar una reacción global de todo el organismo frente a la infección. Entre estas reacciones destacan el aumento del catabolismo de grasas y proteínas del tejido adiposo, hepático y muscular para inducir un aumento de la temperatura corporal (fiebre), movilización de neutrófilos de la médula ósea y de los endotelios, y aumento de la síntesis y secreción de las llamadas proteínas de fase aguda por los hepatocitos^{37, 38}.

En lo que respecta a la IL-6, es una glucoproteína de 26 kDa que no solo se produce en los macrófagos activados, sino también en los fibroblastos, células endoteliales, células mesangiales, queratinocitos y linfocitos activados. La IL-6 actúa en diversas células blanco, entre ellas los linfocitos, fibroblastos y hepatocitos³¹ en respuesta a la IL-1 y en menor alcance al TNF. La IL-6 puede ser detectada en el suero sanguíneo después de la infección por bacterias Gram-negativas, por la activación con TNF o IL-1 más que por LPS^{34,37}.

En LPMN de humanos se han realizado estudios que demuestran que estas células son capaces de expresar RNAm para algunas citocinas (IL-1, IL-6, TNF, etc.), sin embargo, no existen antecedentes en lo que se refiere a la capacidad secretora de estas citocinas por parte de los LPMN del armadillo de nueve bandas *D. novemcinctus*, aunque se menciona que el efecto de citocinas como IL-2rh, IL-6rh e IL-3rR sobre linfoblastos de armadillo es de tipo mitogénico, siendo la IL-6rh la que tiene mayor efecto²¹, esto no es sorprendente, ya que se ha sugerido que varias citocinas se han conservado a través de la evolución, con similitud tanto estructural como bioquímica entre las diferentes clases de vertebrados e invertebrados, ya que se ha detectado la presencia de factores con actividad similar a IL-1 α

y β , IL-2, INF- γ , TNF- α , IL-4 e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos de grupos zoológicos como: patos, ranas, sapos, salamandras, ajolotes y chivos²¹.

Por todo lo anteriormente expuesto, es necesario investigar las funciones de los LPMN de *D. novemcinctus* para conocer si existen deficiencias para dar muerte (capacidad bactericida) a los microorganismos invasores o en la inducción de la respuesta inmune. Los conocimientos logrados serán útiles para explicar las causas por las que los armadillos son susceptibles a la inoculación experimental con *M. leprae*. Por esta razón, en el presente estudio nos propusimos evaluar diversos mecanismos funcionales y bactericidas de los LPMN del armadillo de nueve bandas *D. novemcinctus*.

OBJETIVO GENERAL

ESTUDIAR LOS MECANISMOS EFECTORES DE LOS LPMN DEL ARMADILLO DE NUEVE BANDAS

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) **EVALUAR LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA HACIA DIVERSAS SUSTANCIAS QUIMIOATRAYENTES**
- 2) **DETERMINAR LA CAPACIDAD FAGOCITICA CONTRA LEVADURAS (*Saccharomyces cerevisiae*)**
- 3) **EVALUAR LOS MECANISMOS OXIDATIVOS MEDIANTE LA REDUCCIÓN DEL NITROAZUL DE TETRAZOLIO (rNBT)**
- 4) **DETERMINAR LA ACTIVIDAD BACTERICIDA CONTRA *Staphylococcus aureus***
- 5) **CUANTIFICAR LOS NIVELES DE TNF- α E IL-1 ANTE EL ESTIMULO DE ESTER DE FORBOL MIRISTATO ACETATO (PMA) Y LIPOPOLISACARIDO BACTERIANO (LPS)**
- 6) **DETECTAR LA PRODUCCIÓN DE IL-6 MEDIANTE EL ESTIMULO DE PMA POR MEDIO DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR (RT-PCR)**

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DE SANGRE PERIFERICA^{26,27,28}

Se sangraron 10 armadillos de nueve bandas (los cuales serán mencionados en resultados y discusión como muestra 1,2,3.....etc.) no inoculados con *M. leprae*. La obtención de sangre se llevó a cabo mediante punción cardiaca. Los animales fueron anestesiados con Ketamina base(ketalar, 35 mg/kg de peso) por vía intramuscular. De cada animal se obtuvieron 15 ml de sangre periférica, la cual se distribuyó de la siguiente manera: en un primer tubo que contenía heparina (10 µl de una concentración de 60 UI/ml [tubo 1]) se colocaron 3 ml de la sangre, en un segundo tubo (tubo 2) que contenía 5 ml de la solución de Alsever(apéndice I.1) se adicionó 10 ml de la sangre, y los 2 ml de sangre restantes se distribuyeron en 4 cubreobjetos previamente desengrasados. Todos las muestras se emplearon para realizar los siguientes ensayos: I. Evaluación de la actividad quimiotáctica, II. Determinación de la capacidad fagocítica, III. Medición del estallido respiratorio, IV. Determinación de la capacidad bactericida, V. Cuantificación del factor de necrosis tumoral, VI. Cuantificación de IL-1 y VII. Detección molecular de IL-6.

Como grupo control para la determinación de fagocitosis, rNBT, capacidad bactericida y quimiotaxis se emplearon LPMN de sangre periférica de humano.

Purificación de LPMN³⁹

Para la purificación de LPMN se empleó el tubo que contenía 3 ml de sangre heparinizada (tubo 1), al cual se le adicionó además 3 ml de solución de Alsever y 3 ml de solución de dextran al 6% (apéndice I.2). La mezcla se incubó durante 45 min a 37° C en una estufa con una atmósfera de CO₂ al 5% para permitir la sedimentación de eritrocitos. Después el plasma (solución rica en leucocitos totales) se recuperó y se centrifugó a 1500 rpm durante

8 min, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 5 ml de solución salina fosfatos (PBS, apéndice I.3). La suspensión de células se colocó en tubos cónicos que contenían 2.5 ml de ficoll-hypaque ($\delta=1.007 \pm 0.001$, apéndice I.4), los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 30 min. Las células de la interfase se eliminaron y se recuperó el botón celular.

Estas células se lavaron por centrifugación a 1500 rpm durante 8 min con 5 ml de PBS.

Finalmente, se cuantificó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión con azul tripano(apéndice I.5 y III.9) .

I. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA HACIA DIVERSAS SUSTANCIAS QUIMIOATRAYENTES⁴⁰

Purificación de LPMN (técnica anteriormente descrita)

Agentes quimiotácticos

1) El péptido bacteriano N-formil metionil leucil fenil alanina (fMLP) a diferentes concentraciones (8×10^{-4} , 8×10^{-6} y 8×10^{-8} M [apéndice II.1]), 2) suero humano activado con *Escherichia coli* (SHA) (apéndice II.2), 3) suero de armadillo activado con *E. coli* (SAA)(apéndice II.2) y 4) medio RPMI-1640 (testigo).

Ensayo de quimiotaxis

Se llevó a cabo en placas TRANSWELL (Transwell polycarbonate membrane, COSTAR) de 6.5 mm de diámetro y poro de 5.0 μ M.

Se adicionó al pozo interno 100 μ l de medio RPMI-1640 y al externo 600 μ l del mismo para equilibrar los pozos. La microplaca se incubó durante 30 min a 37° C en una estufa con atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado el tiempo de incubación se eliminó el medio de ambos pozos. Posteriormente se adicionó al pozo interno 1×10^6 LPMN (en un volumen de 100 μ l

de medio RPMI-1640) y al pozo externo 600 µl de cada uno de los quimioatrayentes (por separado) o del medio RPMI-1640(testigo), inmediatamente se incubó la microplaca durante 2 h a 37° C en una estufa con atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado el tiempo de incubación, se recuperaron los sobrenadantes de los pozos externos en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 8 min a 1500 rpm, después se eliminó el sobrenadante y los LPMN se resuspendieron en 100 µl de líquido de Turk (apéndice III.1) y se procedió a contar el número de LPMN de cada sobrenadante en la cámara de Neubauer

Los resultados se reportaron como **Indice de Migración (I.M)** , calculado con la siguiente fórmula:

$$I.M = \frac{\text{Migración dirigida}^*}{\text{Migración al azar}^{**}}$$

*No. de LPMN que migraron hacia el agente quimiotáctico

** No. de LPMN que migraron hacia el testigo (medio RPMI-1640)

Se determinó la significancia estadística mediante la prueba de U Mann-Whitney con un valor de $p < 0.05$.

II. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA⁴¹

Para la determinación de la capacidad fagocítica se tomaron dos de los cuatro cubreobjetos con sangre sin anticoagulante, los cuales se incubaron durante 45 min a 37° C en estufa con atmósfera de CO₂ al 5% para permitir la adherencia de los LPMN. Posteriormente, se adicionaron 2 ml de solución salina balanceada de Hanks (SSBH, apéndice I.6) para retirar el coágulo formado, se continuó con 5 lavados de 2 ml de SSBH para eliminar el exceso de eritrocitos.

Ya finalizados los lavados, los cubreobjetos con los LPMN fueron colocados en una caja Petri con medio mínimo esencial (MEM) adicionado con 10% de suero fetal de ternera (SFT) y 1 ml de levaduras de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) opsonizadas con suero de armadillo y/o humano (apéndice II.3). Posteriormente, las cajas Petri conteniendo los cubreobjetos se incubaron a 37° C en estufa con atmósfera de CO₂ al 5% durante 60 min, los cubreobjetos se lavaron con SSBH para eliminar el exceso de levaduras y se llevó a cabo una tinción de los cubreobjetos con el colorante de Wright al 2% (apéndice III.1) durante 3 min. Las muestras se observaron en un microscopio óptico. Se determinó el porcentaje de células que ingirieron levaduras (capacidad fagocítica) en un total de 100 LPMN. La cuenta se hizo por duplicado.

La significancia estadística se calculó mediante la prueba de U Mann-Whitney con un valor de $p < 0.05$.

III. MEDICION DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO MEDIANTE LA REDUCCION DEL COLORANTE NITROAZUL DE TETRAZOLIO (NBT)⁴¹

El estallido respiratorio es un mecanismo que emplean las células para la destrucción de microorganismos mediante la producción de intermediarios de oxígeno (singletes de oxígeno, radical super óxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo). El nitroazul de tetrazolio (NBT) es un colorante que compite por los electrones producidos durante el estallido respiratorio, reacción que se puede detectar mediante un cambio de color del NBT, el cual en su estado oxidado es amarillo y al captar los electrones pasa a un estado reducido, tornándose a un color azul o morado, lo que finalmente provoca la precipitación del NBT en forma de sales de formazán.

Para la medición del estallido respiratorio se emplearon dos cubreobjetos con sangre sin anticoagulante, en los cuales se permitió la adherencia de los LPMN mediante el

procedimiento ya descrito en el punto II. Posteriormente, los cubreobjetos con LPMN ya libres de eritrocitos se colocaron en una caja Petri y se adicionaron 2 ml de medio MEM adicionado con SFT al 10%, 1 ml de levaduras opsonizadas (relación 10:1) y 1 ml de NBT (0.2%, apéndice III.2). Los cubre objetos se incubaron a 37° C en estufa con atmósfera de CO₂ al 5% durante 60 min. Finalizado el tiempo de incubación, los cubreobjetos se lavaron para eliminar el exceso de colorante y levaduras. Posteriormente, se realizó una tinción con safranina (0.5%, apéndice III.3) durante 5 min, el exceso de colorante se eliminó mediante lavados con SSBH y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó el porcentaje de células que realizaron la reducción del colorante NBT en un total de 100 células que ingirieron las levaduras adicionadas. La lectura se hizo por duplicado.

Se determinó la significancia estadística mediante la prueba de U Mann-Whitney con un valor de $p < 0.05$.

IV. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA CONTRA *Staphylococcus aureus*⁴²

Purificación de LPMN. Técnica anteriormente descrita, pero los LPMN fueron finalmente resuspendidos en RPMI-1640 con gelatina al 0.1% (apéndice IV.2).

Bacterias

Las bacterias (*Staphylococcus aureus*) se hicieron crecer en medio BHI (apéndice II.4) durante 24h a 37°C, posteriormente se ajustaron de forma visual al tubo 1 del nefelómetro de McFarland⁴³, el cual indica que se tienen 3×10^8 bacterias por cada ml. Después se centrifugaron por 15 min a 3500 rpm y el botón se resuspendió en RPMI-1640 con gelatina al 0.1%.

Preparación de las placas de agar soya tripticasa (apéndice IV.3).

Opsoninas

Como agente opsonizante se empleó suero descomplementado de armadillo y/o humano, diluidos 1:10,000 con medio RPMI-1640 con gelatina al 0.1%.

Ensayo de la capacidad bactericida

Se adicionaron a cada tubo 1 X 10⁶ LPMN (100µl), 10 X 10⁶ bacterias (100 µl) para tener una relación de 10 bacterias por cada LPMN y suero descomplementado de armadillo y/o humano (por separado [50 µl]) diluido 1:10,000 con RPMI-1640 con gelatina al 0.1%, todo esto en un volumen final de 250 µl. Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 500 rpm y posteriormente se incubaron (0, 30, 60 y 120 min) a 37°C. Finalizado cada periodo de incubación se tomó 1µl de la mezcla fagocítica de cada uno de los tubos y se adicionaron 999 µl de agua, se agitaron los tubos en vortex y se sembraron 10µl de cada tubo en una placa de agar soya tripticasa por duplicado. Las placas de agar soya tripticasa se incubaron a 37° C durante 24 h. El número de bacterias viables se determinó por conteo de colonias en un analizador de imágenes (MultiImage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corp.).

Como control se realizó una cinética de tiempo de incubación contra porcentaje de muerte bacteriana intracelular, incubando las bacterias con suero de armadillo y/o humano (por separado) durante 0, 30, 60 y 120 min.

Los resultados se reportaron como porcentaje de muerte intracelular (% MI) con las siguiente fórmula:

$$\% \text{ de MI} = \frac{\text{No. bacterias al tiempo 0} - \text{No. bacterias (30, 60 y 120 min)}}{\text{No. de bacterias al tiempo 0}} \times 100$$

Se determinó la significancia estadística mediante la prueba de U Mann-Whitney con un valor de $p < 0.05$.

V. CUANTIFICACION DE UN FACTOR CON ACTIVIDAD SIMILAR AL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α (TNF α)⁴⁴.

Se determinó la capacidad de los LPMN para producir TNF α e IL-1 ante el estímulo de lipopolisacárido bacteriano (LPS), acetato de forbol miristato (PMA) y la combinación LPS/PMA de la siguiente manera:

Purificación de LPMN (técnica anteriormente descrita)

Cultivo de LPMN para la producción de TNF α

Se colocaron en cada pozo de una microplaca de 24 pozos 1×10^6 LPMN y diferentes concentraciones de los distintos inductores: LPS (1 μ g/ml, apéndice II.5), PMA (25, 50, 75 y 100 ng/ml, apéndice II.6) y LPS+PMA (1 μ g/10ng/ml). La microplaca se incubó a 37° C en estufa con atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h. Después se recuperaron los sobrenadantes del cultivo por centrifugación a 1500 rpm durante 8 min y se congelaron a -70° C hasta el momento de su uso.

Cuantificación de TNF- α .

Para la cuantificación de TNF α se realizó el bioensayo de citotoxicidad en células L-929, debido a que estas células son sensibles al TNF.

Cultivo de células L-929.

El bioensayo más comúnmente empleado para medir TNF- α o TNF- β utiliza la acción citotóxica que tienen estas citocinas sobre la línea celular L-929 (ATCC, Rockville, M.D.), la cual es una línea de fibroblastos de ratón adulto C3H⁴⁵.

Las células L-929 se cultivaron en botellas de 25 cm² con medio RPMI-1640 complementado (apéndice IV.4) y mantenidas a 37° C y atmósfera de CO₂ al 5%.

Tripsinización de células L-929.

Las células L-929 conservadas en botellas de 50 ml se lavaron 2 veces con SSBH, después del último lavado, a las células se les adicionaron 3 ml de tripsina (apéndice I.7), la botella se incubó a temperatura ambiente por 60 seg, en seguida se eliminó la tripsina y se adicionaron 5 ml de RPMI-1640, despegando la capa celular mediante un fuerte golpe. La suspensión celular se recuperó centrifugando a 1500 rpm durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2 ml de RPMI-1640 fresco, posteriormente se contó el número de células mediante la técnica de exclusión con azul tripano. La suspensión celular se ajustó a 2×10^5 células/ml.

Cultivo de células L-929 en placas de poliestireno.

Se depositaron 100 μ l (2×10^4 células/pozo) de la suspensión celular en cada pozo de una microplaca de 96 pozos de fondo plano. La microplaca se incubó durante 24 h a 37° C en estufa con atmósfera de CO₂ al 5% para permitir la adherencia de las células en la superficie de la microplaca.

Detección de TNF- α .

Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el medio de los pozos de la microplaca de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 100 μ l de los sobrenadantes del cultivo de LPMN de armadillo que fueron estimulados con los diferentes inductores y 100 μ l del medio de cultivo RPMI-1640 complementado con SFT al 10% y actinomicina D (1 μ g/ml, apéndice IV.5), el análisis de cada muestra se realizó por triplicado. Se realizó también una curva tipo de TNF- α mediante la adición de TNFrR para determinar la concentración del mismo en los sobrenadantes de los LPMN de armadillo activados con los diferentes inductores. La microplaca se incubó durante 24 h a 37° C en estufa con atmósfera de CO₂ al 5%. Después

del periodo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron a cada pozo 100µl de metanol durante 7 min a temperatura ambiente para fijar las células, en seguida se eliminó el exceso de metanol y se agregó a cada pozo 50 µl de una sal de cristal violeta al 2% (apéndice III.5). La microplaca se incubó por 10 min a temperatura ambiente, después se decantó el colorante y se lavó cinco veces con 200 µl de PBS/pozo para eliminar el exceso de colorante. Al terminar los lavados, se adicionaron 100 µl/ pozo de ácido acético al 33% (apéndice I.8), se agitó la microplaca hasta que se logró la extracción total del colorante. Por último, la lectura de la microplaca se hizo en un lector de ELISA a una longitud de onda de 660 nm. Los resultados fueron expresados en unidades de TNF, calculados a partir del porcentaje de citotoxicidad obtenido sobre las células L-929 con medio de cultivo solamente (controles).

(1 Unidad de TNF= 50% de citotoxicidad celular)

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 - \text{Porcentaje de sobrevivencia}^*$$

$$\text{*Porcentaje de sobrevivencia} = \frac{\text{As 600 nm del blanco} - \text{As del problema}}{\text{As 600 nm del blanco}} \times 100\% \text{ de sobrevivencia}$$

VI. DETECCIÓN Y CUANTIFICACION DE UN FACTOR CON ACTIVIDAD SIMILAR A LA INTERLEUCINA 1 (IL-1)³⁹ EN EL SOBRENADANTE DEL CULTIVO DE LPMN DE ARMADILLO

Purificación de LPMN de armadillo

Técnica anteriormente descrita.

Cuantificación de IL-1

Se llevó a cabo mediante el ensayo de proliferación de timocitos de ratón de la siguiente manera:

Se extrajeron los timos de 4 ratones de la cepa C 57 de 6 a 10 semanas de edad, los timos se maceraron cuidadosamente (empleando medio RPMI-1640), la suspensión celular se pasó a un tubo de 15 ml y se adicionaron 10 ml de medio RPMI-1640. El tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los timocitos en medio fresco. En seguida se contaron las células mediante la técnica de exclusión con azul tripano y se ajustaron a 40×10^6 células/ml y se adicionaron alicuotas de 100 μ l (4×10^6 células/pozo) en cada pozo de una microplaca de 96 pozos de fondo plano y se agregaron 50 μ l de fitohemaglutinina (*Phaseolus vulgaris*) a una concentración submitogénica (0.1 μ g/ml)(apéndice II.8), la placa se incubó 24 h a 37° C en una estufa con atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado el tiempo de incubación se lavaron dos veces las células con SSBH 1X, se adicionaron 150 μ l de medio fresco y 50 μ l de los sobrenadantes de los LPMN de armadillo activados previamente con LPS (1 μ g/ml), PMA (10 ng/ml) y LPS/PMA (1 μ g/10ng/ml), así como concentraciones conocidas de IL-1 para realizar una curva tipo (adicionando 50 μ l de las diferentes concentraciones de IL-1: 0, 1, 5, 10, 15 y 25 pg/ml), todo en un volumen final de 200 μ l. Cada muestra se analizó en la placa de 96 pozos por triplicado.

La placa se incubó durante 48 h a 37° C en una estufa con atmósfera de CO₂ al 5%. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico con MTT(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio).

Ensayo colorimétrico con MTT³⁹

Terminado el tiempo de incubación, la microplaca se centrifugó 8 min a 1500 rpm, se eliminó el medio de cultivo y se adicionaron 180 μ l de medio fresco y 20 μ l de MTT (apéndice III.5). La microplaca se incubó por 4 h a 37° C en una estufa con atmósfera de CO₂ al 5%. Finalizada la incubación, la microplaca se centrifugó 8 min a 1500 rpm, se

eliminó el sobrenadante y posteriormente se hicieron 2 lavados con 100 μ l de Alsever; después se adicionaron 200 μ l de SDS al 3% (apéndice III.2) para disolver los cristales de formazán. Se centrifugó la placa 10 min a 3000 rpm y se transfirieron 300 μ l de los sobrenadantes a una celda para su lectura a 570 nm en un espectrofotómetro (Helios, UNICAM).

VII. DETECCIÓN MOLECULAR DE IL-6 POR RT-PCR EN LEUCOCITOS TOTALES DE ARMADILLO ESTIMULADOS CON PMA Y PHA.

Cultivo de LPMN en presencia de PMA y/o PHA y ensayo de RT-PCR Técnica de RT-PCR⁴⁶

Para la obtención del RNAm, los LPMN (1×10^6) se recuperaron en tubos eppendorf después de 4h de estímulo con PMA (10ng/ml) y/o PHA (10 ng/ml), a cada tubo se les adicionó 0.8 ml de la solución TripureTM (Boehringer, Mannheim), se agitaron vigorosamente y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 160 μ l de cloroformo, los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron por 15 min más a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4° C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el RNA se precipitó con 0.4 ml de isopropanol; el tubo se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 10 min a 4° C.

El RNA precipitado se lavó con 0.8 ml de etanol al 75% y se solubilizó en agua tratada con dietilpirocarbonato. Después se analizó la integridad del material genético en un gel de agarosa al 0.8% (apéndice I.9). Una vez llevado a cabo lo anterior, se procedió a la obtención del cDNA a partir del RNA obtenido mediante transcriptasa reversa empleando el kit comercial 1st Strand cDNA synthesis (AMV, Boehringer, Mannheim). El cDNA

obtenido se amplificó mediante PCR en un termociclador (PTC-100, MJ Research) utilizando iniciadores específicos para la detección de IL-6h (apéndice II.9) e IL-1h (apéndice II.10).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l, conteniendo: 0.1 μ M de oligonucleótidos, 250 μ M de las bases, buffer de reacción 1X, 3 mM de $MgCl_2$, 3 UI de Taq DNA polimerasa y 8 μ l del cDNA. La mezcla de reacción se sometió a 3 min de desnaturalización a 95° C seguido de 40 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones: Desnaturalización 1 min a 95° C, 1 min para alineación a 60° C, elongación durante 3 min a 70° C y una extensión final de 5 min a 72° C. El producto de la amplificación se observó en un gel de agarosa al 2% (apéndice I.10) teñido con bromuro de etidio (apéndice III.6).

RESULTADOS

I. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA HACIA DIVERSAS SUSTANCIAS QUIMIOATRAYENTES

Se determinó el índice de migración (IM) de LPMN de armadillo identificándose el número de células que atraviesan una membrana ante diversos agentes quimioatrayentes.

Cada uno de los agentes quimiotácticos que se muestran en la Tabla 1 se empleó de manera individual, no se hicieron mezclas.

Los resultados de migración se muestran en la tabla 1. Los LPMN de armadillo presentaron una actividad de migración tanto hacia el suero de armadillo estimulado con *E. coli* (SAA) ($5\ 164 \pm 1\ 35$) como al fMLP a las concentraciones de 8×10^{-4} M ($1\ 433 \pm 0\ 18$), 8×10^{-6} M ($1\ 331 \pm 0\ 12$) y 8×10^{-8} M ($1\ 009 \pm 0\ 17$). En contraste, el empleo de suero humano estimulado con *E. coli* (SHA) no induce una actividad de migración de los LPMN de armadillo hacia este ($0\ 567 \pm 0\ 18$).

Una observación interesante fue que el SAA induce una mayor migración de LPMN de humano ($34\ 395 \pm 6\ 46$) que su propio suero homólogo ($22\ 193 \pm 1\ 74$) (Tabla 1).

TABLA 1. Índice de Migración (IM) de LPMN de armadillo y de humano hacia diferentes quimioatrayentes.

Agente quimiotáctico	LPMN de armadillo ^a (IM)	LPMN de humano ^a (IM)
Suero humano activado con <i>E. coli</i> (SHA)	$0\ 567 \pm 0\ 18^*$	$22\ 193 \pm 1\ 74^*$
Suero de armadillo activado con <i>E. coli</i> (SAA)	$5\ 164 \pm 1\ 35^*$	$34\ 395 \pm 6\ 466^*$
FMLP ^b 8×10^{-4} M	$1\ 433 \pm 0\ 18^*$	$3\ 514 \pm 0\ 660^*$
FMLP 8×10^{-6} M	$1\ 331 \pm 0\ 12$	$2\ 981 \pm 0\ 682$
FMLP 8×10^{-8} M	$1\ 009 \pm 0\ 17$	$0\ 886 \pm 0\ 190$

a Índice de migración representado por la media \pm el error estandar

b Péptido formil metionil leucil fenil alanina

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

II. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA

El porcentaje promedio de fagocitosis en LPMN de armadillos fue del 57%, y los rangos fueron de 35.8 a 78.2 %, mientras que en LPMN de humano fue del 70.9% y los rangos fueron de 61.4 a 80.4%. El análisis estadístico mostró que al comparar estos dos grupos no hubo ninguna diferencia en el porcentaje de fagocitosis (Tabla 2).

Sin embargo, cabe señalar que 4 armadillos presentaron un porcentaje de fagocitosis menor al 50 %, a diferencia de lo que ocurrió en humanos, en donde se observó que todas las muestras presentaron porcentajes mayores del 50 %.

TABLA 2. Porcentaje de fagocitosis^a de LPMN de armadillo y humano

No. de muestra	% de fagocitosis en LPMN de armadillo	% de fagocitosis en LPMN de humano
1	24.5	56.5
2	25.5	67
3	45	72.5
4	45	75.5
5	59	77
6	66	58
7	70.5	64
8	71	88
9	78.5	76
10	85	74
X	57	70.9
e.s	6.64	3.0
d.e	21.2*	9.5*

^a Fagocitosis de *S. cerevisiae* (opsonizada) e.s error estandar d.e desviación estandar x media *No existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos

III. MEDICION DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO MEDIANTE LA REDUCCION DEL COLORANTE NITROAZUL DE TETRAZOLIO (rNBT)

Se determinó el porcentaje (%) de reducción del colorante nitroazul de tetrazolio de LPMN de armadillo y humano aparentemente sanos mediante la técnica de adherencia en cubreobjetos

El porcentaje promedio de rNBT en armadillos fue del 70.55% y los rangos fueron de 51.7 a 89.3 %, mientras que en humano fue de 85.5% y los rangos fueron de 78.1 a 92.9%. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estos dos grupos (Tabla 3)

Cabe señalar que en 4 armadillos, el porcentaje de rNBT fue menor del 70 %. Al identificar a estos animales, se observó que dos de ellos mostraron porcentajes bajos de fagocitosis (25.5 y 24.5 %) (Tabla 4), mientras que otros animales mostraron una baja actividad fagocítica con un aumento en la rNBT.

TABLA 3. Porcentaje de reducción de NBT de LPMN de armadillos y humanos

No. de muestra	% de rNBT en armadillo	% de rNBT en humano
1	81.5	84.5
2	48.5	84.5
3	45	75
4	75	76
5	86	92.5
6	67	81
7	42	93.5
8	83	83
9	93.5	97.5
10	84	88
X	70.5*	85.5*
e.s	5.9	2.3
d.e	18.8	7.4

* Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$)
e.s error estandar d.e desviación estandar x media

TABLA 4. Porcentaje de fagocitosis y reducción de NBT de LPMN de armadillos

No. de muestra	Porcentaje de fagocitosis	Porcentaje de rNBT
1	24.5	81.5
2	25.5	48.5
3	45	45
4	45	75
5	59	86
6	66	67
7	70.5	42
8	71	83
9	78.5	93.5
10	85	84
X	57	70.5
d.e	21.2	18.8
e.s	6.64	5.9

e.s error estandar x media d.e desviación estandar

IV. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE LPMN CONTRA

Staphylococcus aureus

La capacidad bactericida de los LPMN de armadillo se determinó mediante su capacidad para destruir a *S. aureus* en diferentes periodos de tiempo (0, 30, 60 y 120 min de incubación), esta se comparó con la capacidad bactericida de los LPMN de humanos. Primero se llevó a cabo una cinética de tiempo para determinar el efecto del suero (de armadillo y humano) sobre la viabilidad de *S. aureus* (Fig 1). Los resultados mostraron que el suero de armadillo ejerce un débil efecto inhibitor sobre la viabilidad de *S. aureus* a los 60 y 120 min de incubación, mientras que el suero de humano no mostró este efecto, sin embargo cabe señalar que no hubo una diferencia estadística significativa entre ambos

grupos

Posteriormente se determinó la capacidad bactericida de los LPMN de armadillo y humano hacia *S. aureus* opsonizada con el suero homólogo de cada una de las especies. Los datos se reportaron como porcentaje de muerte intracelular (% MI).

Los resultados mostraron que la capacidad bactericida de los LPMN de armadillo fue menor que la de humano a los 30 y 60 min de incubación (figura 2). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa entre ambos grupos, aunque es importante señalar que la tendencia de la capacidad bactericida de los LPMN de armadillo fue mantenerse constante entre los 30 y 60 min, y posteriormente aumentar el %MI entre los 60 y 120 min, mientras que en humano la capacidad bactericida se mantuvo constante a través del tiempo, aunque no hubo diferencia estadística significativa.

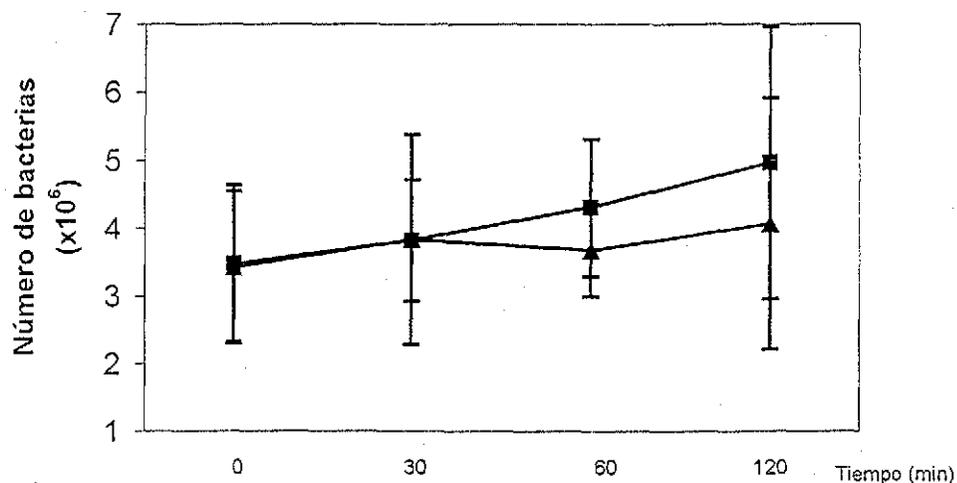


Fig. 1 Efecto del suero de armadillo sobre la cinética de viabilidad de *S. aureus*. Las barras representan la media y desviación estandar de la viabilidad de *S. aureus* después de la incubación con LPMN de armadillo (▲) o humano (■) a los 30, 60 y 120 min.

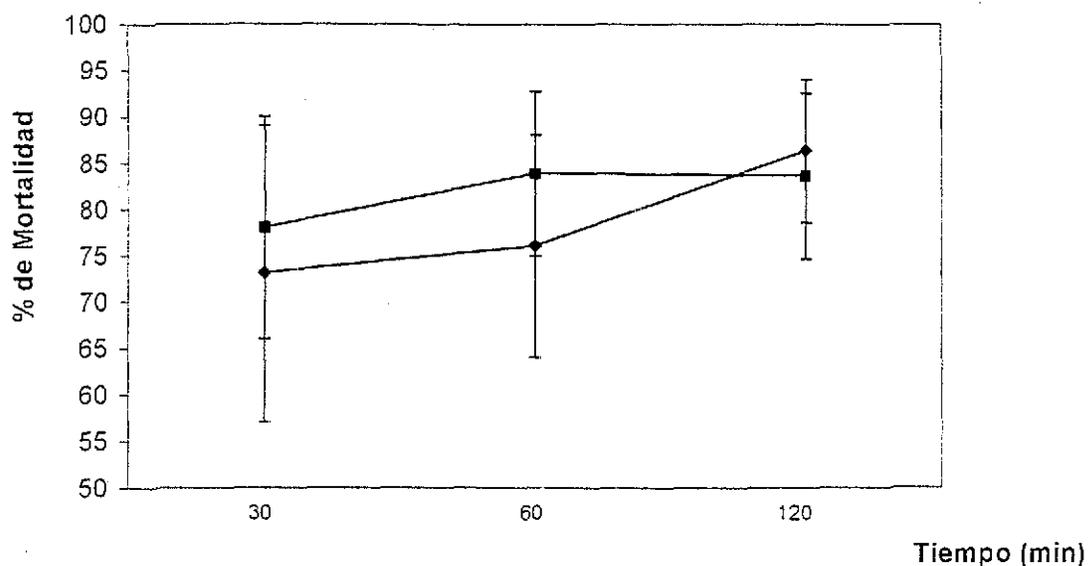


Fig. 2. Porcentaje de mortalidad de *S. aureus* por LPMN de armadillo y humano. Las barras representan la media y desviación estandar del porcentaje de mortalidad de *S. aureus* después de la incubación con LPMN de armadillo (♦) o humano (■) a los 30, 60 y 120 min.

V. CUANTIFICACION DE UN FACTOR CON ACTIVIDAD SIMILAR AL TNF

La detección de un factor con actividad similar al TNF en los sobrenadantes de cultivo de LPMN de armadillo estimulados con LPS (1 μ g/ml), PMA (25, 50, 75 y 100 ng/ml) y la mezcla LPS+PMA (1 μ g/10 ng/ml) fue evaluado mediante su efecto citotóxico sobre células L-929. La sensibilidad de las células L-929 al TNF fue determinada mediante una curva tipo de TNF recombinante de ratón, como se observa en las Figuras 3 y 4.

Los sobrenadantes de LPMN de armadillos estimulados con LPS no mostraron actividad citotóxica sobre las células L-929 (tabla 5). Sin embargo, el PMA mostró tener un efecto sobre la producción de TNF, ya que la producción de este factor fue dosis dependiente de la concentración de PMA. 25 ng/ml producen una actividad citotóxica del 22%, 50 ng/ml

producen una actividad citotóxica del 33.9%, 75 ng/ml producen una actividad citotóxica del 50.98% y 100 ng/ml producen una actividad citotóxica del 58.35%, la mezcla LPS(1 μ g/ml) y PMA(10 ng/ml) solo produce un 28.85% de citotoxicidad (tabla 5).

Otros inductores de TNF fueron analizados para demostrar su capacidad de estimular a los LPMN de armadillo y producir un factor con actividad de TNF, medida por citotoxicidad sobre células L-929 (Tabla 6)

Todas las citocinas empleadas en este estudio mostraron una activación de los LPMN para la producción de un factor similar al TNF, aunque el mayor efecto se obtuvo con el TNFrR a diferentes concentraciones (Tabla 6), el cual muestra un efecto dosis dependiente.

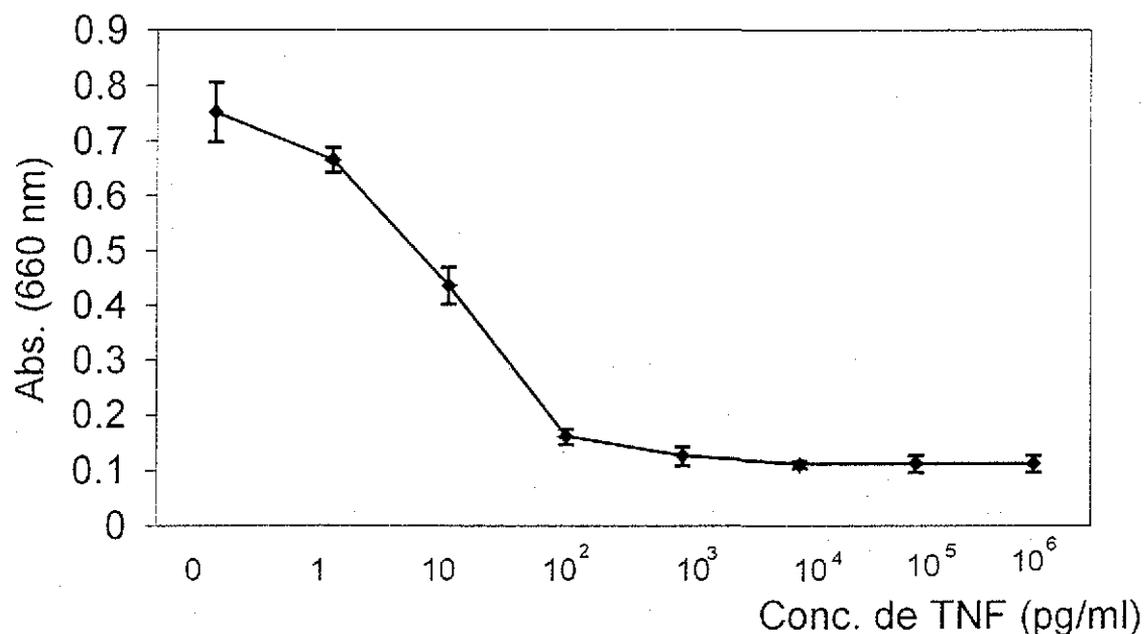


Fig. 3. Curva tipo de TNF. Las células L-929 fueron incubadas con diferentes concentraciones de TNF, después de 24 h de incubación a 37° C se determinaron los valores de absorbancia mediante la tinción con cristal violeta. Las barras representan la media y desviación estándar de cada concentración.

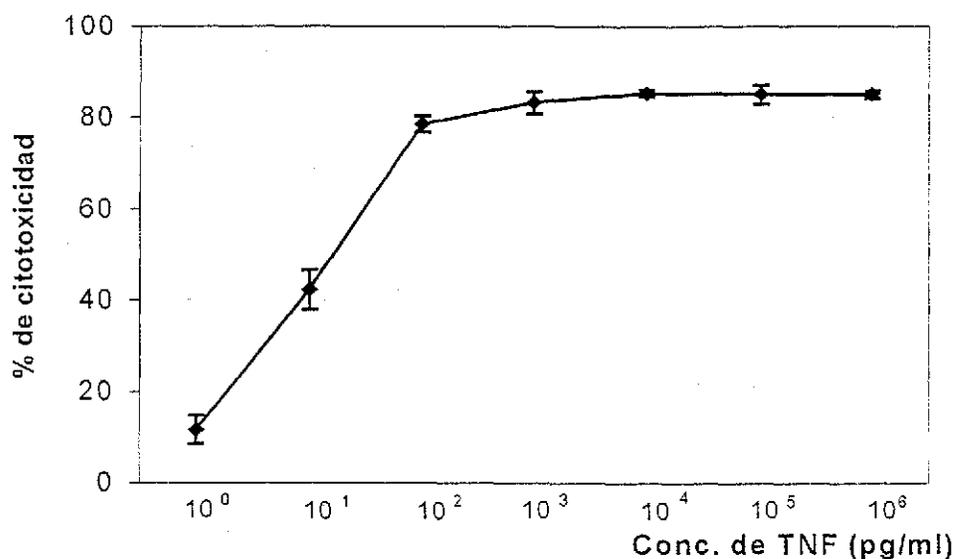


Fig. 4. Porcentaje de citotoxicidad de TNF en células L-929 Las células L-929 fueron incubadas con diferentes concentraciones de TNF, después de 24 h de incubación a 37° C se determinaron los porcentajes de citotoxicidad mediante la tinción con cristal violeta. Las barras representan la media y desviación estándar de cada concentración.

Tabla 5. Porcentaje de citotoxicidad y concentración de TNF producido por los LPMN de armadillo estimulados con diferentes inductores

Inductor	Porcentaje de citotoxicidad ^a	Concentración de TNF pg/ml ^a
Medio	5.11 ± 1.4	6.0 ± 5.25
LPS ^b 1 µg/ml	2.68 ± 0.5	5.5 ± 5.0
PMA ^c 25 ng/ml	22.0	19.5
50 ng/ml	33.9 ± 3.6	45.0 ± 11.5
75 ng/ml	50.98 ± 4.7	115.0 ± 12.0
100 ng/ml	58.35 ± 2.0	150.0 ± 11.0
LPS (1 µg/ml) + PMA (10 ng/ml)	28.85 ± 5.98	12.5 ± 6.6

^aRepresentado por la media ± la desviación estándar ^b Lipopolisacárido bacteriano (*E. coli*) ^c Acetato de forbol miristato

Tabla 6. Porcentaje de citotoxicidad y concentración de TNF de sobrenadantes de LPMN de armadillo estimulados con diferentes citocinas recombinantes de humano y/o ratón.

INDUCTOR	n	% de citotoxicidad ^a en células L-929	Concentración ^b de TNF (pg/ml)
IL-2rh 1 ng/ml	4	22.19 ± 4.14	9.75 ± 5.75
IL-3rR 2.5 ng/ml	4	21.84 ± 5.8	9.75 ± 6.5
INF-γrh 100 pg/ml	3	30.07 ± 7.72	12.5 ± 6.75
TNFrR (pg/ml) 0.005	1	29.43 ± 0.09	12.5 ± 0
0.062	2	42.30 ± 11.4	40.0 ± 7.5
0.125	2	44.77 ± 12.81	45.0 ± 7.75
0.25	2	51.48 ± 2.87	60.0 ± 5.75
0.5	4	65.55 ± 7.79	87.5 ± 6.75
62.5	2	80.32 ± 1.37	200.0 ± 5.2
125.0	2	82.9 ± 2.26	275.0 ± 5.5
250.0	2	78.89 ± 0.09	175.0 ± 0
500.0	4	75.67 ± 6.64	100.0 ± 6.5

a Porcentaje de citotoxicidad representado por la media (x) y desviación estandar (d.e)

b Concentración de TNF representada por la media (x) y desviación estandar (d.e)

c Lipopolisacárido (*E. coli*)

d Ester de forbol miristato acetato

VI. CUANTIFICACION DE UN FACTOR CON ACTIVIDAD SIMILAR A LA IL-1

Sobre la búsqueda de un factor con actividad similar a la IL-1, los sobrenadantes de LPMN de armadillo estimulados con LPS (1 µg/ml), PMA (10 ng/ml) y la combinación LPS (1 µg/ml)+ PMA (10 ng/ml) se pusieron en contacto con los timocitos de ratón, los resultados mostraron que estos sobrenadantes no indujeron la proliferación de los timocitos de ratón, a diferencia de lo observado con la IL-1rh (fig. 5 y tabla 7)

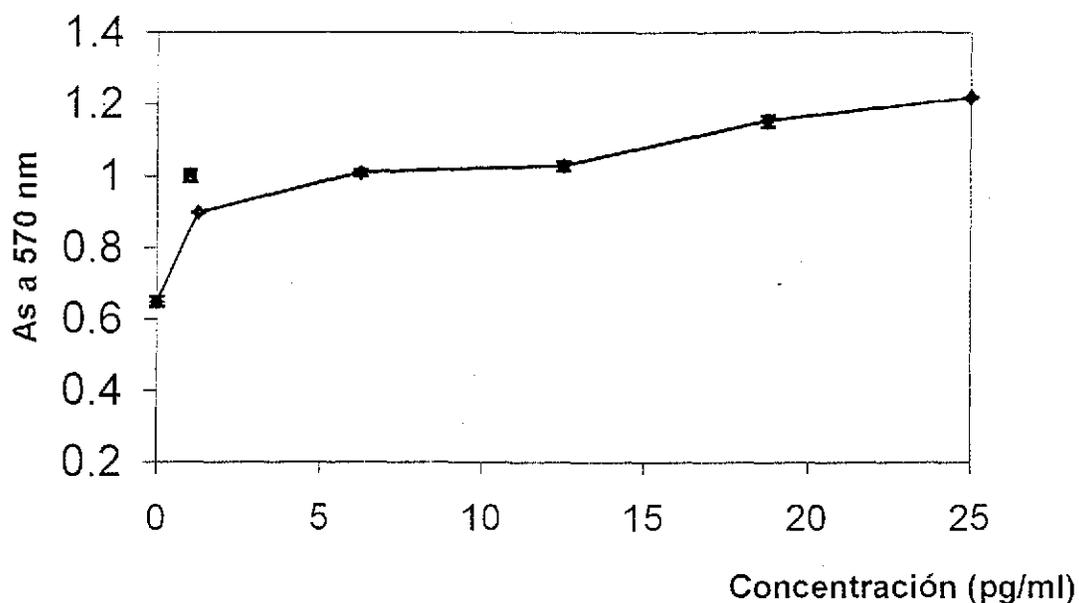


Fig. 5. Curva tipo de IL-1. Los timocitos de ratón se pusieron en contacto con la IL-1rh a diferentes concentraciones, y después de 24 h de incubación a 37° C, la absorbancia fue medida mediante la reducción del colorante MTT

Tabla 7. Índice de proliferación de timocitos de ratón con diferentes inductores de la producción de IL-1

INDUCTOR	INDICE DE PROLIFERACIÓN ^a
Células con medio	0.927 ± 0.086
Células con PHA*	0.871 ± 0.103
LPS ¹	0.186 ± 0.026
PMA ²	0.208 ± 0.028
LPS ¹ /PMA ²	0.208 ± 0.025

^a Los valores de índice de proliferación representan la media ± la desviación estandar

*Phaseolus vulgaris

¹ Lipopolisacárido bacteriano de *E. coli* (1 µg/ml)

² Ester de forbol miristato acetato (10 ng/ml)

Debido a que no se logró demostrar la presencia de un factor con actividad similar a la IL-1 mediante el bioensayo, se decidió investigar la presencia de RNAm para IL-1. Para ello, se realizó la extracción de RNA total a partir de 1×10^6 leucocitos de armadillo (Fig. 6), en la cual se observan dos bandas que corresponden al RNA total, una de 2,027 pb y otra de 1,178 pb.

El RNA total fue empleado para obtener DNA copia (cDNA) mediante transcriptasa reversa, y posteriormente este cDNA se utilizó para PCR en la búsqueda de RNAm para IL-1 empleando iniciadores específicos para IL-1 humana, los cuales amplifican para un fragmento de 491 pb. Los resultados se muestran en la fig. 7, en la cual se observa el RT-PCR del RNA de los leucocitos totales de armadillo activados con PMA (carril 1) y PHA (carril 2) los cuales presentan una banda similar al control positivo de IL-1h (carril 4).

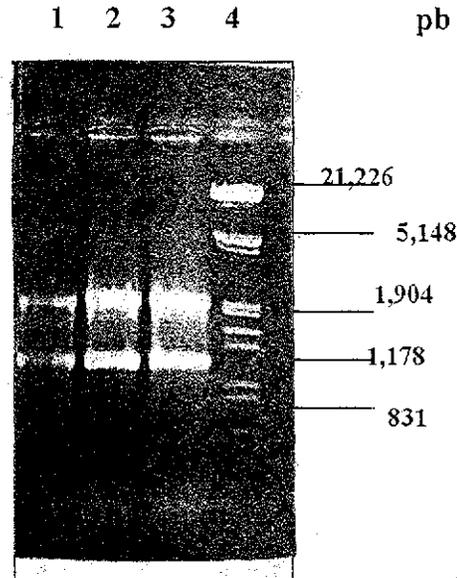


Fig. 6. Corrimiento electroforético del RNA total de 1×10^6 leucocitos de armadillo (carriles 1,2 y 3) en el cual se observan dos bandas que corresponden al RNA total, una de 2,027 pb y otra de 1,178 pb

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. DETECCIÓN MOLECULAR DE IL-6 POR RT-PCR EN LEUCOCITOS TOTALES DE ARMADILLO ESTIMULADOS CON PMA Y PHA

Un millón de leucocitos de armadillo fueron estimulados con PMA y/o PHA por 4 h a 37° C, posteriormente se recuperaron las células y se les adicionó Tripure™, a partir del RNA de los leucocitos de armadillo y mediante RT-PCR se obtuvo el cDNA, el cual se utilizó para la búsqueda de RNAm para IL-6. Para ello se emplearon iniciadores para IL-6 humana, la cual amplifica para un fragmento de 628 pb. Los resultados se muestran en la fig. 8, en la cual se observa que los leucocitos de armadillo estimulados con PHA amplificaron un fragemento de 628 pb, sin embargo otra banda menor de 500 pb fue observada en los leucocitos estimulados con PMA y con PHA también.

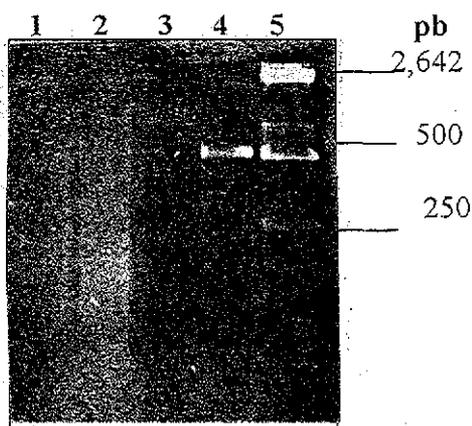


Fig. 7. RT-PCR del RNA de leucocitos de armadillo activados con PMA y/o PHA
 El RNA total de leucocitos activados con PMA (carril 1) o PHA (carril 2) se empleó para obtener cDNA mediante transcriptasa, y después mediante PCR se realizó la búsqueda de RNAm para IL-1(carril 4), mostrando que con ambos inductores se amplificó un fragmento de 491 pb

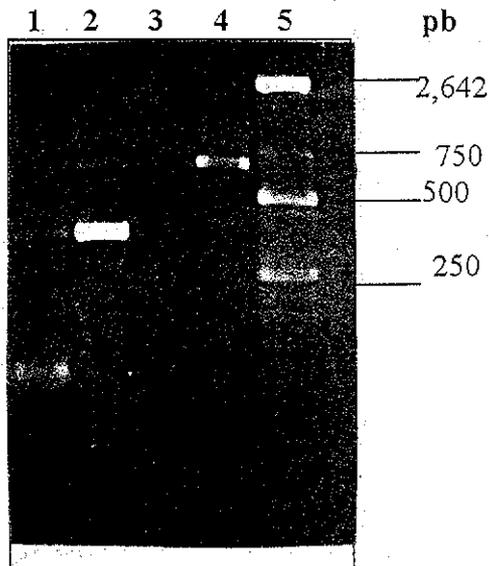


Fig. 8. RT-PCR del RNA de leucocitos de armadillo activados con PMA y/o PHA
 A partir del RNA de 1×10^6 leucocitos de armadillo estimulados con PMA (carril 1) y/o PHA (carril 2) durante 4 h a 37°C y mediante RT-PCR se obtuvo el cDNA, el cual se empleó para la búsqueda de RNAm para IL-6 (carril 4), observando que los leucocitos activados con PHA amplificaron un fragmento de 628 pb.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Como se describió en la introducción, *D. novemcinctus* es un modelo útil en el estudio de la lepra, sin embargo, sus mecanismos inmunológicos aún son poco conocidos. *M. leprae* es el agente etiológico de la lepra, es una bacteria intracelular obligada que crece dentro de los macrófagos, por lo que una deficiencia en los mecanismos bactericidas de estas células podría dar la pauta para el crecimiento y mantenimiento intracelular de esta bacteria.

Los macrófagos, los monocitos y los neutrófilos pertenecen a la estirpe mieloide y su principal función es la eliminación de bacterias patógenas que han invadido el torrente circulatorio, tejidos y órganos. Por un lado, la detección de una deficiencia en los mecanismos de fagocitosis en los LPMN de *D. novemcinctus* puede reflejar una deficiencia en la actividad de toda la estirpe mieloide y por otro lado, las células de esta estirpe son la primera línea de defensa contra diferentes patógenos, las cuales inician la producción de citocinas proinflamatorias, por lo que una deficiencia de estas llevaría a una menor respuesta contra el patógeno, sin embargo, aún se desconoce mucho acerca de los mecanismos de la actividad fagocítica de los LPMN.

Los primeros estudios realizados para demostrar la presencia de los elementos celulares de la respuesta inmunológica en sangre periférica de armadillos silvestres muestran que poseen 35% de neutrófilos, 0 7% de monocitos, 4% de eosinófilos, 0 7% de basófilos y 52% de linfocitos⁴⁷.

En un reporte posterior, Guerra-Infante²¹ analizó el porcentaje de leucocitos en armadillos en cautiverio mediante citometría de flujo, encontrando que la distribución celular de los leucocitos de sangre periférica de *D. novemcinctus* de acuerdo a los datos de tamaño y granularidad es en promedio del 28.04% de linfocitos, 54.6% de leucocitos polimorfonucleares y 5.8% de monocitos. Esto muestra que los LPMN en los animales en cautiverio se encuentran en mayor número que el resto de los leucocitos.

Los LPMN son la primera línea de defensa que participa en la eliminación de bacterias mediante sus principales funciones fagocitar, destruir y liberar factores quimiotácticos y citocinas durante un proceso infeccioso

El movimiento o sentido direccional de las células es necesario para detectar morfógenos que controlan la diferenciación y sustancias atrayentes que dirigen la migración celular, como en el proceso de quimiotaxis⁴⁸. El complejo proceso de migración direccional involucra no solo la recolocación sino también la orientación de las células a lo largo del gradiente del quimioatrayente, esto requiere que la célula detecte exactamente la dirección del agente quimiotáctico y discrimine entre pequeñas diferencias en la concentración del mismo^{49,50}. El péptido quimiotáctico sintético

formil metionil leucil fenil alanina (fMLP) y otros ligandos de neutrófilos, tales como la IL-8, el fragmento C5a del complemento, CGM-SF, PAF, PMA, zimosan opsonizado y el LB₄⁵¹ son ampliamente usados como modelos de quimioatrayentes para neutrófilos de mamíferos⁵².

Se ha reportado que la respuesta de los LPMN hacia estos agentes quimioatrayentes varía de acuerdo a los diferentes grupos zoológicos.

En la tabla 8 se describe el efecto de diferentes quimioatrayentes sobre los leucocitos de varios grupos zoológicos descritos en la literatura y los resultados obtenidos en este trabajo, observando que el péptido bacteriano fMLP tiene mayor efecto sobre los LPMN de ratón^{50,53} y humano, pero no sobre los leucocitos de perro⁵⁰. En los leucocitos de armadillo la respuesta quimiotáctica hacia el fMLP es muy tenue, además de ser dosis dependiente, lo cual sugiere que los receptores son de baja afinidad para el fMLP, comparado con la de ratón o humano, pero con mayor respuesta en comparación con los LPMN de perro

Tabla 8. Índices de migración (I.M) de leucocitos polimorfonucleares de diferentes grupos zoológicos hacia diferentes factores quimiotácticos.

Grupo zoológico	Factor quimiotáctico	I.M ¹	Técnica empleada	Referencia
Ratón	fMLP ² (1x10 ⁻⁷ M)	3.5	Placa Transwell (poro de 8.0 µm)	53
Conejo	hC5a ³ (1x10 ⁻⁷ M)	2.9	Agarosa	54
Cerdo	hC5a (1x10 ⁻⁷ M)	2.3	"	"
Cobayo	hC5a (1x10 ⁻⁷ M)	2.1	"	"
Humano	hC5a (1x10 ⁻⁸ M)	2.7	"	"
Ratón	fMLP (1x10 ⁻⁸ M)	3.14	Boyden	50
Perro	fMLP (1x10 ⁻⁷ M)	0	"	"
Humano	*SHA ⁴	22.19 ± 1.74	Placas Transwell	
	*SAA ⁵	34.39 ± 6.46	(poro de 5.0 µm)	
	*fMLP (8x10 ⁻⁴ M)	3.51 ± 0.66	"	
	*fMLP (8x10 ⁻⁶ M)	2.98 ± 0.68	"	
	*fMLP (8x10 ⁻⁸ M)	0.88 ± 0.19	"	
Armadillo (<i>D. novemcinctus</i>)	*SHA ⁴	0.56 ± 0.18	"	
	*SAA ⁵	5.16 ± 1.35	"	
	*fMLP (8x10 ⁻⁴ M)	1.43 ± 0.18	"	
	*fMLP (8x10 ⁻⁶ M)	1.33 ± 0.12	"	
	*fMLP (8x10 ⁻⁸ M)	1.01 ± 0.17	"	

1 I.M Denota el no. de células que migraron hacia el factor quimiotáctico entre el no. de células que migraron al azar

2 fMLP Formil metionil leucil fenil alanina

4 Suero humano activado con *E. coli*

* Resultados obtenidos en esta investigación

3 Fracción C5a del complemento humano

5 Suero de armadillo activado con *E. coli*

El factor C5a del complemento ha sido descrito como una potente quimiotaxina para neutrófilos⁵⁵. Los estudios sobre la quimiotaxis de diferentes grupos zoológicos empleando C5a humano, no han mostrado buena actividad quimiotáctica sobre LPMN de conejo, cerdo y cobayo, en comparación con LPMN de humanos, demostrando que estos animales requieren 10 veces más concentración de C5a para mostrar una actividad quimiotáctica similar a la que muestran los LPMN de humanos. En el caso de los LPMN de armadillo, aunque no se utilizó C5a humano puro, se empleó suero homólogo y heterólogo (humano) activado con *E. coli*, los resultados muestran que los LPMN de armadillo migran de manera adecuada hacia el suero homólogo, a diferencia de lo que sucede con el suero heterólogo, donde no se observa migración estadísticamente significativa (Tabla 1).

Una observación interesante es que los LPMN de humano (grupo testigo) migraron tanto hacia el suero homólogo como heterólogo (de armadillo), siendo este último mejor quimioatrayente que el mismo suero humano (Tabla 1), lo que sugiere que los LPMN de humano muestran receptores de mayor afinidad para el fragmento C5a de armadillo u otros fragmentos producidos por la cascada del complemento del suero de armadillo. Lo que sugiere que la respuesta quimiotáctica tanto de los leucocitos de armadillo como de humano no depende del origen del suero^{50,56}.

De los resultados mostrados en la tabla 8, se puede decir que los LPMN de armadillo responden más o menos hacia diversos agentes quimiotácticos, al igual que lo hacen los LPMN de otros animales.

De todo lo anteriormente expuesto, se puede inferir que la respuesta quimiotáctica de los leucocitos de armadillo se debe principalmente a la interacción ligando-receptor y a la posible variedad de los receptores quimiotácticos presentes en cada grupo zoológico en cuanto a cantidad y/o calidad⁵⁰.

La fagocitosis por LPMN es un mecanismo inespecífico de defensa de la respuesta inmune, la cual se lleva a cabo con la participación de opsoninas presentes en el suero (inmunoglobulinas y complemento) o en ausencia de las mismas (fagocitosis no opsonizante)^{57,58}.

Los porcentajes de fagocitosis de los LPMN de diferentes especies de mamíferos han sido estudiados. En la tabla 9 se muestra el porcentaje de fagocitosis de LPMN de diversos mamíferos reportados en la literatura y de armadillo obtenidos en este trabajo. Por ejemplo, en el caso de los LPMN de bovino⁵⁹, los porcentajes de fagocitosis observados hacia *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. agalactiae* y *S. aureus* varían entre 63 y 81%, mientras que para *B. abortus* y *M. bovis* son del 40 y 23% respectivamente, esto sugiere que la capacidad fagocítica de los LPMN de los bovinos depende del microorganismo empleado. Otra especie como el perro⁶⁰, presenta un porcentaje alto de fagocitosis (97.01%) contra *S. intermedius*. En el caso de humanos^{58,61} el porcentaje de fagocitosis va del 48 al 77% cuando se utiliza *S. aureus*, mientras que cuando se emplea *S. cerevisiae* es del 70 al 80%.

Tabla 9. Porcentajes de fagocitosis de LPMN de diversos grupos zoológicos contra diferentes microorganismos

Especie	Microorganismo	Porcentaje de fagocitosis	Técnica	Referencia
Bovino	<i>E. coli</i>	81.27 ± 11.4	ADHERENCIA EN VIDRIO	59
	<i>Salmonella sp.</i>	80.61 ± 11.2	"	"
	<i>S. agalactiae</i>	76.96 ± 21.4	"	"
	<i>S. aureus</i>	63.62 ± 18.0	"	"
	<i>B. abortus</i>	40.44 ± 10.7	"	"
	<i>M. bovis</i>	23.63 ± 12.7	"	"
Perro	<i>S. intermedius</i>	97.01 ± 3.22	Naranja de acridina	60
Humano	a) <i>S. aureus</i>	56.7 ± 2.0	ADHERENCIA EN VIDRIO	58
	b) <i>S. aureus</i>	48.5 ± 2.0	"	"
Humano	c) <i>S. aureus</i>	77.2	Citometría de flujo	61
	d) <i>S. cerevisiae</i>	70.9 ± 3.0 ¹	Adherencia en Vidrio	**
Armadillo ²	e) <i>S. cerevisiae</i>	100	Adherencia en vidrio*	33
	f) <i>S. cerevisiae</i>	57.0 ± 6.64 ¹	Adherencia en vidrio	**

a) Porcentaje de fagocitosis en mujeres aparentemente sanas

b) Porcentaje de fagocitosis en mujeres embarazadas

c) y d) Porcentaje de fagocitosis en humanos aparentemente sanos

e) y f) Porcentaje de fagocitosis en armadillos aparentemente sanos

* Previa desfibrinización de la sangre

** Resultados obtenidos en esta investigación

1 Representado por la media y el error estándar 2 *Dasypus novemcinctus*

En cuanto a la fagocitosis de los LPMN de armadillo de nueve bandas, un reporte previo³³ menciona que estas células muestran una actividad del 100%, mientras que en este trabajo se reporta un porcentaje del 57% (Tabla 9). Esta diferencia probablemente se debe a 1) el número de animales empleados por Rojas y cols.³³ fue de dos animales, y en este trabajo se emplearon diez. Considerando esta la razón principal de la diferencia entre ambos porcentajes. Esto se corrobora con el hecho de que si hubieran sido evaluados solamente dos animales en este estudio (tabla 2, animales 9 y 10) apenas se hubiera obtenido un porcentaje de capacidad fagocítica del 81.75%, 2) aunque se empleó la misma técnica (adherencia en vidrio), Rojas y cols.³³ desfibrinizaron primero la sangre y posteriormente llevaron a cabo la adherencia; y en este estudio, la adherencia se realizó antes de que se coagulara la

sangre, por lo que se podría pensar que al eliminar el coágulo se dañaron los leucocitos y por lo tanto el porcentaje obtenido se debe a que estos no pudieron fagocitar. Aunque esta hipótesis se invalida con la razón expuesta anteriormente (si hubieran sido evaluados solamente dos animales en este estudio [tabla 2, animales 9 y 10] se hubiera obtenido un porcentaje de capacidad fagocítica del 81.75%) y 3) otra razón que puede explicar la diferencia entre ambos resultados es que los animales incluidos en este trabajo se consideraron aparentemente sanos, sin embargo, durante la purificación de los LPMN, en dos animales (no incluidos en el estudio) se encontraron filarias, lo cual indica que posiblemente otros armadillos podrían haber estado parasitados (animales que presentaron los porcentajes más bajos de fagocitosis), mostrando una deficiencia en su capacidad fagocítica.

De esta manera, se puede decir que los diferentes porcentajes de fagocitosis mostrados en la tabla 10, sugieren las diferencias que existen entre esos grupos de mamíferos para fagocitar diferentes microorganismos por técnicas similares o diferentes a la adherencia.

Otro aspecto que se evaluó en los LPMN de armadillo, fue su capacidad para destruir a los diferentes microorganismos. La técnica de reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (rNBT) es una prueba ampliamente usada para investigar la producción de superóxido por parte de los leucocitos, ya que este es un potente agente bactericida involucrado en los mecanismos de defensa⁶², por lo que es necesario conocer cómo funciona esta actividad en LPMN de armadillo.

De los reportes de rNBT en diferentes especies de mamíferos, se ha descrito para el caso de bovinos⁵⁹ (tabla 10), que estos animales tienen una baja actividad de rNBT, la cual va del 11 al 40% hacia los diferentes microorganismos que se emplearon, en comparación con los LPMN de humanos, en donde los porcentajes de rNBT estuvieron entre el 85 y el 95% cuando se emplearon *S. cerevisiae* y *S. aureus* respectivamente (Tablas 3 y 10).

En cuanto a los valores del estallido respiratorio en LPMN de armadillos reportado por Rojas y cols.³³, describen que este es del 100% (Tabla 10), mientras que en este estudio el porcentaje obtenido fue de 70.5% (± 5.9) de rNBT (Tablas 3 y 10). Con los resultados anteriores es evidente que los LPMN de bovino y de armadillo producen bajas cantidades de radicales libres de oxígeno, en comparación con los LPMN de humano, lo cual sugiere que los mecanismos independientes de oxígeno en los LPMN de armadillo que son primordiales para la destrucción de patógenos, se encuentran disminuidos ($p < 0.025$) en comparación con el grupo control.

Tabla 10. Porcentajes de rNBT de leucocitos de diferentes grupos zoológicos en contra de diversos patógenos.

Especie	Microorganismo	Porcentaje de rNBT	Técnica	Referencia
Bovino	<i>E. coli</i>	39.90 ± 21.1	Adherencia en	59
	Salmonella sp.	27.86 ± 13.6	vidrio ¹	"
	<i>S. agalactiae</i>	31.70 ± 10.7	"	"
	<i>S. aureus</i>	33.85 ± 19.5	"	"
	<i>B. abortus</i>	11.36 ± 7.61	"	"
	<i>M. bovis</i>	40.99 ± 21.89	"	"
Humano	a) <i>S. aureus</i>	95.4	Adherencia en	58
	b) <i>S. aureus</i>	92.0	vidrio	"
	c) <i>S. cerevisiae</i>	85.5 ± 2.3	"	*
Armadillo (<i>D. novemcinctus</i>)	d) <i>S. cerevisiae</i>	100.0	Adherencia ²	33
	e) <i>S. cerevisiae</i>	70.5 ± 5.9	Adherencia	*

1 Primero se realizó la purificación de neutrófilos

a) y c) Porcentaje de rNBT de leucocitos de individuos aparentemente sanos

b) Porcentaje de rNBT de leucocitos de mujeres embarazadas

d) y e) Porcentaje de rNBT de leucocitos de armadillos aparentemente sanos

2 Previa desfibrinización de la sangre

* Resultados obtenidos en este trabajo

Al analizar de manera individual los resultados de rNBT y fagocitosis de los LPMN de armadillo obtenidos en este estudio (tabla 4), se observa que tres animales mostraron porcentajes de rNBT por debajo del 50%, y dos de ellos presentaron valores de fagocitosis por debajo del 30% (tabla 4), lo cual sugiere que los LPMN de estos animales tienen una deficiencia en la actividad fagocítica, esto podría sugerir la razón por la que algunos animales son susceptibles a la infección experimental con *M. leprae*. Los porcentajes altos en la rNBT, sugieren que las células fagocíticas circulantes de estos animales poseen el sistema NADPH oxidasa generador de radicales libres, a través del cual el NBT es también reducido, tal sistema capacita a las células fagocíticas de la mayoría de las especies para enfrentarse eficientemente contra microorganismos invasores³³

Como se mencionó anteriormente, durante la purificación de los LPMN de dos armadillos se encontraron filarias, lo cual hace pensar en la posibilidad de que los animales con bajos porcentajes en la rNBT hubieran estado parasitados o infectados por diferentes microorganismos.

Al comparar los datos de fagocitosis y de rNBT obtenidos en este trabajo (Tablas 2, 3 y 4), con los descritos en los trabajos citados en las tablas 9 y 10, se muestra que las actividades fagocíticas y microbicidas de los neutrófilos pueden diferir para varios microorganismos. Se conoce que los eventos fagocíticos estimulan los procesos metabólicos en los neutrófilos llevando a la activación de mecanismos microbicidas independientes y/o dependientes de oxígeno. La resistencia de los microorganismos a la fagocitosis y muerte intracelular por los neutrófilos depende de una variedad de propiedades de los microorganismos tales como: presencia de cápsula, composición de la pared celular, toxinas e inhibidores metabólicos. Así pues, el grado de rNBT depende primero de la generación de donadores de electrones tales como los aniones superóxido en el fagolisosoma. La falla para reducir el NBT indica un bloqueo en los procesos metabólicos oxidativos e incapacidad del fagocito para infligir daño oxidativo a los microorganismos ingeridos. Además, la rNBT puede ser considerada una medida indirecta de las actividades microbicidas dependientes de oxígeno de los neutrófilos⁵⁹

La función bactericida en neutrófilos, es un proceso complejo que involucra no solamente la ingestión y actividad del estallido respiratorio, también requiere movimiento intracelular y fusión de fagosomas con lisosomas, lo cual lleva a la liberación por parte de los lisosomas de al menos 60 compuestos potencialmente bactericidas⁶³.

Los ensayos tradicionales que miden la actividad bactericida de neutrófilos, determinan el número de bacterias muertas mediante conteo de colonias. La evaluación de la actividad bactericida de los neutrófilos ha sido una herramienta importante para determinar el estado inmune en animales tales como perros⁶⁰, humanos⁶¹, bovinos⁶³, etc.

Como se muestra en la tabla 11, se ha reportado que los LPMN de bovinos^{63,64} presentan un porcentaje de muerte intracelular contra *S. aureus* del 70 al 78% y los LPMN de humano^{61,65} del 72 al 84%. En los LPMN de armadillos, el porcentaje de muerte intracelular es del 73 al 86% (Fig. 2, tabla 11), observando que no hay diferencia con los leucocitos de otros animales para dar muerte a *S. aureus* y que su capacidad bactericida es igualmente eficiente a partir de los 30 min de incubación, y aumenta de manera proporcional al tiempo de incubación, aunque estadísticamente no hay diferencia significativa. La comparación en el porcentaje de muerte intracelular de *S. aureus* que presentan los leucocitos de armadillo (del 73 al 86%) contra los leucocitos de perro⁶⁰ (del 45 al 49%) muestra que existe cierta diferencia entre los diferentes grupos de animales en cuanto a su capacidad para dar muerte a un microorganismo, mostrando incluso una mayor eficiencia los leucocitos de armadillo que los del humano.

Tabla 11. Porcentaje de muerte intracelular (% M.I) de diferentes microorganismos por LPMN de diversos grupos animales

Especie	Microorganismo	Tiempo de incubación (min)	% MI	Técnica	Referencia
Bovino	<i>S. aureus</i>	60	70-78	Reducción de MTT	63
	<i>S. aureus</i>	10	72.3	Cuenta de UFC	64
Perro	<i>S. intermedius</i>	30	45.3±9.18	Naranja de acridina	60
		45	47.72±10.0	“	“
Humano	<i>S. aureus</i>	60	66.0±12.5	Citometría de flujo	61
		120	79.0±7.5	“	“
	<i>S. aureus</i>	30	72.22	Cuenta de UFC	65
	<i>S. aureus</i>	30	78.0±12.0	“	*
		60	83.81±8.90	“	*
		120	83.61±8.89	“	*
Armadillo (<i>D. novemcinctus</i>)	<i>S. aureus</i>	30	73.06±16.0	Cuenta de UFC	*
		60	75.99±12.0	“	*
		120	86.31±7.7	“	*

* Resultados obtenidos en este trabajo

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los LPMN de armadillo (tabla 11) presentan varios aspectos, tales como: a) los leucocitos pueden tener una ingestión normal y al mismo tiempo ser eficientes en su actividad bactericida, o por el contrario, poseer una ingestión normal y tener severas deficiencias en su actividad bactericida⁶³, b) el tiempo de incubación para dar muerte a un microorganismo no varía de manera significativa entre los armadillos y otras especies (a excepción del perro) y c) la comparación de los resultados obtenidos en armadillos con respecto a las otras especies indica que el tiempo óptimo de muerte intracelular es más lenta que la de humano, lo cual se debe a la baja actividad en la producción de ROS, como lo sugiere el porcentaje de rNBT

Los LPMN son frecuentemente referidos como células diferenciadas terminales, las cuales carecen de actividad transcripcional y capaces de llevar a cabo una escasa o nula síntesis de proteínas. Sin embargo, la validez de este concepto ha ido cambiando principalmente a través del uso de técnicas de

biología molecular y técnicas de sensibilidad como la inmunohistoquímica. Estudios *in vitro* han mostrado que los LPMN purificados tienen la capacidad para expresar de manera constitutiva o bajo un estímulo RNAm para una variedad de proteínas, las cuales están involucradas en las funciones efectoras de los LPMN. Algunas de estas proteínas son las citocinas⁶⁶, un grupo heterogéneo de mediadores polipeptídicos que han sido asociados con la activación del sistema inmune y la respuesta inflamatoria⁶⁷.

Por ejemplo, diversos grupos de trabajo han generado evidencia convincente de que los LPMN de humano pueden liberar TNF- α , IL-1 α ⁶⁸, IL-1 β , IL-1ra, IL-8, TGF- β 1, IL-6, INF- α , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3 e IL-12⁶⁶. En armadillos no se han llevado a cabo estudios sobre la producción de citocinas por parte de los LPMN de estos animales debido a que el conocimiento del sistema inmune y la comprensión de la patofisiología de las enfermedades infecciosas e inflamatorias de muchas especies animales han sido limitadas por la carencia de reactivos disponibles para medir citocinas, aunque se han hecho algunos progresos adaptando bioensayos para algunas citocinas como IL-1, IL-6 y TNF- α , los cuales funcionan de una manera no especie-específica^{69,70}.

Existen reportes sobre la producción y liberación de un factor soluble con actividad similar a la IL-1 por los LPMN de ratas⁷¹ y conejos⁷². Se ha descrito que los LPMN de humano^{66,73} producen IL-1 cuando son estimulados con LPS y fMLP, encontrando que la concentración de esta citocina es dependiente del número de células. En este trabajo, empleando los sobrenadantes del cultivo de 4×10^6 LPMN de armadillo estimulados con LPS y/o PMA (por separado) y la combinación LPS+PMA no se detectó un factor soluble con actividad similar a la IL-1, medido por la proliferación de los timocitos de ratón al ser incubados con estos sobrenadantes. Estos resultados se pueden explicar de varias formas: a) la concentración de los estímulos no fue suficiente, b) el número de células no fue el adecuado para detectar de manera fehaciente la presencia de IL-1, c) los timocitos de ratón no son sensibles a la IL-1 de armadillo y d) las sustancias estimuladoras (LPS, PMA y la combinación LPS+PMA) no inducen la producción de un factor con actividad similar a la IL-1 en los LPMN de armadillo.

Tratando de responder estos cuestionamientos se decidió investigar la presencia de RNAm para IL-1, para esto, después de 4 h de estímulo de los leucocitos de armadillo con PMA y PHA (por separado), se obtuvo el RNAm y por RT-PCR se obtuvo el DNA copia empleando iniciadores específicos para la detección de IL-1h, encontrando dos bandas (tanto en los leucocitos activados con PMA como con PHA, Fig. 7) que tienen aproximadamente el mismo número de pares de bases que la IL-1h (491 pb). Este resultado es importante porque describe la posible producción de un factor soluble con actividad

de IL-1 en los leucocitos de armadillo. De acuerdo a esto podemos concluir que los timocitos de ratón no son sensibles a este factor posiblemente porque tienen receptores de baja afinidad para esta sustancia, aunque son necesarios más estudios para determinar si efectivamente se trata de una molécula con características similares a la IL-1h, así como el porcentaje de homología que pudiera tener con otras especies. Con respecto a este último aspecto, las publicaciones existentes en cuanto al porcentaje de homología que hay entre el RNAm de la IL-1 de humano y el de otras especies de mamíferos⁷⁴ es mayor del 80%. Por ejemplo, con el RNAm de células de porcinos y caballos la homología es del 82%, con bovinos es del 86% y con una especie diferente a los mamíferos (*Caenorhabditis elegans*) es del 100%, lo que hace posible suponer que sustancias como PMA y PHA inducen la producción de IL-1, y que posiblemente los timocitos de ratón no son susceptibles a la proliferación si esta citocina está presente en los sobrenadantes de cultivo de los leucocitos de armadillo.

En cuanto al TNF- α , es uno de los principales mediadores de la respuesta inmune contra bacterias Gram-negativas y juega también un papel importante en la defensa contra otros microorganismos infecciosos⁷⁵. Esta citocina es producida por los macrófagos, y es poco lo que se conoce acerca de la contribución de los LPMN para producir esta y otras citocinas⁷⁶.

Existen reportes que mencionan que la incubación de sangre total de gatos⁷⁷ con LPS, produce un factor con actividad de citotoxicidad sobre células WEHI-164, obteniendo la mayor concentración de esta sustancia cuando se emplean 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS después de 2 h de incubación. También en el plasma de gatos inoculados *in vivo* con LPS (750 $\mu\text{g/kg}$) se produce este factor, obteniéndose una concentración mayor (2750 pg/ml) a los 60 min post inoculación.

Se ha descrito que la estimulación de la línea celular monocito-macrófago U-937⁷⁵ con PMA (10 ng/ml), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) y la combinación LPS+PMA produce TNF en respuesta a estos estímulos, obteniendo 57.8, 0 y 104.1 pg/ml de TNF respectivamente, y porcentajes de citotoxicidad de 26.0, 0 y 52.8% respectivamente, esto sugiere que esas sustancias son buenos inductores para la producción de TNF. En este trabajo, los LPMN de armadillo estimulados con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), PMA (25, 50, 75 y 100 ng/ml) y la combinación LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) +PMA (10 ng/ml) liberaron un factor soluble con actividad similar al TNF, mostrando porcentajes de citotoxicidad sobre células L-929 de 2.68, 22.0, 33.9, 50.98, 58.35 y 28.85 % respectivamente, con concentraciones de TNF de 5.5, 19.5, 45.0, 115.0, 150.0 y 12.5 pg/ml respectivamente. Estos resultados señalan que el TNF producido por los LPMN de armadillo tiene efecto sobre las células L-929.

Es importante mencionar que los LPMN de armadillo incubados con TNFrR (62.5 y 125 pg/ml) también muestran la producción de un factor con actividad similar al TNF, mostrando las mayores concentraciones (200.0 ± 5.2 y 275.0 ± 5.5 pg/ml respectivamente) y porcentajes de citotoxicidad ($80.32 \pm 1.37\%$ y $82.9 \pm 2.26\%$ respectivamente) del factor con actividad similar al TNF, lo que sugiere un mayor reconocimiento o sitios de unión (receptores) para el TNFrR y menor para los otros inductores empleados.

A partir de los resultados anteriores se infiere que los LPMN pueden ser una fuente importante en la producción de TNF en reacciones inmunes e inflamatorias, y sugieren la posibilidad de emplear estas células para examinar la respuesta celular del armadillo de nueve bandas y de otras especies animales.

Otra citocina importante es la IL-6, conocida también como un factor estimulador de células B y/o INF- β_2 , la cual tiene una amplia variedad de efectos sobre las células involucradas en la respuesta inmune o inflamatoria. Los estudios *in vitro* han revelado que la IL-6 es producida por una variedad de tipos celulares como: fibroblastos, monocitos, células endoteliales, células epiteliales y células T^{78,79}. Usualmente la producción de IL-6 por esas células es aumentada en respuesta a endotoxinas (LPS), activadores de la ruta protein cinasa C (PMA) y a otras citocinas tales como: IL-1 y TNF⁸⁰.

Existen diversas técnicas para medir los cambios en la expresión de los genes a nivel de RNAm, estas incluyen northern blot, ensayo de protección de RNAsa, hibridación *in situ* y RT-PCR. Por ser este último rápido y considerablemente más sensible que las técnicas tradicionales de RNA blot, es el más empleado para detectar pequeños cambios en la expresión de genes que de otra manera no podrían ser detectados⁶⁹.

Por ejemplo, se ha demostrado la producción de IL-6 en monocitos de gato⁸¹ no estimulados, y en células mononucleares de sangre periférica de equinos⁶⁹ (estimulados y no estimulados) y de humanos³⁸, pero existe gran controversia en cuanto a la producción de RNAm para IL-6 en neutrófilos de diferentes especies de mamíferos activados o no. Se ha reportado que en neutrófilos de humanos⁸² y conejos⁸³ no se lleva a cabo la transcripción de RNAm para IL-6, pero sí se lleva a cabo para IL-8⁸³, sin embargo otros trabajos mencionan que los LPMN de humano⁶⁶ estimulados con LPS muestran la expresión de RNAm para IL-6. En estudios realizados con LPMN de cerdo⁸⁴ no estimulados y estimulados con LPS y/o PHA-P se detectó la expresión de RNAm para IL-6, el cual fue detectado de las 0-24 y de las 48-72 h después de la incubación con LPS. En este trabajo, empleando LPMN de armadillo estimulados (4 h) con PHA se detectó la producción de RNAm para IL-6 con iniciadores no especie-específicos (IL-6h), lo que denota que en el cDNA de los LPMN de armadillo existe una secuencia o fragmento que es reconocido por los iniciadores de la IL-6h, aunque cabe señalar que

probablemente también contribuyó a este resultado la presencia de monócitos y linfocitos, los cuales también tienen la capacidad de producir IL-6, sin embargo, el trabajo realizado con LPMN de cerdo apoya la hipótesis planteada en este trabajo en cuanto a que los LPMN de armadillo expresan RNAm para IL-6, ya que las células predominantes en ambos trabajos fueron los PMN. Además, la detección de RNAm para IL-6 a partir de las 4 h de estimulación de los LPMN de armadillo es otro apoyo a la hipótesis mencionada, debido a que los reportes en la literatura describen que la detección de IL-6 en células mononucleares ocurre después de las 4 h de estimulación. La expresión de RNAm para IL-6 solamente en leucocitos estimulados, indica que la producción de esta citocina no ocurre de manera constitutiva, mientras que en células mononucleares se presenta tanto de manera constitutiva como bajo la inducción de un estímulo. Con lo anteriormente expuesto se puede decir que la producción de citocinas es controlada a nivel transcripcional y postranscripcional, y que la expresión del RNAm de una citocina no garantiza la producción de una proteína funcional. Aunque por un lado, diversos estudios han mostrado una buena correlación entre la expresión de RNAm de citocinas y la producción de proteínas o la actividad biológica de las mismas⁶⁹, y por otro, el reconocimiento de un fragmento de la IL-6h por el cDNA de los LPMN de armadillo indica que existe un porcentaje de homología entre ambas especies (humanos y armadillos). Esta última aseveración queda apoyada porque se ha demostrado que solamente el gen del G-CSF es similar al gen de la IL-6, y siendo el G-CSF el que estimula la producción de las células de la estirpe mieloide, es lógico suponer que los LPMN de armadillo liberen un factor similar a la IL-6, y que por lo tanto esta citocina se encuentre evolutivamente conservada⁷⁹.

CONCLUSIONES

1. Los LPMN de armadillo responden o presentan un mayor índice de migración hacia el suero homólogo que hacia el suero heterólogo o al fMLP.
2. El porcentaje de fagocitosis y rNBT en LPMN de armadillos fue de 57% (± 6.64) y 70.5% (± 5.9) respectivamente.
3. Los porcentajes de muerte intracelular de los LPMN de *D. novemcinctus* a los 30, 60 y 120 min de incubación fueron de 73.06% (± 16.0), 75.99% (± 12.0) y 86.31% (± 7.7) respectivamente.
4. Se detectó la liberación de un factor soluble con actividad citotóxica sobre células L-929 en los sobrenadantes de los LPMN de armadillos estimulados con inductores como: PMA y TNFrR, el cual podría ser TNF.
5. No se detectó la producción de un factor soluble con actividad de inducir la proliferación sobre timocitos de ratón.
6. Mediante RT-PCR se evidenció la presencia de RNAm para IL-6 en leucocitos estimulados con PHA, pero no con PMA, aunque esta producción podría deberse a contaminación por linfocitos y monocitos.

CONCLUSION FINAL

De todo lo anterior se puede concluir que los LPMN del armadillo de nueve bandas *D. novemcinctus* aparentemente sanos cuentan con los elementos para montar una actividad fagocítica similar a los LPMN de humano. Así como muestran la capacidad de liberar un factor soluble que presenta actividad citotóxica hacia la línea de células L-929. Por lo que este trabajo sugiere el comportamiento de los LPMN del armadillo en condiciones aparentemente sanas, lo cual servirá para evaluar los efectos que tiene la infección experimental con *M. leprae* sobre la actividad fagocítica de los LPMN de *D. novemcinctus*.

APENDICE I

I.1 Solución de Alsever

Dextrosa	20.5 g
Citrato de sodio	8.0 g
NaCl	4.2 g
Acido cítrico	0.55 g

Llevar a 1000 ml con agua bidestilada. Ajustar el pH a 6.1 y esterilizar a 10 lb/pulg²/10 min

I.2 Dextran (6%)

Dextran 400	6 g
Solución salina al 0.85%	100 ml

Disolver perfectamente y esterilizar con filtro. Guardar en refrigeración

I.3 Solución Salina de Fosfatos (PBS) 1X

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.5 g
KCl	0.2 g

Llevar a 1000 ml con agua bidestilada y ajustar el pH entre 7.2 y 7.4

I.4 Ficoll-hypaque

Hypaque al 34%	10 partes
Ficoll al 9%	24 partes

La densidad se ajusta con picnómetro a 1.077 ± 0.001 g/ml. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 min

I.5 Técnica de exclusión con azul tripano

Diez microlitros de la suspensión celular se mezclan con 90 μ l de la solución de trabajo del azul tripano (dil 1 10). Posteriormente se realiza el conteo del número de células/ml en cámara de Neubauer y se calcula el porcentaje de células teñidas (muertas) y no teñidas del número total de células

I.6 Solución Salina Balanceada de Hanks 1X (SSBH)

Glucosa	1 g
NaCl	8 g
CaCl ₂	0.14 g
MgSO ₄	0.10 g
MgCl ₂	0.10 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
NaH ₂ PO ₄	0.55 g
KCl	0.04 g
Rojo fenol	0.02 g

Llevar a 1000 ml con agua bidestilada y ajustar el pH a 7.2

I.7 Solución de Tripsina

Solución de tripsina al 2.5%(10X)	10 ml
SSBH(1X)	90 ml

En condiciones de esterilidad adicionar a un frasco de 100 ml la solución de tripsina y aforar con SSBH 1X a 100 ml. Ajustar el pH con bicarbonato de sodio 7.5% (p/v) hasta obtener una coloración canela en la solución. Conservar a 4° C

I.8 Acido Acético Glacial al 33%

Acido acético glacial 33 ml

Agua destilada 100 ml

Mezclar y mantener en refrigeración

I.9 Agarosa (0.8 %)

Agarosa 0.8 g

Agua bidestilada 100 ml

Disolver la agarosa llevando a ebullición y dejar enfriar antes de usar

I.10 Agarosa (2 %)

Agarosa 2 g

Agua bidestilada 100 ml

Disolver la agarosa llevando a ebullición y dejar enfriar antes de usar

I.11 Solución Salina (0.85%)

NaCl 0.85 g

Agua bidestilada 100 ml

Disolver el NaCl y esterilizar a 10 lb/pulg² durante 10 min. Mantener a temperatura ambiente.

APENDICE II

II.1 fMLP(Sigma Chemical Co. St. Luis, MO; USA)

Stock

FMLP 1 mg

Medio de mantenimiento 1 ml

Alicuotear y mantener a -20° C.

Solución de Trabajo

Diluir a la concentración deseada con medio de mantenimiento.

II.2 Suero Humano y/o de Armadillo activado con *Escherichia coli* (*E. coli*)

Se deja crecer previamente *E. coli* en medio de cultivo (BHI) durante 24 h a 37° C y posteriormente se ajusta a $1-3 \times 10^8$ cfu.

Se adiciona suero humano y/o de armadillo al 10% y se incuba 1 h a 37° C. En seguida se vuelve a incubar 30 min a 56° C para destruir la actividad residual del complemento.

Centrifugar por 20 min a 2000 rpm. Filtrar el sobrenadante con filtro Mullex-GS 0.22 μ m unidades de filtro. Guardar en alicuotas a -70° C.

II.3 Opsonización de levaduras (*S. cerevisiae*)

A 1 ml de levaduras se le adiciona 1 ml de suero, se incuba 30 min a 37° C, se centrifuga 15 min a 3500 rpm y se elimina el sobrenadante, se lava el botón tres veces con PBS, y finalmente se resuspende el botón en PBS, se guarda en alicuotas a -20° C hasta su uso.

II.4 Cultivo de *S. aureus*

A partir de la cepa de referencia de *S. aureus* (ATCC # 25923) se tomó una asada y se inoculó en un tubo de ensaye con medio BHI* incubándose a 37° C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó el tubo a 3500 rpm por 8 min, se eliminó el sobrenadante y se adicionó medio fresco. En seguida se ajustó el tubo de manera visual al tubo No. 1 del nefelómetro de McFarland, el cual corresponde a 3×10^8 células/ml. Posteriormente se

hicieron alicuotas, adicionando 900 μ l de las bacterias crecidas en el medio BHI y 100 μ l de glicerol. Las alicuotas se congelaron a -70° C hasta el momento de su uso.

***Caldo BHI**

Medio bacteriológico infusión cerebro-corazón 37 g

Agua destilada 1000 ml

Disolver el medio en el agua y calentar ligeramente si es necesario. Esterilizar a 121° C 15 min. Guardar en refrigeración.

II.5 LPS (de *E. coli*)

Stock

LPS 1 mg

Medio de mantenimiento 1 ml

Disolver el LPS, alicuotear y mantener a -20° C.

Solución de trabajo

Diluir a la concentración deseada con medio de mantenimiento.

II.6 PMA

Stock

PMA 1 mg

DMSO 1 ml

Disolver el PMA en el DMSO, alicuotear y mantener en oscuridad a -20° C.

Solución de Trabajo

Diluir a la concentración deseada con medio de mantenimiento.

II.7 Fitohemaglutinina (PHA) de *Phaseolus vulgaris* (Sigma Chemical Co. St Luis, MO; USA)

Stock

PHA 1 mg

Medio de mantenimiento 1 ml

Alicuotear y mantener a -20°C .

Solución de trabajo

Diluir a la concentración deseada con medio de mantenimiento.

II.8 Iniciador específico de IL-6 (Human Interleukin-6 [IL-6] Amplimer Set)

Clontech Labs., Inc. Palo Alto, CA.

Secuencia:

Iniciador del extremo 5': 5' ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC 3'

Iniciador del extremo 3': 5' GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG 3'

Tamaño del fragmento amplificado por PCR: 628 pb

II.9 Iniciador específico de IL-1 (Human Interleukin 1- α [IL-1 α] Amplimer Set)

Clontech Labs., Inc. Palo Alto, CA.

Secuencia

Iniciador del extremo 5': 5' CAAGGAGAGCATGGTGGTAGTAGCAACCAACG 3'

Iniciador del extremo 3': 5' TAGTGCCGTGAGTTTCCCAGAAGAAGAGGAGG 3'

Tamaño del fragmento amplificado por PCR: 491 pb

APENDICE III

III.1 Wright al 2%

Colorante de Wright 2 g

Metanol 100 ml

Disolver el colorante y filtrar con papel Whatman del no 3. Mantener a temperatura ambiente.

III.2 Nitroazul de tetrazolio (NBT) al 0.2%

Sales de nitroazul de tetrazolio 0.2 g

Solución salina al 0.85% 100 ml

Disolver el NBT en la solución salina previamente tibia Esterilizar por filtración y mantener a temperatura ambiente en oscuridad.

III.3 Safranina al 0.5%

Safranina 0.5 g

Agua destilada 100 ml

Disolver perfectamente la safranina, filtrar con papel Whatman del no 4 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente

III.4 Cristal violeta al 2%

Cristal violeta 2 g

Agua destilada 100 ml

Se disuelve perfectamente el colorante y se filtra con papel Whatman del no. 4. Mantener a temperatura ambiente.

III.5 (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) MTT

Stock:

MTT 250 mg

PBS 50 ml

Disolver perfectamente el MTT en el PBS Esterilizar por filtración y envasar protegiendo de la luz. Mantener en refrigeración

III.6 Bromuro de etidio

Solución stock

Bromuro de etidio 1 g

Agua bidestilada 100 ml

Disolver y mantener a temperatura ambiente en oscuridad.

Solución de Trabajo

Para la tinción de los geles de agarosa diluir a una concentración de 10 mg/ml con agua bidestilada.

III.7 Líquido de Turk

Cristal violeta al 2% 10 gotas

Acido acético glacial 3 ml

Agua destilada 100 ml

Mezclar y guardar a temperatura ambiente.

III.8 Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 3% resuspendido en Alcohol Isopropílico Acidificado 0.04N

Dodecil sulfato de sodio 3 g

Alcohol isopropílico 100 ml

HCl 122.5 μ l

III.9 Azul tripano al 2%

Sales de azul tripano 2 g

Solución Salina 0.85% 100 ml

Disolver perfectamente el colorante, filtrar en papel Whatman del no 4 y esterilizar a 121°

C durante 10 min

Solución de trabajo Diluir 1:10 en solución salina al 0.85%

APENDICE IV

IV.1 MEM 1X (10 %) SFT

SFT	10 ml
MEM 1X	100 ml

Adicionar el SFT al medio y mantener en refrigeración

IV.2 Medio RPMI-1640 1X con gelatina al 0.1%

Medio RPMI-1640 1X (SIGMA)	100 ml
Gelatina (RSV)	0.1 g

En 5 ml de medio disolver la gelatina, filtrar y adicionar al medio.

IV.3 Agar soya triptocaseína

Agar soya tripticasa	40 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver en el agua destilada en ebullición durante 10 min. Filtrar en autoclave a 121° C durante 15 min. Dejar enfriar un poco y vaciar a las cajas Petri. Guardar las cajas en refrigeración.

IV.4 RPMI-1640 1X (10 % SFT) para timocitos de ratón y cultivo de células L-929

RPMI-1640 suplementado con	
10% de SFT	100 ml
Gentamicina	10 mg
Estreptomina	6.5 mg

Adicionar los antibióticos al medio y ajustar el pH entre 7.2-7.4. Mantener en refrigeración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hansen G A. Causes of leprosy (traducción al inglés) Int. J Lepr. 1955 23: 307-309
2. Johnstone P A S. The search for animal models of leprosy. Int. J. Lepr. 1987: 55: 537-547
3. Kirchheimer W F and Storrs E E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn) as a model for the study of leprosy. Int. J Lepr 1971 39: 693-702.
4. Storrs E E., Walsh G G., Burchfield H. and Binford C. Leprosy in the armadillo, new model for biomedical research. Science. 1973 183 851-852.
5. Storrs E E. The nine banded armadillo: A model for leprosy and other biomedical research. Int. J. Lepr 1971 39: 703-714.
6. Storrs E E. Animal model. Experimental lepromatous leprosy in nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) Am J Pathol 1978: 92: 813-816.
7. Hall E R. *The mammals of North America* John Wiley and Sons (Eds) 1981. Tomo 1: 274-285 pp
8. Marin R. (Ed) Desdentados. En Clasificación de los mamíferos. Enciclopedia Barcelona España 1975 4 329-332 pp
9. Walsh G P , Storrs E E., Burchfield H P , Cottrell E H , Vidrine M F , Binford C. Leprosy-like disease occurring naturally in armadillos. J. Ret. Soc. 1975. 18: 347-351
10. Hastings R C , Gillis T P , Krahenbuhl J L and Franzblau S G. Leprosy Clin Microb. Rev. 1988 1: 330-348
11. Buchanan T M., Namaguchi H , Anderson D C , Young R A , Gillis T P , Britton W J., Ivanyi J , Kolk A H , Closs O , Blomin B R and Mehra V. Characterization of antigen-reactive epitopes on the 65,000-dalton protein molecules of *Mycobacterium leprae* Infect Immun. 1987: 55: 1000-1003.
12. Balentine D., L. Chang S and Sohn L.I. Infection of armadillos with *Mycobacterium leprae* Arch. Pathol. Lab Med. 1976. 100 175-181.
13. Smith H J , File K S , Nagy A B , Folse S D , Buckner A J , Webb J L and Beverding A M. Leprosy-like disease of wild armadillos in French Acadiana, Louisiana J Ret. Soc. 1978: 24: 705-719.

14. Job C K , Sánchez R M , Hunt R and Hastings R C. Prevalence and significance of positive Mitsuda reaction in the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) Int J. Lepr. 1987 55. 685-688
15. Storrs E E., Walsh G P and Burchfield H P. Development of leprosy in another species of armadillo *Dasypus hybridus* (L) genetic and immunological implications J. Trop. Med Hyg 1975: 78. 216-218.
16. Convit N J , Aranzazu N and Pinardi M E Leprosy in the armadillo: Clinical and pathological aspects. In: The armadillo as an experimental model in biomedical research. Pan American Health Organization (Eds) Scientific Publication. 1978 366. 41-46 pp
17. Putillo D T , Walsh G P., Storrs E E and Gannon C. The immune system of the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn) Anat. Rec. 1975 181: 725-733.
18. Santos-Argumedo L., Guerra-Infante FM., Posadas-López A , Quesada-Pascual F and Estrada-Parra S. Immune response of armadillos (*Dasypus novemcinctus*) I. Use of lectins to identify lymphocyte subpopulations and to evaluate cell proliferation. Int. J Lepr 1995 63. 546-551
19. Guerra I F M. Búsqueda de marcadores específicos para la identificación de poblaciones de linfocitos de armadillo (*Dasypus novemcinctus*). Tesis de maestría, E N C B del IPN Noviembre de 1994.
20. Amescua M E , Escobar G A , Storrs E E , Dhople A M and Burchfield H P Wild mexican armadillo with leprosy-like infection (Letter). Int. J Lepr 1984: 52: 254-255.
21. Guerra I FM. Algunos aspectos de la respuesta inmunológica del armadillo *Dasypus novemcinctus*. Tesis de doctorado, E N C B del IPN. Octubre de 1996.
22. Escobar G A and Amescua M E. El armadillo un nuevo animal de experimentación para el estudio de las zoonosis Cien. Vet. 1981: 3. 200-224.
23. Baliña C M., Cardama J E , Gahi J C., Valdez R P and Bianchi O. Research on armadillos in Argentina In: The armadillo as an experimental model in biomedical Research. Washington, D C Pan American Health Organization (Eds) Scientific Publication. 1978. 366: 103-106.
24. Cuba C A. The armadillo in biomedical research. In The armadillo as an experimental model in biomedical research Pan American Health Organization and World Health Organization (Eds) Scientific Publication 1978 No 366 18-30 pp.

- 25 Ulrich M I Immunology of the armadillo. In The armadillo as an experimental model in biomedical research Pan American Health Organization and World Health Organization (Eds). Scientific Publication. 1978 No. 366: 32-35 pp
26. Ulrich M I., Convit J., Centeno M and Rapetti M. Immunological characteristics of the armadillo, *Dasypus sabanicola*. Clin. Exp. Immunol. 1976: 25: 170-176.
27. Negassi K., Closs O and Harboe M. Cross-reactions between serum proteins and water soluble liver tissue antigens of the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*. Linn) and man. Clin. Exp Immunol. 1979: 38 135-147.
28. Guerra I FM., Quesada P F , Estrada P S. and Santos A L. Evolution of lymphocyte populations in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) inoculated with *M. leprae* Int. J Lepr 1996. 64 152-158.
29. Portaels F , De Ridder K and Pattyn S R. Cultivable mycobacteria isolated from organs of armadillos uninoculated and inoculated with *M. Leprae*. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 1985 136A: 181-190
- 30 Rojas-Espinosa O., Aponte-Vázquez J , González-Cruz O , Estrada-Parra S and Ortiz Y. Phagocytosis in leprosy. III. Defective adhesive and endocytic abilities of circulating leukocytes in lepromatous leprosy Int. J. Lepr. 1979 48: 159-166.
31. Oliver M J Cell biology of leukocyte abnormalities- membrane and cytoskeletal function in normal and defective cells (A review). In: Leukocyte abnormalities. Am. J Pathol. 1978: 93 221-261.
32. Tizard R I (Ed) Interamericana-McGraw-Hill. Destrucción de patógenos extraños En: Inmunología veterinaria. 5^a Ed México 1998. 22-32 pp
- 33 Rojas E O , Valderrama G S and Arce P P. NADPH-Oxidasa activity triggered by endocytosis of yeast in circulating phagocytes of nine banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*). Int. J. Lepr. 1996: 64: 329-332.
- 34 Smith S G and H. J. Lumsden. Review of neutrophil, adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. Vet Immunol. Immunopathol. 1983. 4: 177-236
35. Hallet M. and Lloyds D. Neutrophil priming: the cellular signals that say "amber" but not "green". Immunol. Today. 1995: 16: 264-268
36. Turner M Mannose-binding lectin. the pluripotent molecule of the innate immune system. Immunol. Today. 1996 17: 532-540.

37. Ka-Ming ChF , Chun JH., Zheng L., Siegel MR., Buik L. and Lenardo JM. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000. 288 2351-2354.
38. Kato K , Yokoi T., Takano N , Kanegane H, Yachie A , Miyawaki T and Taniguchi N. Detection by in situ hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. *J. Immunol.* 1990; 144: 1317-1322
39. Practical Immunology. Hudson L. and Hay CF (Eds) 3rd Ed. Blackwell Scientific Publication. London. 1989. 426-427, 429-430 and 443 pp
40. Yeon D.J., Rafii S , Hamada T. and Moore M. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stroma cell-derived factor-1 *J. Clin. Invest.* 2000. 105. 101-111.
41. Autores varios: Manual de prácticas de Inmunología. Depto. de inmunología (Eds). ENCB, IPN. 1992: 13-16 pp.
42. P. E. Quie and L. Mills (Eds). Granulocyte microbicidal activity. In: Investigation of phagocytes in disease. Churchill Livingstone. Great Britain. 1981. 62-65 pp
43. Paik G. and T. Suggs M. Reagents, stains and miscellaneous. In: Manual of clinical microbiology. H. Lennette, Spaulding E. and Truant J. (Eds). 2nd Ed. AM Press. USA 1974. 933-950 pp
44. Guerra-Infante FM , Flores-Medina S , López-Hurtado M , Zamora-Ruiz A., Sosa GIE, Narcio RL and Villagrana-Zessati R. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid from asymptomatic infertile women. *Arch. Med. Res.* 1999; 30: 138-143
45. Eisermann J , Gast M , Pineda J., Odem R. and Collins J. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopy. *Fertil. Steril.* 1988; 50: 573-579.
46. Hirano T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi and T. Kishimoto. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324:73-78
47. Purtilo DT, Walsh GP, Storrs EE, Gannon C. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). *Anat Rec* 1974; 181: 725-739
48. Parent A C and Devreotes N P. A cell's sense of direction. *Science* 1999. 284: 765-770.
49. Lodewijk V., Dekker and Segal W S. Signals to move cells. *Science* 2000. 287: 982-985.

- 50 Sugawara T., Miyamoto M., Takayama S. and Kato M. Separation of neutrophils from blood in human and laboratory animals and comparison of the chemotaxis. *J. Pharmacol. and Toxicol. Methods.* 1995; 33: 91-100.
- 51 Hii ST., Stacey K., Moghaddami N., Murray WA and Ferrante A. Role of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in human neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and in migration. *Infect. Immun.* 1999; 67: 1297-1302.
- 52 Brazil TJ, Rossi AG, Haslett C., McGroorum B., Dixon PM, Chilvers ER. Priming induces functional coupling of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors in equine neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1998; 63: 380-8
- 53 Sasaki T, Irie SJ, G Jones R, Oliveira dSA, L Stanford W, Bolon B, et. al. Function of p13ky in thymocyte development, T cell activation and neutrophil migration. *Science* 2000; 287: 1040-1046.
- 54 E. Chenoweth, A. Lane, G. Rowe and E. Hugli. Quantitative comparisons of neutrophil chemotaxis in four animal species. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1980; 15: 525- 535.
- 55 Sengelov H. Complement receptors in neutrophils. *Crit. Rev. Immunol.* 1995; 15: 107-131.
- 56 D. Nelson R, G. Quie P and L. Simmons R. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* 1975; 115: 1650-1656
- 57 Myron S C. Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18 (suppl. 2): 5170-179.
- 58 Guerra-Infante FM., Estrada-Carlos I. y López-Hurtado M. Actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares de mujeres embarazadas. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 1999; 41: 47-51
59. Silva I. and Jain N C. Phagocytic and nitroblue tetrazolium reductive properties of bovine neutrophils for mammary pathogens. *J. Dairy Sci.* 1988; 71: 1625-1631
- 60 Chammas P C. and Hagiwara K M. Evaluation of neutrophilic function (chemotaxis, phagocytosis and microbicidal activity) in healthy dogs and in dogs suffering from recurrent deep pyoderma. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1998; 64: 123-31.

61. Martin E. and Bhakdis S. Flow cytometric assay for quantifying opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by peripheral blood leukocytes. *J. Clin. Microbiol.* 1992: 2246-2255.
62. Okamura K., Yonemoto Y., Hamazaki Y., Higashiiwai H. and Yajima A. Nitroblue tetrazolium reduction by leukocytes in the cervix of pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1988. 159: 417-420.
63. Stevens G M., Kehrli E. and Canning C P. A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1991: 28 45-56.
64. Rainard P., Riollet C., Poutrel B. and Paape J M. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor- α and the des-arginine derivative of C5a. *Am. J. Vet. Res.* 2000: 61 951-959.
65. Mascellino M T., Deloju M R., Pelaia R., Parrinello R P. and Giardina A. Reduced bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* of blood neutrophils from patients with early adult respiratory distress syndrome. *J. Med. Microbiol.* 2001. 50 49-54.
66. Casatella M A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 1995 16: 21-26.
67. Inui A. Cytokines and sickness behavior: implications from knockout animal models. *Trends Immunol.* 2001. 22: 469-473.
68. Goh k., Furusawa S., Kawa Y., Negishi-Okitsu S. and Mizoguchi M. Production of interleukin 1-alpha and -beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1989. 88: 297-303.
69. Giguère S. and Prescott J. Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet. Immunol, Immunopathol.* 1999 67. 1-15.
70. Beck G. and Habicht G. Invertebrate cytokines. In: *Phagocytes, biology, physiology, pathology and pharmacotherapeutics.* Ann New York Acad. Scien. Paoletti R., Notario A. and Ricevutti G. Eds. 1997. 832: 206-212.
71. Sheng YJ., Bird J., Pompidou A., Florentin I. and Giroud JP. Rat and human polymorphonuclear leukocyte derived lymphocyte stimulatory factors. *Biomed. Pharmacother.* 1984: 38. 304-8.

72. Mori S , Goto F , Goto K , Ohkawara S., Maeda S , Shimada K and Yoshinaga M
Cloning and sequence analysis of a cDNA for lymphocyte proliferation potentiating factor of rabbit polymorphonuclear leukocytes: identification rabbit interleukin 1 beta. *Biochem. Biophys Res Commun.* 1988 150: 1237-43.
73. Cassatella M , Bazzoni F , Ceska M., Ferro I , Baggiolini M and Berton G. IL-8 production by human polymorphonuclear leucocytes. *J Immunol.* 1992 148: 3210-3220.
74. Altschul, Stephen F., Thomas LM , Schaffer AA , Zheng J , Zhang Z., Miller W. and Lipman JD. "Gapped BLAST and PSI-BLAST a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res* 1997
75. Guerra-Infante FM., Zamora-Ruiz A , López-Hurtado M and Flores-Medina S Induction of tumor necrosis factor- α by cefodizime in U-937 cells. *Rev Investigación Clín.* 2001 53: 335-339
76. Jablonska E. Relationship between TNF-alpha, IL-6 and their soluble receptors in the cultures of human PMN, PBMC and WBC. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 2001: 46: 77-86
77. M Otto C and A Rawlings C Tumor necrosis factor production in cats in response to lipopolysaccharide: an in vivo and in vitro study. *Vet Immunol Immunopathol* 1995. 49: 183-188.
78. Casatella M A., Gasoerini S and Russo M Cytokine expression and release by neutrophils. In: *Phagocytes, biology, physiology, pathology and pharmacotherapeutics.* Ann New York Acad. Scien Paoletti R , Notario A. and Ricevutti G Eds. 1997: 832: 233-242 pp.
79. Kishimoto T The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989 74: 1-10.
80. Kimitaka K., Yokoi T., Takano N., Kanegane H., Yachie A., Miyawaki T and Taniguchi N Detection by *in situ* hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. *J. Immunol.* 1990 144: 1317-1322 .
81. Kipar A., Leutenegger CM., Hetzel V., Akons MK , Mislin CN , Reinacher M. and Lutz H. Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001: 78: 305-315
82. Mori S , Goto K , Goto F., Murakami K., Ohkawara S and Yoshinaga M. Dynamic changes in mRNA expression of neutrophils during the course of acute inflammation in rabbits. *Int Immunol* 1994: 6: 149-156

83. Altstaedt J., Kirchner H. and Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunol.* 1996; 89: 563-568
84. Jayagopala R., Borgs P. and Wilkie B. Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000; 74: 31-46.