



01674  
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION  
Y DE LA SALUD ANIMAL

APOPTOSIS POR *Mycobacterium bovis*  
EN MACROFAGOS DE BOVINO:  
EFECTO DE LA VIRULENCIA BACTERIANA Y  
DE LA RESISTENCIA NATURAL DEL HOSPEDERO.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS

P R E S E N T A

HUGO ESQUIVEL SOLIS

TUTOR:  
DR. JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO.

COMITE TUTORAL:  
DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL  
DR. JOSÉ ALFONSO BARAJAS ROJAS

MEXICO, D.F.

2003.

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



---

Hugo Esquivel Solís

Dedico el presente trabajo principalmente a mi esposa Liliana, compañera, amiga, guía y apoyo constante en esta incesante labor por lograr ser mejor, por vencerme a mi mismo. Agradezco su entrega, su paz y su amor y mantengo la frente en alto persiguiendo su imagen de hermosa persona como madre y hermana, con la firme intención de llegar a alcanzarla algún día.

También lo dedico a mi hijo Luis Omar, principal orgullo en mi vida y prueba fiel de la existencia de Dios. A mi madre, vivo ejemplo de la fuerza y entrega a la vida y a Jorge amigo y padre, ejemplo de paciencia y trabajo.

Por último dedico esta tesis a mis hermanos Rocio, Xochitl, Edgar, Omar, Carla y Oscar. Juntos hemos creado y nutrido el gran árbol que es eje de México, una gran familia y con el paso del tiempo también hemos ido acumulando nuevos frutos que de forma perenne se mantienen en el tiempo.

Y a quien me dejó el eterno recuerdo de su imagen y la sufrible esperanza de la inmortalidad, sabiendo que la única verdad que da la vida ..... es el amor.

**Gracias.....**

**A mi jurado:** Dr. Francisco Suárez Güemes, Presidente. Dra. Yolanda López Vidal, Secretario. Dra. Clara Espitia Pinzón, Vocal. Dr. José Alfonso Barajas Rojas, Suplente. Dr. José Angel Gutiérrez Pabello, Suplente. Por sus juiciosos comentarios en la elaboración del presente trabajo.

**A mi tutor:** José Angel Gutiérrez Pabello. Por instaurar en mí la confianza, la capacidad y la objetividad en el cumplimiento de esta y todas mis futuras metas. Agradezco su amistad y consejos y su ejemplo de basta calidad humana.

**A mis amigos del laboratorio:** Alejandro, Antonio, Giovanna, Silvia y Xochil. Por su aporte constante en ideas y recursos de gran calidad humana a quienes debo gran parte de mi formación como profesional y como persona.

**A las instituciones:** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina e Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por el apoyo de instalaciones y personal técnico y docente en la realización experimental de este trabajo.

**A los proyectos:** CONACYT 34833-B, PAPIIT IN-219999 y TAMU-CONACYT ID-3-051002-7 por los financiamientos otorgados para la realización de este estudio.

**A todos** aquellos que sin imaginarlo, fueron tinta de palabras escritas en el libro de mi vida.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	2
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>2.0 MATERIALES Y METODOS</b> .....	13
<b>3.0 RESULTADOS</b> .....	22
<b>4.0 DISCUSIÓN</b> .....	27
<b>5.0 CONCLUSIONES</b> .....	35
<b>6.0 REFERENCIAS</b> .....	36
<b>7.0 CUADROS Y FIGURAS</b> .....	48
<b>8.0 APÉNDICE</b> .....	55

## INDICE

<b>1.0 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
Justificación .....	9
Hipótesis .....	12
Objetivo principal.....	12
Objetivos específicos .....	12
<b>2.0 MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Macrófagos derivados de monocitos de bovino.....	13
2.2 Inducción de activación de macrófagos.....	15
2.3 Bacterias.....	15
2.3.1 Cinética de crecimiento .....	16
2.3.2 Preparación del inóculo .....	17
2.4 Infección de macrófagos.....	18
2.5 Detección de apoptosis .....	18
2.5.1 Condensación de cromatina (CCr).....	19
2.5.2 Fragmentación del ADN nuclear (FADN).....	20
2.6 Análisis estadístico .....	21

<b>3.0 RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Macrófagos derivados de monocitos de bovino.....	22
3.2 Activación de macrófagos.....	22
3.3 Bacterias.....	22
3.4 Apoptosis en macrófagos de bovino inducida por <i>Mycobacterium</i> <i>bovis</i> .....	23
<b>4.0 DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>5.0 CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>6.0 REFERENCIAS .....</b>	<b>36</b>
<b>7.0 CUADROS Y FIGURAS .....</b>	<b>48</b>
<b>8.0 APÉNDICE .....</b>	<b>55</b>

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Figura 3.2.1</b> .....	<b>48</b>
<b>Figura 3.3.1</b> .....	<b>49</b>
<b>Cuadro 3.4.1</b> .....	<b>50</b>
<b>Figura 3.4.1</b> .....	<b>51</b>
<b>Figura 3.4.2</b> .....	<b>52</b>
<b>Figura 3.4.3</b> .....	<b>53</b>
<b>Figura 3.4.4</b> .....	<b>54</b>

## RESUMEN.

Hugo Esquivel Solís. Apoptosis por *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino: efecto de la virulencia bacteriana y de la resistencia natural del hospedero. Bajo la dirección del Dr. José Angel Gutiérrez Pabello.

Se sabe que *M. bovis* induce apoptosis en macrófagos de bovino y que aquellos resistentes a la infección por *M. bovis* BCG, controlan mejor el crecimiento intracelular de éste y otros agentes, comparado con los susceptibles. Con el objetivo de examinar la influencia del fenotipo de resistencia del bovino sobre la inducción de apoptosis tras la infección de *M. bovis*, se utilizaron macrófagos resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares en reposo y activados, desafiándolos con *M. bovis* BCG (cepa atenuada) y *M. bovis* 9926 (cepa patógena) (MOI 10:1), conservando testigos sin infección. Se analizaron los respectivos porcentajes de apoptosis a diferentes tiempos post-infección (pi) por condensación de cromatina (CCr) con tinción de yoduro de propidio y por fragmentación de ADN (FADN) por TUNEL. La inducción de apoptosis en los macrófagos fue significativa con *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ) y con *M. bovis* 9926 ( $p < 0.001$ ) sobre el fenotipo resistente ( $p < 0.001$ ) y sobre el susceptible ( $p < 0.01$ ). Se evidenció el fenómeno desde las 8 h pi por CCr y desde las 16 h pi por FADN, además, mostró tendencia de incremento con ambas características hacia las 24 h pi. Los macrófagos resistentes presentaron más apoptosis con ambas cepas de *M. bovis* que los susceptibles y la cepa patógena indujo mayor apoptosis que la cepa BCG. La activación de las células incrementó el porcentaje de apoptosis, conservando la misma relación descrita en células en reposo. La apoptosis de macrófagos de bovino inducida por *M. bovis*, dependió de la resistencia natural del hospedero a la infección y la virulencia de la bacteria. Por lo tanto, este fenómeno puede jugar un papel importante en la patogenia de la tuberculosis.

Palabras clave: apoptosis; *Mycobacterium bovis*; macrófagos de bovino; resistencia natural del huésped; activación celular; óxido nítrico.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## SUMMARY.

Hugo Esquivel Solís. Bovine macrophage apoptosis by *Mycobacterium bovis*: effect of bacterial virulence and host natural resistance. Directed by Dr. José Angel Gutiérrez Pabello.

Is well known that bovine macrophages undergo apoptosis by *M. bovis* infection and the resistant cells to *M. bovis* BCG infection do better control over intracellular growth of it and other intracellular agents than susceptible cells do. With the aim of examine the bovine resistant phenotype influence over macrophage apoptosis induction by *M. bovis* infection, were used resistant and susceptible macrophages to intracellular pathogens in resting and activated state and were challenged with *M. bovis* BCG (avirulent) and *M. bovis* 9926 field strain (virulent) (MOI 10:1) and were kept cells without infection as controls. Respective apoptosis percentages were analyzed at different post-infection times (pi), by chromatine condensation (CCr) with propidium iodide staining and by DNA fragmentation (FADN) with TUNEL technique. The apoptosis induction on bovine macrophages was significant with *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ) and with *M. bovis* 9926 ( $p < 0.001$ ) over resistant ( $p < 0.001$ ) and susceptible ( $p < 0.01$ ) phenotype. Evidenced early as 8 h pi by CCr and 16 h pi by FADN. Showed tendency to increase to 24 h pi in both characteristics. The resistant macrophages were more prone to undergo apoptosis with both *M. bovis* strains than susceptible cells and the virulent strain induced more apoptosis than BCG strain. The activation of cells increase the apoptosis percentages watching the same relationship described on resting cells. The bovine macrophage apoptosis induced by *M. bovis*, depended on host natural resistance to infection and bacterial virulence. Thus, this phenomenon may play an important role in the tuberculosis pathology.

Keywords: apoptosis; *Mycobacterium bovis*; bovine macrophages; host natural resistance; cellular activation; nitric oxide.

## 1.0 INTRODUCCION.

El agente causal de la tuberculosis bovina *Mycobacterium bovis*, es un microorganismo que guarda una estrecha relación genética y estructural con *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis humana (Brosch *et al.*, 2002). La patogenia de la infección ocurre en condiciones similares en ambas especies, comenzando con la entrada de la bacteria a los pulmones por inhalaciones aéreas y la posterior fagocitosis por los macrófagos alveolares que son considerados como la primera línea de defensa ante el microorganismo, además de ser las células en donde permanece éste (Fenton 1996; Keane *et al.*, 1997).

La función bactericida de los macrófagos se fundamenta en la generación de productos intermedios reactivos del oxígeno (ROI) y del nitrógeno (RNI) a través del estallido respiratorio. Sin embargo, existe controversia acerca del papel que estos sistemas juegan en la eliminación del bacilo. Algunos autores argumentan que los radicales de oxígeno son suficientes para eliminar a las micobacterias (Klinger *et al.*, 1997) y otros han demostrado que el óxido nítrico (ON) en el ratón es capaz de controlar la infección de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* BCG *in vitro* (Arias *et al.*, 1997; Bekker *et al.*, 2001) y de *M. tuberculosis in vivo* (Chan *et al.*, 1995; MacMicking *et al.*, 1997a; Mohan *et al.*, 2001).

La importancia del IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en la resistencia a la infección por micobacterias, ha sido atribuida a su capacidad de actuar como un mecanismo de regulación para mantener la homeostasis de las células efectoras durante la respuesta inmune (Dalton *et al.*, 2000). La producción de IFN- $\gamma$ , está principalmente limitada a las células T y a las células asesinas naturales, sin embargo, también se ha comprobado su producción por macrófagos alveolares de humano tras la infección por *M. tuberculosis* (Fenton *et al.*, 1997). El IFN- $\gamma$  y el Factor de Necrosis Tumoral

alfa (TNF- $\alpha$ ), juegan un papel crítico en la estimulación de macrófagos para sintetizar ON, además de ser los principales mediadores de la activación de los macrófagos que participan en la resistencia a las infecciones por patógenos intracelulares (Goerdts *et al.*, 1999; Bekker *et al.*, 2001).

La activación de los macrófagos resulta a nivel molecular en el incremento de la expresión de proteínas sobre la membrana celular como los antígenos de histocompatibilidad clase II y en la secreción de citocinas como TNF- $\alpha$ , de quimiocinas como la IP-10 y de productos ROI y RNI. Funcionalmente, su activación se traduce en una actividad fagocítica y microbicida capaz de destruir células tumorales y de potencializar respuestas como el estallido respiratorio y la producción de ON (Lewis y McGee, 1992; Hamerman y Aderem, 2001). Por otra parte, también es sabido que *M. bovis* BCG induce la activación de macrófagos de ratón, evaluado por producción de nitrito (Stuehr y Marletta, 1987). Asimismo, *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG inducen la transcripción de genes involucrados en la activación de macrófagos de humano, valorado por la técnica de micro-arreglos de ADN (Nau *et al.*, 2002).

Se sabe que la síntesis *de novo* de ON en macrófagos de bovino, depende de la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Adler, *et al.*, 1995). Además, la capacidad de los macrófagos expuestos a compuestos microbianos y al IFN- $\gamma$  en activar a la iNOS y generar ON, es conocido como un mecanismo efector muy importante en el combate de patógenos intracelulares en la resistencia natural (Jungji, *et al.*, 1999).

Las tres isoformas de las óxido nítrico sintasas (NOS) de mamíferos catalizan la producción de ON por el mismo camino bioquímico, que consiste en dos reacciones consecutivas de la monooxigenasa. Una molécula de L-arginina es oxidada en nitro-guanidina para producir N-OH-L-arginina como un producto intermedio, el cual es posteriormente oxidado para obtener una molécula de ON y

L-citrulina. En total 1.5 moléculas de NADPH y dos moléculas de oxígeno, ambos compuestos sirviendo como co-sustratos, son convertidas a 1.5 moléculas de NADP<sup>+</sup> y dos moléculas de agua como productos (MacMicking, *et al.*, 1997b). El ON rápidamente es convertido en otros reactivos intermedios del nitrógeno, reacciona con el superóxido para formar el altamente reactivo peroxinitrito e interactúa directamente con enzimas *thio-iron-containing* (Adler, *et al.*, 1995).

La formación de ON por la iNOS, ocurre en grandes cantidades y por periodos prolongados (Jungi *et al.*, 1996a y 1996b). El ON es liberado en esas concentraciones, es reconocido como un inductor de apoptosis de una amplia variedad de células. Referente a los macrófagos, la activación celular es seguida de apoptosis como parte de la respuesta fisiológica (Albina y Reichner, 1998). La inducción de apoptosis dependiente de ON en macrófagos, ocurre por la liberación del citocromo *c* de la mitocondria modificado químicamente, probablemente por la formación de residuos de nitro-tirosina y esto es seguido de un incremento sostenido del potencial de membrana de la mitocondria, sugiriendo la síntesis de peroxinitrito en la mitocondria y la subsiguiente finalización en la muerte celular por apoptosis (Hortelano, *et al.*, 1999).

La apoptosis es un mecanismo homeostático de los organismos superiores y es considerada como una respuesta importante en la infección por un número creciente de patógenos intracelulares bacterianos y protozoarios. En la mayoría de los casos, las células que manifiestan ésta respuesta pertenecen al linaje monocítico-macrofágico (Fettuciari *et al.*, 2000; Raupach y Kauffmann, 2001). La apoptosis de macrófagos es comúnmente observada después de una infección *in vitro* o *in vivo*, aunque en algunos casos, los patógenos parecen inhibir la apoptosis de la célula infectada. Estas observaciones indican que la respuesta depende de un balance de señales pro- y anti-apoptóticas que son originadas desde la célula o el patógeno (Kornfeld *et al.*, 1999; Liang-Yong y Kwaik, 2000; Häcker y Fischer, 2002).

La apoptosis, está dirigida intracelularmente a través de un camino de señales, dentro de las cuales, interviene la activación de un grupo de enzimas cistein-aspártato proteasas llamadas caspasas, que realizan cortes de proteínas en sitios posteriores a residuos de ácido aspártico (Vaux y Strasser, 1996; Amarante-Méndez y Green, 1999). Estas proteasas, se encuentran en una amplia variedad de tipos celulares en formas precursoras inactivas o zimógenos y son activadas una vez que han recibido una señal para desencadenar la apoptosis. Las caspasas activadas tienen como sustrato a otras caspasas y asimismo, otros factores involucrados con la mitocondria (Aggarwal, 2000; Antonsson, 2001). Además, éstas dismantelan proteínas nucleares importantes y también actúan sobre heterodímeros como el DFF (*Death Fragmentation Factor*) también conocido como CAD-ICAD (*Caspase Activated DNase- Inhibitor of CAD*) (Enari, *et al.*, 1998; Widlak, 2000). Este último mecanismo, se ha reconocido como el camino que lleva a la condensación de la cromatina y es mediado principalmente por la caspasa-3 que actúa sobre el complejo DFF o CAD-ICAD liberando a su inhibidor DFF45 o ICAD, permitiendo que la forma libre de este dímero (DFF40 o CAD), que es una endonucleasa, actúe sobre el ADN específicamente (Liu *et al.*, 1998; Samejima *et al.*, 1998).

Uno de los más notables cambios morfológicos dentro de la ejecución de la muerte celular programada es la apoptosis nuclear (Widlak, 2000; Nagata, 2000). Esta consiste en una condensación de cromatina perinuclear temprana que conlleva a un rompimiento nuclear masivo. En algunas células es acompañada por la segmentación del núcleo en partes densas (Lecoeur, 2002). Estas alteraciones morfológicas, generalmente son acompañadas en forma prematura por cortes del ADN que sucesivamente generan fragmentos de alto peso molecular de 1Mb y 50 kb. Estos fragmentos resultan del corte progresivo de ADN en múltiplos de 50 a 200 kb asociados con la muerte celular (Susin, 1999) y después es cortado entre las unidades nucleosomales (Nagata, 2000). Aunque a menudo se correlaciona la

condensación de la cromatina con la ruptura del ADN internucleosomal, no es obligado que se requiera ésta para desencadenar este último proceso (Widlak, 2000). Durante la apoptosis, la condensación de la cromatina también puede ser debida a la acción del AIF (Apoptosis Inductor Factor), una proteína de intermembrana mitocondrial que es rápidamente liberada de mitocondria por aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y translocada al núcleo sin depender totalmente de la actividad de caspasas, generando condensación de cromatina y fragmentos de ADN de gran escala (~ 50 kb) sin presencia de cortes inter nucleosomales (Susin, 1999). Otro factor descrito es una proteína llamada *acinus*, en donde la condensación de la cromatina se observa sin acompañarse de ninguna fragmentación del ADN y este proceso es independiente de caspasa-3 (Sahara, 1999).

En la patogenia de la tuberculosis, se sabe que la infección por *M. tuberculosis* de monocitos/macrófagos de ratón y de humano puede inducir o inhibir la apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo* (Keane *et al.*, 1997; Placido *et al.*, 1997; Klinger *et al.*, 1997; Watson *et al.* 2000; Hirsch *et al.*, 2001) a través del TNF- $\alpha$  y por la vía dependiente de caspasa 1 (Rojas *et al.*, 1999). Además, también se ha manifestado una disminución en la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2 en macrófagos infectados con ésta micobacteria (Klinger *et al.*, 1997). La inducción de apoptosis por *M. tuberculosis*, es parcialmente mediada por unión de los componentes de la pared celular bacteriana al receptor tipo Toll-2 (TLR-2) (Underhill *et al.*, 1999). De manera que las actividades pro y anti-apoptóticas, inducidas por *M. tuberculosis*, que posiblemente se manifiestan durante los diferentes estados de la infección, pueden ser necesarias para el establecimiento de una infección persistente (Liang-Yong y Kwaik, 2000).

Se ha visto que la infección de macrófagos derivados de monocitos de individuos sanos con *Mycobacterium avium* o *M. tuberculosis* muerto por calor, falló en la inducción de apoptosis (Placido *et al.*, 1997). Asimismo, otro estudio *in vitro*

demonstró que el desafío con bajas multiplicidades de infección (*Multiplicity of Infection* – MOI, de 1:1) también fueron insuficientes para inducir la apoptosis de macrófagos (Dürbaum-Landmann *et al.*, 1996), indicando que la carga bacteriana, la especificidad de especie y la virulencia son factores clave en la inducción de apoptosis de macrófagos en la patogenia de la tuberculosis.

Asimismo, la apoptosis de los macrófagos infectados por la micobacteria inhibe el crecimiento intracelular y previene la diseminación de la bacteria (Fratuzzi *et al.*, 1997). Sin embargo, la micobacteria paradójicamente inhibe la apoptosis de los macrófagos a través de dos mecanismos: *i.* por la activación del Factor Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), vía dependiente del TLR-2 (Alliprantis *et al.* 1999), y *ii.* Por el incremento en la producción del receptor 2 soluble del TNF- $\alpha$  dependiente de la producción de Interleucina 10 (IL-10), que al ser liberado se une al TNF- $\alpha$ , lo neutraliza e impide la señal pro-apoptótica de éste factor (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998). La producción de IL-10 por los macrófagos es inducida por cepas virulentas de *M. tuberculosis* y es reconocida como un mecanismo de modulación de la infección, ya que ésta citocina cambia el curso de la respuesta inmune mediada por células T cooperadoras tipo 1 (Th1) hacia la respuesta inmune mediada por células T cooperadoras tipo 2 (Th2), así las citocinas liberadas por estas células a su vez, favorecen la persistencia intracelular de la bacteria (Rojas *et al.*, 1999).

Además, se ha probado que macrófagos de ratones genéticamente resistentes a *M. bovis* BCG, *Leishmania donovani* y *S. typhimurium*, congénicos al gen *Nramp1* (macrófagos B10R), son más propensos a sufrir apoptosis que los macrófagos de ratones genéticamente susceptibles a los mismos agentes (macrófagos B10S), tras la exposición de *M. tuberculosis* H37Rv y al PPD, además, los macrófagos B10R presentaron mayor control sobre la micobacteria que los B10S (Rojas *et al.*, 1997). De este modo, estos autores postulan que el fenotipo de los macrófagos de mayor producción de ON y de TNF- $\alpha$ , corresponde a su vez con una mayor inducción de apoptosis y mayor control de *M. tuberculosis* en éstos, además, este

fenotipo es expresado en los macrófagos B10R y en macrófagos peritoneales de ratón *Nramp1*<sup>+/+</sup>. Por lo que sugieren que la base del gene *Nramp1*, que controla el fenotipo de resistencia en el ratón, pudiese participar en el balance entre la apoptosis y la supervivencia del macrófago, además del control intracelular de la micobacteria (Rojas *et al.*, 1997; 1998 y 1999).

Por otra parte, se ha demostrado la inducción de apoptosis en macrófagos de bovino tras la incubación con *M. bovis* virulento en ensayos *in vitro*. Estas observaciones muestran que existe una relación directa entre la MOI utilizada y el tiempo de presentación de apoptosis (Gutiérrez-Pabello *et al.*, 2002). Además, los macrófagos provenientes de bovinos resistentes o susceptibles a *M. bovis* BCG presentan diferencias significativas en el control de *M. bovis* virulento y otros agentes, siendo mayor el control en los resistentes (Qureshi *et al.*, 1995; Vallecillo, 2003). Por lo tanto, se propone que la virulencia de *M. bovis*, la resistencia natural del hospedero a la infección y la activación de los macrófagos participan dinámicamente en la apoptosis, siendo mayor en los macrófagos de bovinos resistentes que de bovinos susceptibles. El presente estudio se planteó con el objetivo de conocer esta dinámica entre la apoptosis de macrófagos por *M. bovis* y la resistencia natural a la infección.

## **JUSTIFICACION.**

Según datos oficiales, la décimo novena causa de muerte de humanos en México es la tuberculosis causada por *M. tuberculosis*, con una tasa de 3.3 muertes por cada 100, 000 habitantes (INEGI-SSA, 1999). La Organización Mundial de la Salud, en un estudio reciente, anunció predicciones de que para el año 2005, éste patógeno causaría la muerte de 4 millones de personas anualmente en todo el mundo, siendo un incremento significativo de los 3 millones de muertes mundiales que causó éste agente en 1992 (Fenton, 1996).

En México existen aproximadamente 30 millones de bovinos, de los cuales cerca del 6% es especializado en producir leche (CEA, 1999). Únicamente se pasteuriza el 70% de la leche producida y la demás se consume cruda o se transforma en derivados lácteos (Luna-Martínez *et al.*, 1996, Valdespino, 1993), lo cual implica un alto riesgo para la salud pública por la transmisión de agentes infecciosos. En el caso de *M. bovis*, se considera que la excreción de la bacteria a través de leche es muy baja (Menzies y Neill, 2000; Pollock y Neill, 2002) y por lo tanto, no representa un alto riesgo de contagio por esta vía. Por otra parte, en los animales afectados por tuberculosis, la producción de leche disminuye hasta el 17% (Santillán, 2002). Por esto es que desde 1995, se han implementado estrategias legales a nivel nacional que regulan por medio de la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, el control y la erradicación de la tuberculosis bovina, promoviendo y evaluando actividades para alcanzar estos dos fines. Actualmente, en la república mexicana los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Sonora, Tamaulipas, Yucatán y Quintana Roo se encuentran según la Norma, en fase de erradicación de tuberculosis bovina (DGSA, 2001). De tal forma que, poco más del 21% de los estados, han conseguido mantener la prevalencia conocida de tuberculosis bovina en menos de 2% de los hatos, lo que ha permitido a estos estados exportar ganado en pie hacia otros estados e inclusive hacia el extranjero.

El estudio de la patogenia de la tuberculosis aún falta por completarse y representa sin duda un reto científico y social para la humanidad. No obstante, los avances en la investigación sobre ésta enfermedad, han ayudado a esclarecer los mecanismos de infección de la bacteria y de la respuesta inmunológica del huésped, que indudablemente servirán para poder llegar a su control. Asimismo, el explorar los eventos que suceden en las interacciones celulares y moleculares entre el bacilo y el huésped nos brindarán una mejor interpretación de los mecanismos de infección-resistencia y así poder contribuir en el control de la enfermedad. Por lo tanto, se pretende que el conocimiento generado a partir de un modelo *in vitro* sobre el proceso de apoptosis inducido después de la infección por

*M. bovis* en macrófagos de bovino, identificado como un mecanismo de resistencia del huésped, nos llevará a comprender el proceso establecido *in vivo* de manera parcial, de tal forma que ésta comprensión estimule la búsqueda de nueva información y así contribuya en cierta proporción en el establecimiento de mejores medidas de control y erradicación de la tuberculosis.

## **HIPOTESIS.**

Existe diferencia entre el porcentaje de apoptosis de macrófagos en reposo y activados derivados de monocitos de un bovino resistente y de uno susceptible a patógenos intracelulares, infectados por una cepa de *Mycobacterium bovis* patógena y una cepa apatógena.

## **OBJETIVO PRINCIPAL.**

Identificar y comparar las diferencias existentes en la proporción de macrófagos en apoptosis inducida por cepas de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino y su relación con la resistencia natural a la infección.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

1. Obtener el porcentaje de macrófagos resistentes y susceptibles en reposo y activados en proceso de apoptosis, a diferentes tiempos después de la infección con la cepa patógena de *M. bovis* 9926 y la cepa atenuada de *M. bovis* BCG.
2. Correlacionar el porcentaje de macrófagos en apoptosis con la variable resistencia del huésped y la variable virulencia de la bacteria.

## 2.0 MATERIALES Y METODOS.

### 2.1. Macrófagos derivados de monocitos de bovino (MDMB).

Para el presente estudio se seleccionaron bovinos sanos previamente clasificados como resistentes y susceptibles (Vallecillo, 2003), utilizando los ensayos microbicidas propuestos por Qureshi *et al.* (1996). Los animales cuyos macrófagos *in vitro* permitieron no más del 65% de supervivencia intracelular de *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guerin) se clasificaron *resistentes* y aquellos que permitieron un porcentaje de supervivencia mayor al 65% se clasificaron *susceptibles*. Los animales provenían de un hato libre de tuberculosis (no expuestos, desafiados o vacunados) con constancia expedida por la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR-T-09-0700-0901-007). Este hato pertenece al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, propiedad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La técnica utilizada para la obtención de MDMB, es una modificación del protocolo desarrollado por Campbell y Adams (1992). La sangre se colectó asépticamente por punción yugular, colectándose en jeringas con 3.5 mL de anticoagulante ACD [75 mM de citrato trisódico, 41.6 mM de ácido cítrico, y 135 mM de glucosa; pH 5.0] por cada 30 mL de sangre y se procesó antes de las cuatro horas a partir de la colección. En el laboratorio, la sangre completa se centrifugó durante 30 min a 1000 X *g* a temperatura ambiente (TA). Se apartó el plasma para los lavados y se recuperó la capa flogística. Se diluyó 1:1 con PBS-Citrato (PBS-C) (Cloruro de sodio 1.5 mM, Fosfato de sodio monobásico 9.1 mM, Fosfato de sodio dibásico 1.25 mM, Acido cítrico trisódico 12.5 mM; pH 7.4). Posteriormente, se depositó sobre un gradiente de Percoll (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) (Pertoft H, 2000) con una gravedad específica de 1.0770 (Apéndice 8.2) a una proporción de 2:1 con el Percoll. Se centrifugó a 1000 X *g* durante 25 min a TA y se colectó la interfase de leucocitos libre de eritrocitos. Se lavaron los leucocitos con PBS-C y

20% de plasma y se centrifugaron a 500 X g durante 10 min a TA. Se repitió una vez más el lavado. El paquete celular fue resuspendido en 10 mL de medio CRPMI 1640 (*Complete- Roswell Park Memorial Institute 1640*) (L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM,  $C_3H_3O_3 \cdot Na$  1 mM y  $NaHCO_3$  20 mM) (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, N.Y., EUA) suplementado con 12% de suero sanguíneo autólogo (CRPMI-12%) y se transfirió a un matraz tipo Erlenmeyer recubierto de Teflón (Nalgene, Nalge Nunc International, Naperville, IL, EUA), conteniendo 20 mL de CRPMI sin suero, quedando al final la concentración de suero autólogo de 4% para facilitar la adherencia de los monocitos al fondo del matraz. Se incubaron durante 18 h con atmósfera húmeda y 5% de  $CO_2$  a 37°C. Transcurrido este tiempo, se lavó el fondo del matraz con medio CRPMI, removiendo completamente las células no adheridas. Fueron cultivados con CRPMI-12% en las mismas condiciones antes descritas por 12 días, tiempo en el cual se diferenciaron hacia macrófagos (Campbell y Adams, 1992). Se realizaron lavados con CRPMI con intervalos de 3 días. Por este método, los macrófagos obtenidos se purificaron de otras células. Todos los reactivos y medios utilizados fueron estériles y libres de lipopolisacárido (LPS).

La cosecha de las células se realizó cambiando el medio de cultivo por medio fresco. Posteriormente, los matraces bien cerrados se sumergieron dos terceras partes en abundante hielo picado durante 45 a 60 minutos, se golpearon levemente y se recolectó todo el medio con las células. Se centrifugó a 500 X g a TA durante 10 min y se retiró todo el sobrenadante. Se ajustó la concentración requerida de células en medio CRPMI-12% y se sembraron nuevamente en las cantidades establecidas por ensayo. De tal forma que se obtuvieron MDM de un bovino resistente (MDMB-R) y asimismo, se obtuvieron MDM de un bovino susceptible (MDMB-S) para ser evaluados en el presente estudio.

## **2.2. Inducción de activación de macrófagos.**

Utilizando diferentes concentraciones de extracto puro de LPS de *E. coli* O26:B6 cepa lisa (Sigma, St Louis MO, EUA) (1.0, 10.0 y 100.0 ng/mL), se condujeron ensayos de estimulación de MDMB, partiendo de procedimientos actualmente descritos (Gessani *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1996; Jungi *et al.*, 1999).

La activación de los macrófagos se evaluó por la síntesis del ON, determinada por acumulación de nitrito en el sobrenadante de cultivo y medido a través de la reacción de Griess (Adler *et al.*, 1994; Adler *et al.*, 1995). Los macrófagos fueron incubados con el extracto puro de LPS durante 24 horas. Se tomaron a diferentes tiempos (12, 16, 19, 22 y 24 h) 100µl de sobrenadante libre de células y se mezclaron con 100µl de reactivo de Griess modificado (sulfanilamida 1%, naftil-etilendiamida dihidrocloruro 0.1% y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2.5%) (Sigma, St Louis MO, EUA) en placas de 96 pozos y se incubaron por 15 minutos en la oscuridad. Se utilizó un espectrofotómetro para microplacas (Multiskan Ascent V1.24) y se midió la coloración de la reacción a una densidad óptica de 540 nm de longitud de onda. Para establecer la concentración de NO<sub>2</sub> en las muestras se utilizó una curva de concentración de nitrato de sodio (NaNO<sub>2</sub>) que también se sometió a la misma reacción.

## **2.3. Bacterias.**

Se utilizó *M. bovis* BCG subcepa Danesa donada por la Dra. Iris Estrada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. También se utilizó la cepa 9926 de *M. bovis*, obtenida en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, a partir un bovino proveniente del Estado de México reactor a la tuberculina, con lesiones granulomatosas y sacrificado en septiembre de 1999.

### 2.3.1. Cinética de crecimiento.

Se obtuvo una curva de crecimiento de cada cepa de *M. bovis* para determinar en el tiempo la fase de crecimiento logarítmico medio, considerado como óptimo en la preparación del inóculo.

*M. bovis* fue crecido en medio Middlebrook 7H11 agar (Bacto, Difco Laboratories, Detroit MI, EUA) enriquecido con 10% de OADC (*Oleic acid- Albumin-Dextrose-Catalase*) (BBL Middlebrook OADC Enrichment, Becton Dickinson, Sparks MD, EUA). Se obtuvieron 5 colonias uniformes de 21 días y se sembraron en 30 mL de medio Middlebrook 7H9 (BBL Middlebrook 7H9 Broth Base, Becton Dickinson, Cockeysville MD, EUA) con 10% de OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma, St Louis MO, EUA) en tubos de polipropileno de 50 mL. Se incubaron por 8 días a 37°C con agitación constante de 100 revoluciones por minuto (rpm) en un agitador orbital (Back to basics Orbital Shaker, Bellco Biotechnology, Vineland NJ, EUA). Se transfirieron los 30 mL del cultivo a 270 mL de medio Middlebrook 7H9 con 10% OADC, en un recipiente de poliestireno de 600 mL de capacidad y se mantuvo bajo las condiciones de cultivo antes descritas. En este momento se consideró el día cero de la cinética y se midió con un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb) la absorbancia de una alícuota homogénea de 5 mL del cultivo a una longitud de onda de 650 nanómetros ( $\lambda_{650}$  nm), tomando como calibración basal del refractómetro la medición obtenida de agua bidestilada estéril y como índice de absorbancia una alícuota de medio Middlebrook sin bacterias. Las mediciones se realizaron de la forma descrita una vez cada 24 h durante 21 días. Se graficó el logaritmo de las lecturas de densidad óptica de cada cepa y así se obtuvo la curva de crecimiento. Se realizó una ecuación de regresión no lineal de cada curva para identificar la fase de crecimiento logarítmico medio como el valor LOGEC50.

### 2.3.2. Preparación del inóculo.

Las bacterias se crecieron como se describió en la cinética de crecimiento y se procesaron en la fase logarítmica media de crecimiento. Se centrifugó todo el cultivo en tubos de polipropileno de 50 mL durante 20 min a 2500 X g a TA. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se lavó en medio CRPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, N.Y., EUA). Se centrifugaron a 2500 X g durante 10 minutos a TA. Se realizó un segundo lavado y la pastilla se resuspendió en CRPMI 15 % de SFB. Se disgregaron las bacterias, pasando el cultivo dos veces a través de una aguja de calibre 29 G. Se homogeneizó perfectamente con agitación vigorosa (vórtex) (Mystral Mixer) y se tomaron alícuotas de 1 mL depositándose en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las alícuotas se mantuvieron por 12 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se almacenaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La concentración de Unidades Formadoras Colonias (UFC) del inóculo, se determinó descongelando una alícuota en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min, escogida al azar. Una vez descongelada la alícuota se dispersaron las bacterias pasando el cultivo a través de una aguja calibre 27G, se realizó una serie de diluciones décuples seriadas iniciando a partir de la  $10^{-1}$  hasta la  $10^{-7}$ , observando que los volúmenes fueran lo más exacto posibles. En cada paso se homogeneizó perfectamente con un vórtex. Se sembraron 100  $\mu\text{l}$  por triplicado de cada dilución a partir de la  $10^{-3}$ , en placas de agar Middlebrook 7H11, se incubaron por 21 días y se contaron las UFC. La concentración de UFC por mililitro, se obtuvo por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{CP X FD}}{\text{VolS}} = \text{UFC / ml}$$

Donde:

CP colonias contadas por placa

FD factor de multiplicación correspondiente al factor de dilución (pe.  $10^5$  corresponde a  $10^{-5}$ )

VolS volumen sembrado en mililitros

## **2.4. Infección de macrófagos.**

El inóculo se descongeló de la forma descrita y se centrifugó a 1000 X *g* durante 10 min, se ajustó el volumen de sobrenadante y se obtuvo la concentración deseada de bacterias para la MOI 10:1 (diez bacterias por macrófago). Se pasó a través de aguja 27G, se homogeneizó perfectamente con ayuda de un vórtex y se infectaron los MDMB con *M. bovis* durante cuatro horas. Posteriormente, se lavaron 3 veces con medio CRPMI, se les añadió medio CRPMI-12% y se incubaron nuevamente por tiempos determinados hasta su evaluación. Al final de la incubación, los macrófagos se lavaron con PBS tres veces y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 4 h.

Para la evaluación de condensación de cromatina, se infectaron  $2 \times 10^5$  macrófagos sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences, Washington PA, EUA) dentro de cajas de petri de 35 mm (Falcon, Lincoln Park, New Jersey, EUA) o cajas de polipropileno de 24 pozos (Nunclon, Nunc Brand products, Nalge Nunc International, Denmark Dinamarca). Para la evaluación de fragmentación de ADN se infectaron  $2 \times 10^6$  macrófagos dentro de matraces recubiertos de teflón. Se conservaron macrófagos sin infectar bajo las mismas condiciones como testigos de no infección en cada caso.

## **2.5. Detección de apoptosis.**

La determinación de células en apoptosis se realizó mediante: 1. la condensación de la cromatina visualizada con la tinción de yoduro de propidio (PI) y 2. la fragmentación en una o ambas cadenas de ADN nuclear, efectuada por las enzimas ADNasas activadas durante la apoptosis, que se detectó con la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end-labeling*) (Negoescu *et al.*, 1997; Lecoeur, 2002). Los cortes en la porción 3' (OH)

se marcaron con nucleótidos conjugados con Bromo, adicionados mediante la acción específica de la enzima nucleotidil transferasa terminal (TdT). Posteriormente, los nucleótidos se revelaron con anticuerpos monoclonales anti-Bromo conjugados con fluoresceína (FITC).

Adicionalmente, se usó un grupo control positivo de macrófagos en apoptosis inducidos con camptotecina (10 $\mu$ g/mL durante 72 h) (Sigma, St Louis, MO) para facilitar la identificación de las características apoptóticas de las células bovinas (Häcker, 2000; Gutiérrez-Pabello *et al.*, 2002). Asimismo, se usó un grupo control negativo sin tratamiento de células cultivadas bajo las condiciones descritas, lo cual facilitó diferenciar las características morfológicas de tamaño y granularidad e identificar el límite de discriminación con respecto a las células apoptóticas en el uso de la citometría de flujo.

### **2.5.1. Condensación de cromatina (CCr).**

Al final de la incubación de 8, 16 y 24 h post-infección (pi), los macrófagos se lavaron con PBS tres veces y se fijaron con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, FT Washington, PA) al 4% en PBS durante 40 min a 4°C, al igual que las células testigo. Después, se lavaron tres veces con agua destilada y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% (Sigma, St Louis, MO) en agua destilada durante 5 minutos. Se lavaron nuevamente con agua destilada y se tiñeron con 500  $\mu$ l de ioduro de propidio (5 $\mu$ g/mL con 150 $\mu$ g/mL de ribonucleasa A) (Sigma, St Louis, MO) durante 45 minutos en la oscuridad. Se realizaron lavados por tres ocasiones con agua destilada previa y posteriormente a la tinción y se dejaron secar al aire. Se montaron los cubreobjetos utilizando medio de montaje Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, EUA) sobre portaobjetos de vidrio, con las células en dirección del portaobjetos. Se visualizaron las células con microscopio de epifluorescencia (Leica Microstar IV, Leica Microsystems, Wetzlar Alemania) con luz ultravioleta usando un filtro de

emisión para más de 600 nanómetros de longitud de onda. En cada evaluación, se contaron un mínimo de 200 células por triplicado de cada réplica y se obtuvo el promedio y error estándar en porcentaje de los núcleos con la cromatina condensada.

### **2.5.2. Fragmentación del ADN nuclear (FADN).**

Al final de la incubación de 16 y 24 h pi, los macrófagos fueron lavados por dos ocasiones con PBS y fijados con 5 mL de paraformaldehído al 1% en PBS durante 30 min a 4°C en tubos de poliestireno de 12 x 75 mm (Falcon Test Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), al igual que las células testigo. Posteriormente, se conservaron en etanol 70% por un mínimo de 12 h a -20°C y después se lavaron tres veces con PBS. Se realizó la técnica de TUNEL con el Kit APO-BrdU (Pharmingen, San Diego, CA EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante y lo descrito por otros autores (Klinger *et al.*, 1997; Keane *et al.*, 1997; Gutiérrez-Pabello *et al.*, 2002). Se añadieron 50 µL de la solución de marcaje de ADN (10 µL de búfer de reacción, 0.75 µL de enzima TdT, 8 µL de Bromo-dUTP's y 32.25 µL de agua destilada) y se incubaron a 37°C durante 60 min en un baño María agitando cada 15 minutos. Se agregaron 500 µL de búfer de enjuague al final de la incubación y se retiró el sobrenadante después de centrifugar a 300 x g durante 5 min. Se repitió una vez más el lavado y después se agregaron 100 µL de solución de anticuerpo (5 µL de anticuerpo anti-Bromo conjugado con fluoresceína y 95 µL de búfer de enjuague) y se incubó por 30 min en la oscuridad a TA. Al final de la incubación se contaron las células con un citómetro de flujo (EPICS, Altra y Facs Calibur, Becton Dickinson) analizando 1 X 10<sup>4</sup> células por muestra como mínimo. Todas las células fueron teñidas en presencia y ausencia de la enzima TdT como control negativo de la técnica. Las células en apoptosis fueron teñidas con fluoresceína. Los parámetros usados para la fluorescencia fueron: excitación a 488 nm de longitud de onda ( $\lambda$ ); medición de emisión de la fluoresceína (fluorescencia verde) 530  $\pm$  20 nm de  $\lambda$ . La identificación de células

en apoptosis se basó en su marcaje de fluorescencia verde sobre un histograma de frecuencias, lo cual requiere el uso de una escala exponencial para obtener y presentar los datos (Darzynkiewicz *et al.*, 1999).

## **2.6. Análisis estadístico.**

Cada experimento se realizó por más de una ocasión en forma independiente y por triplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar en porcentaje de apoptosis. Las comparaciones entre las medias se evaluaron con la prueba *t* de Student para el contraste de hipótesis entre pares de medias y con la Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey después del análisis de varianza (ANDEVA) factorial para contraste de hipótesis de más de dos medias. El valor de  $\alpha$  se fijó en 0.05 todos los casos (Daniel, 1980; Steel y Torrie, 1985) y se utilizó el programa de cómputo SAS System for Windows versión 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

### **3.0 RESULTADOS.**

#### **3.1. Macrófagos derivados de monocitos de bovino (MDMB).**

Se obtuvieron macrófagos derivados de monocitos (MDM) de un bovino fenotípicamente resistente (MDMB-R) a patógenos intracelulares, que permitió el crecimiento de *M. bovis* BCG en el macrófago cercano al 64% y de un bovino fenotípicamente susceptible (MDMB-S), que permitió el crecimiento intracelular del bacilo más allá de 100%. La viabilidad de los macrófagos fue mayor al 90%, confirmado por la exclusión del azul de Tripán. Las características morfológicas de los macrófagos y los niveles de producción de óxido nítrico (ON) detectadas en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos, correspondieron al estado de reposo.

#### **3.2 Activación de macrófagos.**

Las concentraciones de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos, además del agrandamiento, la elongación de pseudópodos y la incrementada granularidad intracitoplásmica de los macrófagos estimulados con las concentraciones de 1.0, 10.0 y 100.0 ng/mL de LPS, mostraron diferencias significativas entre sí a partir de las 12 horas de incubación y asimismo, con respecto a los macrófagos sin LPS. La concentración de  $\text{NO}_2$  incrementó hacia las 24 horas de cultivo de macrófagos con el LPS, siendo aún más significativas las diferencias encontradas (Figura 3.2.1). En consecuencia, se estableció la concentración mínima de 10 ng/mL de extracto puro de LPS, durante 22 h de cultivo para la activación de los MDMB.

#### **3.3. Bacterias.**

Se prepararon los inóculos de ambas cepas de *M. bovis* BCG subcepa Danesa y *M. bovis* 9926, ajustado a UFC/ml. El tiempo óptimo de cultivo de *M. bovis* para congelado del inóculo fue de 5 días para la cepa BCG y de 13 días para la cepa 9926, según los valores LOGEC50 de la ecuación de regresión no lineal para cada

cepa de *M. bovis* (Apéndice 1.1). Esta ecuación se realizó con la curva de cinética de crecimiento de cada cepa (Figura 3.3.1). Esta cinética se repitió cinco veces en forma independiente con resultados similares. Por lo tanto, la preparación y congelación del inóculo de la cepa de *M. bovis* BCG se realizó el día 4 de cultivo y de la cepa de *M. bovis* 9926 el día 11, días en que se encontraron aún ambas cepas en fase de crecimiento logarítmico.

### **3.4. Apoptosis en macrófagos de bovino inducida por *Mycobacterium bovis*.**

El desafío con *M. bovis* BCG subcepa Danesa (atenuada) y 9926 (virulenta) (MOI 10:1), indujo la condensación de cromatina de las poblaciones de MDMB (susceptibles y resistentes). Cabe destacar que en los macrófagos infectados, se presentó la CCr tanto en macrófagos con bacilos localizados intracelularmente, como de macrófagos sin bacilos aparentes. Además, el número de macrófagos con CCr fue mayor en los infectados que en los macrófagos testigo sin desafiar (Figura 7.3).

En el caso de MDMB testigo (sin infección) en estado de reposo, el porcentaje de células con CCr, se mantuvo en todos los tiempos de evaluación por debajo del 8% en ambas poblaciones celulares (MDMB-S y MDMB-R). En cambio, las mismas células testigo pero activadas, presentaron porcentajes por debajo del 24% desde el inicio y hacia el final del tiempo de evaluación (24 h pi) (Cuadro 3.4.1). Estos porcentajes de CCr observados en las células sin infectar en reposo y activadas, se tomaron como basales respectivamente y se consideraron originados por condiciones propias del estudio.

Por el contrario, en todas los MDMB infectados con *M. bovis*, el porcentaje de células con CCr tuvo un incremento muy significativo en consecuencia a la infección con *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ) y con *M. bovis* 9926 ( $p < 0.001$ ) con respecto

de los testigos (Cuadro 3.4.1 y Figura 3.4.2). Tanto *M. bovis* 9926 (virulento) como el *M. bovis* BCG (atenuado), indujeron un gran porcentaje de macrófagos de ambos animales a sufrir apoptosis, siendo significativo a partir de las 8 h y hasta las 24 h pi. Además, se observó una tendencia de incremento a través del tiempo, tanto en los macrófagos en estado de reposo como en los activados, como se destaca en la Figura 7.4. Sin embargo, en los desafíos con ambas cepas de *M. bovis*, fueron los MDMB-R tanto en estado de reposo como activados, los que presentaron el mayor porcentaje de muerte celular, comparado con aquel mostrado por los MDMB-S. Asimismo, es importante subrayar que *M. bovis* cepa 9926 indujo en ambos casos la mayor proporción de las poblaciones de macrófagos a morir por apoptosis, con respecto de la cepa atenuada. Diferencia que se conservó durante las 8, 16 y 24 h pi de evaluación. (Cuadro 3.4.1 y Figura 3.4.2).

El LPS por sí solo fue capaz de promover la apoptosis en macrófagos de bovino. Se observó un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en el porcentaje de macrófagos testigo con CCr estimulados con esta molécula, con respecto a las que no fueron estimulados (comparar de la Figura 3.4.2, las barras testigo – NO - de paneles A y B contra las barras testigo de paneles C y D respectivamente). La posibilidad de que tanto *M. bovis* BCG como *M. bovis* 9926, indujeran o reprimieran la apoptosis de macrófagos activados no se descartaba. Por esta razón, se registró el porcentaje de apoptosis pi con *M. bovis* 9926 y con *M. bovis* BCG en MDMB-R o MDMB-S, previamente activados con LPS. El porcentaje de muerte celular en respuesta a la infección, se notó significativamente incrementado por *M. bovis* 9926 ( $p < 0.05$ ) y por *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ), con excepción de los MDMB-S a las 8 h pi y en los MDMB-R a las 16 h pi con 9926 en cuanto a condensación de cromatina (Cuadro 3.4.1), conservándose la misma tendencia de incremento con respecto al tiempo, al fenotipo susceptible o resistente de macrófagos y a la virulencia bacteriana detectada en macrófagos en reposo. Sin embargo, al final del tiempo de evaluación (24 h pi), las diferencias observadas entre macrófagos

activados no se mostraron ni con *M. bovis* 9926 o *M. bovis* BCG, ni entre fenotipos susceptible o resistente, como se mostraron en macrófagos en reposo (Cuadro 3.4.1 y Figura 3.4.2).

A fin de que los resultados obtenidos se confirmaran como muerte celular programada inducida por *M. bovis*, también se evaluó la fragmentación de ADN nuclear con la técnica de TUNEL. El desafío con *M. bovis* 9926 o con *M. bovis* BCG (MOI 10:1), también indujo la fragmentación de ADN en ambas poblaciones de MDMB (susceptibles y resistentes) (Figura 3.4.3), confirmando los resultados obtenidos por CCr.

Las diferencias observadas anteriormente entre los porcentajes de apoptosis generada tras la infección con ambas cepas de *M. bovis*, se apreciaron de igual manera al detectar los cortes de ADN. Igualmente, la interacción entre la cepa 9926 (virulenta) y la población de MDMB-R activados, mostró la mayor proporción de macrófagos en apoptosis postinfección, mientras que la interacción entre la cepa BCG (atenuada) y la población de MDMB-S en reposo, presentó la menor proporción de apoptosis por FADN. Similarmente, el porcentaje de apoptosis se incrementó con el tiempo con *M. bovis* 9926 y con *M. bovis* BCG en macrófagos susceptibles (MDMB-S) y resistentes (MDMB-R) y fueron los MDMB-R los más propensos a sufrir apoptosis comparados con los MDMB-S. Paralelamente, *M. bovis* cepa 9926 (virulenta) indujo más apoptosis que *M. bovis* BCG (atenuada) y el estado de activación de los macrófagos influyó positivamente en la presentación de apoptosis con respecto al de macrófagos en reposo (Figura 3.4.4). Sin embargo, a pesar de que se mostraron las mismas tendencias ya mencionadas, es conveniente resaltar que el porcentaje de todas los macrófagos con FADN después de la infección con *M. bovis* (realizada bajo las mismas condiciones en todos los casos), fue substancialmente menor que el presentado por macrófagos con CCr.

Por otra parte, la producción de ON por los MDMB incrementó significativamente con el tiempo debido a la estimulación con LPS (Figura 3.2.1) y además, los MDMB-R produjeron significativamente ( $p < 0.001$ ) más ON que los MDMB-S (datos preliminares). Este comportamiento coincide con la manifestación de la muerte celular programada de los macrófagos que se infectaron en reposo y se intensifica en aquellos infectados en donde se realizó la activación previa con LPS.

## 4.0 DISCUSIÓN.

La respuesta a microorganismos patógenos por parte del hospedero están dadas por complejos mecanismos de defensa. Estos incluyen mecanismos físicos e inespecíficos con la participación de células fagocíticas. La apoptosis se ha observado en el curso de infecciones por micobacterias y por agentes infecciosos en fagocitos mononucleares (Fettucciari *et al.*, 2000). En este estudio se analizó la apoptosis en macrófagos derivados de monocitos de bovino (MDMB) inducida por *Mycobacterium bovis*. Se buscó una asociación entre el fenotipo del hospedero de resistencia natural a la infección y la inducción de apoptosis, involucrando la virulencia de la bacteria y el efecto del estado funcional de la célula al momento de ser infectada.

En el presente trabajo se observó la inducción de apoptosis de macrófagos derivados de monocitos de bovino (MDMB) por *M. bovis*. Este evento anteriormente había sido señalado. Gutiérrez-Pabello *et al.* (2002), desafiaron MDM de un sólo bovino con una cepa de campo de *M. bovis* (cepa El Paso) a diferentes MOI (1:1, 10:1 y 25:1) y evaluaron la condensación de cromatina y la fragmentación del ADN de éstas células a diferentes tiempos post-infección (desde cero hasta 24 horas). Estos autores evidenciaron con la misma MOI que la utilizada en este estudio (10:1), porcentajes entre 15 y 35% de las células con CCr a partir de las 12 y hacia las 24 h pi, respectivamente. Con respecto a la FADN, presentaron porcentajes muy bajos (hasta 1.4%) con esta MOI, los cuales se incrementaron (cerca de 26%) con 25 bacilos por célula hacia las 8 h pi. Las diferencias notables entre ambos estudios, sugieren que pudieron ser debidas a las cepas de campo de *M. bovis* utilizadas. Ambas cepas de campo son distintas y además los autores no utilizaron *M. bovis* BCG. Otra importante diferencia es que ellos únicamente usaron macrófagos en reposo de un animal no caracterizado fenotípicamente como resistente o susceptible a la infección. Sin embargo, sus

resultados sentaron las bases este estudio que contribuyó a los resultados similares en relación al tiempo de presentación de la apoptosis.

En el presente análisis, la apoptosis se dio por medio de la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, lo que sugiere la posible participación de caspasas actuando sobre el CAD (Nagata, 2000), el *acinus* (Sahara *et al.*, 1999), o algunos otros factores ubicados por debajo del flujo de su acción (Samejima *et al.*, 1998). Sin embargo, con la participación del AIF por ejemplo, pudo haberse llevado a cabo sin la participación total de caspasas (Susin *et al.*, 1999).

La evidencia más importante de este trabajo, que señala a la apoptosis como un mecanismo de resistencia natural del hospedero, es la diferencia significativa entre la población de macrófagos provenientes de un bovino resistente y de uno susceptible a patógenos intracelulares. La población de MDMB-R fue siempre la que presentó mayor grado de apoptosis, por encima de la población de MDMB-S en todos los casos. Estas observaciones concuerdan con los resultados de Rojas *et al.* (1997). Estos autores registraron la inducción de apoptosis por *M. tuberculosis* en macrófagos de ratón resistentes (B10R) y susceptibles (B10S) congénicos al gene *Nramp1*, en forma tiempo dependiente, la cual estuvo directamente relacionada con la producción de ON. Los macrófagos B10R fueron más propensos a sufrir apoptosis que los B10S. Asimismo, la producción de ON fue mayor en estos macrófagos (B10R) (Arias *et al.*, 1997), como se observó en esta investigación en los macrófagos provenientes del bovino resistente comparado con los del bovino susceptible al estimularse con LPS (datos preliminares).

Los macrófagos llegan a ser activados por señales presentes en el microambiente inmediato durante la primoinfección, la reactivación clínica o durante la cronicidad, al contenerse la infección en granulomas. Entre las citocinas mejor conocidas en el disparo de esas señales son el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ . En un intento por reproducir el

sistema de activación de macrófagos durante la patogenia de la tuberculosis, se utilizó LPS de *E. coli* y se midió el incremento en la producción de ON, como un marcador de activación. Después de la estimulación con LPS, los MDMB lograron activarse, como lo evidenció su morfología y la producción de ON (Figura 3.2.1), apegadas a lo descrito por Jungi *et al.* (1996a).

La activación de los macrófagos con LPS, previa a la infección con la cepa atenuada y la cepa virulenta de *M. bovis*, contribuyó a la apoptosis resultando en el incremento del número de macrófagos muertos por este mecanismo. La producción *de novo* del ON, es un signo principal que caracteriza a la activación de macrófagos y se sabe que la responsable de ésta producción es la iNOS (Adler *et al.*, 1994a; 1994b y 1995), misma enzima que se ha involucrado en la inducción de apoptosis de macrófagos murinos (Sarih *et al.*, 1993). El uso de LPS en los ensayos de activación del presente estudio, indujo la producción muy similar de ON en MDMB-R y MDMB-S incubados con ésta molécula y no así en MDMB sin ella y además, por sí sola, provocó porcentajes de apoptosis en MDMB-R y MDMB-S, sin haber presentado diferencias significativas entre ellos (Cuadro 3.4.1 y Figura 3.4.2). Durante los ensayos de inducción de apoptosis para obtener grupos testigo positivos, el uso de camptotecina tuvo un efecto similar en el número de MDMB-R y MDMB-S con fragmentación de ADN, descartando la posibilidad de cinéticas desiguales en la inducción de apoptosis entre ambas poblaciones. Sugiriendo que esos macrófagos son igualmente sensitivas al estímulo de un mismo inductor de apoptosis como la camptotecina y a los efectos del ON.

Tomando juntos estos resultados, fuertemente sugieren que la apoptosis en MDMB infectados con *M. bovis*, son una consecuencia de los efectos del ON. Esta molécula ha sido reconocida como tóxica pues genera ruptura del ADN y de proteínas (Albina *et al.*, 1998) y además, participa en la señalización que conduce a la apoptosis por estrés (MacMicking *et al.*, 1997b; Chen *et al.*, 1998) y también

en macrófagos que contienen micobacterias (Klinger *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1997 y 1998). El ON también afecta al proteosoma de p53 (proteína supresora de tumores) favoreciendo la acumulación y persistencia de ésta (Glockzin *et al.*, 1999), reconocida como un factor pro-apoptótico (Jonson *et al.*, 1996). También se han observado activación de caspasas y alteraciones en la expresión de miembros de la familia Bcl-2 inducidas por el ON (Glockzin S, *et al.*, 1999), como sucede en la infección por *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Klinger *et al.*, 1997). Además, el ON y sus derivados metabólicos son capaces de inducir daño mitocondrial (MacMicking *et al.*, 1997b) y consecuentemente inducir apoptosis (Hortelano *et al.*, 1999). En la infección de macrófagos de humano con *M. tuberculosis*, se ha descrito la presencia de apoptosis involucrando la transición de la permeabilidad de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c, correspondiendo todo este cuadro con actividad anti micobacterial efectiva. En contraste, la ruptura de la integridad de membrana mitocondrial y como consecuencia la altamente incrementada activación de caspasas, concordaron con la presencia de necrosis y la replicación incontrolable de *M. tuberculosis*. El influjo de Ca<sup>2</sup> intramitocondrial determinó la ruta hacia apoptosis o necrosis por *M. tuberculosis* (Duan *et al.*, 2002). Anteriormente había sido descrito el papel del Ca<sup>2</sup> en la apoptosis inducida por *M. tuberculosis* en macrófagos de ratón (Rojas *et al.*, 2000). En cuanto al papel del TNF- $\alpha$  en la apoptosis de macrófagos de humano inducida por *M. tuberculosis*, ha sido descrito (Keane *et al.*, 1997). Posteriormente en el modelo del ratón, se investigó la apoptosis de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* junto con la producción de ON, de p53 y de la activación de caspasa 1 y se reconoció que el TNF- $\alpha$  al igual que la IL-10, participan en la modulación de la apoptosis inducida por *M. tuberculosis* (Rojas *et al.*, 1999). Esta modulación había sido adjudicada a *M. tuberculosis* como un mecanismo de evasión de apoptosis en macrófagos de humano, inducido por cepas patógenas (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998). Cabe señalar que la apoptosis de macrófagos inducida por *M. tuberculosis*, requiere de la activación de la fosfolipasa citosólica A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), en donde al parecer la capacidad de producir ácido araquidónico hace

susceptibles a éstos macrófagos a la acción del TNF- $\alpha$  (Wissing *et al.*, 1997). Por otra parte en el modelo bovino, la expresión de TNF- $\alpha$  se ha visto elevada en monocitos de médula ósea de bovino, después de la estimulación con LPS (Adler *et al.*, 1994), asimismo, se ha registrado que induce elevada producción de ON en macrófagos alveolares de bovino (Mason *et al.*, 1996). Toda esta evidencia, sugiere en el presente estudio que a pesar de que se estimule la producción de ON, es necesario que se activen otras señales para que se lleve a cabo la apoptosis. Por lo que el macrófago, se debe tornar muy sensible a estas señales al ser infectado por la micobacteria. Esto posiblemente es debido a una señal disparada por la presencia intracelular de la micobacteria viva (Plácido *et al.*, 1997).

El ON también puede afectar la actividad de *M. tuberculosis*, modificando proteínas y lípidos de la superficie bacteriana y también puede deaminar y dañar directamente el ADN bacteriano generando ausencias de bases y cortes de cadena (Chan *et al.*, 2001), habiendo demostrado ser un buen candidato en la inhibición del crecimiento y en la eliminación de la micobacteria (Chan *et al.*, 1995; Arias *et al.*, 1997; MacMicking *et al.*, 1997; Mohan *et al.*, 2001), incluyendo a *M. bovis* virulento (Aldwell *et al.*, 1997) y a *M. bovis* BCG (Bekker *et al.*, 2001).

Las principales diferencias encontradas en este estudio con respecto a modelos concernientes a la inducción de apoptosis de macrófagos de origen humano y murino por *M. tuberculosis*, se explican en parte por las diferencias entre *M. bovis* y este patógeno (Brosch *et al.*, 1998 y 1999). Asimismo, la diferencia en la intensidad de apoptosis observada entre *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926, es debida a la habilidad de inducir apoptosis relacionada con la virulencia. *M. bovis* BCG subcepa Danesa, es una cepa atenuada que tiene por lo menos 70 años de manipulación (Behr y Small, 1999) y está adaptada a las condiciones de laboratorio, efecto que se observó en medio Middlebrook 7H9, donde mostró mayor velocidad de crecimiento que la cepa de campo 9926 (Figura 3.3.1).

Particularmente, el *M. bovis* virulento (9926) fue capaz de inducir el mayor índice de apoptosis, entre tanto *M. bovis* BCG indujo menos muerte programada en los MDMB. A pesar de que posteriormente a la infección (0 horas) y 24 h después, se encontraron más bacilos de la cepa 9926 por célula que de la cepa BCG subcepa Danesa, la fagocitosis entre ambas poblaciones celulares fue muy similar para ambas cepas (Vallecillo, 2003). Conjuntamente, el grado de apoptosis correspondió con la cantidad intracelular de bacilos, por lo tanto, se pudo generar un mayor estrés intracelular por la cepa virulenta que por la cepa atenuada, produciendo la marcada diferencia entre cepas. Lo cual exenta la explicación de que las diferencias encontradas entre los MDMB-R y MDMB-S, son debidas a su capacidad de fagocitar a *M. bovis*. Sugiriendo que la pérdida en la viabilidad celular está relacionada a la virulencia de la micobacteria. Estos resultados, concuerdan con lo apuntado por otros autores (Rojas *et al.*, 1997), en donde *M. tuberculosis* H37Ra indujo menor muerte y producción de ON que *M. tuberculosis* virulento (H37Rv), pero mayor que *Mycobacterium chelonae* y otras bacterias del mismo género (*M. kansasii*, *M. fortuitum* y *M. goodii*), en macrófagos de ratón. Además, entre ese y el presente estudio concuerdan los tiempos de presentación del fenómeno, ocurriendo dentro de las 24 horas posteriores a la infección. No obstante, se ha presentado información sobre macrófagos de humano en donde contrariamente a lo observado en los de ratón, *M. tuberculosis* H37Rv (virulento) induce menos apoptosis que la cepa H37Ra (atenuada), en macrófagos alveolares de humano, aunque se desconoce el fenotipo de resistencia o susceptibilidad de los individuos utilizados para este trabajo (Keane *et al.*, 1997). Concordando con otro estudio, en donde cepas virulentas de *M. tuberculosis* (H37Rv, Erdman, y BMC 96.1 –aislado clínico-) y una cepa tipo de *M. bovis*, indujeron significativamente menor apoptosis que bacilos avirulentos o atenuados (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG y *M. kansasii*), presentándose el evento en los primeros días subsiguientes a la infección en ambos estudios (Keane *et al.*, 2000).

Aunque aún no se tiene evidencia experimental, el presente estudio soporta la hipótesis de que la apoptosis representa un mecanismo de defensa a la infección con microorganismos intracelulares, como se ha propuesto por otros autores (Molloy, *et al.*, 1993 y 1994; Kornfeld *et al.*, 1999). Además, se ha descrito que la apoptosis reduce las consecuencias de la inflamación (Stenger y Modlin, 2002) y apoya la respuesta inmune protectora al encerrar a los patógenos en cuerpos apoptóticos, pudiendo ser ingeridos por macrófagos en reposo a través de su CD14 (Devitt *et al.*, 1998; Gregory y Devitt, 1999) y presentar antígenos derivando en la inducción de respuestas inmunes adaptativas. Aunque, los cuerpos apoptóticos también pudieran ser fagocitados con mayor propensión por macrófagos activados, que liberan activamente glicoproteína MFG-E8 (Hanayama *et al.*, 2002), procediendo a la destrucción bacteriana.

Basándose en los presentes resultados y en las observaciones de otros autores, es posible concebir un mecanismo teórico para la inducción de apoptosis de macrófagos de bovino por la infección intracelular de *M. bovis*. Los productos de la micobacteria virulenta viva, siendo posiblemente mayores o diferentes que los de la atenuada, pueden predilectamente inducir la producción de TNF- $\alpha$  con la sucesiva inducción de iNOS y la producción de grandes cantidades de ON y asimismo, estos productos pueden modular las moléculas involucradas en la regulación de la apoptosis, como miembros de la familia Bcl-2, siendo capaces de causar el daño en el DNA y consumir la apoptosis. Por otro lado, las diferencias correspondientes al fenotipo de resistencia o susceptibilidad natural, manifiestan el resultado de una mayor producción de TNF- $\alpha$ , derivando en un mayor estímulo de iNOS y consecuentemente mayor producción de ON en MDMB-R. Mientras que este cuadro, se ve parcialmente disminuido en los MDMB-S por la acción de la IL-10, siendo posiblemente mayor su producción en esta población celular.

La dinámica recreada entre los mecanismos de virulencia del bacilo y los mecanismos de resistencia a la infección por parte del fagocito, se ve reflejada en el evento aquí estudiado (apoptosis), presentándose como una alternativa del

repertorio de respuestas en las que culmina esta dinámica, como sería la eliminación del bacilo o la latencia y/o persistencia del mismo. La activación celular previa a la infección, involucrando la participación del ON, favoreció el incremento de apoptosis. Por lo tanto, estos resultados postulan como muy importante el papel de esta molécula en la apoptosis inducida por *M. bovis*. Lo cual abre el camino para explorar esta teoría y aportar datos más contundentes de esta contribución.

## 5.0 CONCLUSIONES.

1. El grado de apoptosis fue diferente entre el fenotipo de macrófagos resistente y susceptible y entre *M. bovis* 9926 y *M. bovis* BCG.
2. La activación de los macrófagos de bovino resistentes y susceptibles con LPS de *E. coli* favoreció la inducción de apoptosis por *M. bovis* 9926 y *M. bovis* BCG subcepa Danesa.
3. *M. bovis* 9926 indujo el mayor grado de apoptosis tanto en macrófagos susceptibles como en macrófagos resistentes de bovino.
4. Los macrófagos resistente presentaron mayor grado de apoptosis tanto con *M. bovis* 9926 como con *M. bovis* BCG.
5. La Apoptosis es un fenómeno notable en la interacción *M. bovis*-macrófago y aunado al factor de resistencia natural a la infección, nuestros resultados indican que posiblemente sea un elemento importante en la patogenia de la tuberculosis al participar en la eliminación de la micobacteria.

## 6.0. REFERENCIAS.

1. Adler H, Peterhans E, Jungi TW. Generation and functional characterization of bovine bone marrow-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 41:211-227.a
2. Adler H, Peterhans H, Nicolet J, Jungi TW. Inducible L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in bovine bone marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198:510-515.b
3. Adler H, French B, Thöny M, Pfister H, Peterhans H, Jungi TW. Inducible nitric oxide in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *J Immunol* 1995; 154:4710-4718.
4. Aggarwal BB. Apoptosis and Nuclear Factor- $\kappa$ B: a tale of association and dissociation. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60:1033-1039.
5. Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17:39-53.
6. Aldwell FE, Wedlock DN, Buddle BM. Sequential activation of alveolar macrophages by IFN-gamma and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M. bovis* BCG. *Immunol Cell Biol.* 1997; 75:161-166.
7. Alliprantis AO. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like Receptor-2. *Science*, 1999; 285:736-739.
8. Amarante-Méndez GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz Jour Med Biol Res* 1999; 32:1053-1061.
9. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family killer-proteins and their victim, the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001; 306:347-361.
10. Arias M, Rojas M, Zabaleta J, Rodriguez JI, Paris SC, Barrera LF, Garcia LF. Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg(r) and Bcg(s)

- macrophages correlates with nitric oxide production. *J Infect Dis* 1997; 176:1552-1558.a
11. Arias M, Zabaleta J, Rodriguez JI, Rojas M, Paris SC, Garcia LF. Failure to induce nitric oxide production by human monocyte-derived macrophages. Manipulation of biochemical pathways. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1997; 25:280-288.b
  12. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold H. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 1998; 161:6236-6241.
  13. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17:915-922.
  14. Bekker L, Freeman S, Murray PJ, Ryffel B, Kaplan G. TNF- $\alpha$  controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *J Immunol* 2001; 166:6728-6734.
  15. Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C, Barrell BG, Cole ST. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect Immun* 1998; 66:2221-2229.
  16. Brosch R, Philipp WJ, Stavropoulos E, Colston MJ, Cole ST, Gordon SV. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect Immun* 1999; 67:5768-5774.
  17. Brosch R, Gordon SV, Marmiese M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:3684-3689.

18. Campbell GA and Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 34:291-305.
19. CEA (Centro de Estadística Agropecuaria). Resumen nacional. Producción Ganadera, Avícola y Apícola. Centro de Estadística Agropecuaria. Secretaría de Ganadería y Desarrollo Rural. México, 1999.
20. Chan ED, Chan J, Schluger NW. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:606-612.
21. Chan J, Tanaka K, Carrol D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995, 63:736-740.
22. Chen L, Xie QW, Nathan C. Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Mol Cell* 1998; 1:795-805.
23. Dalton D, Haynes L, Chu CQ, Swain S. Interferon  $\gamma$  eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med* 2000; 192:117-122.
24. Daniel Wayne W. Bioestadística. Limusa. México, 1980.
25. Dannenberg AM, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating responses- Dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994:459-483.
26. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X. Analysis of cell death by flow and laser-scanning cytometry. In: Studzinski GP. *Apoptosis: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1999:67-74.

27. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998; 392:505-509.
28. DGSA. Situación zoonositaria de los diferentes estados del país. Boletín julio 2001. Dirección General de Sanidad Animal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, 2001.
29. Duan L, Gan H, Remold HG. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> participates with TNF- $\alpha$  in the induction of apoptosis of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Immunol* 2001; 166:7469-7476.
30. Duan L, Gan H, Golan DE, Remold HG. Critical Role of Mitochondrial Damage in Determining Outcome of Macrophage Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002; 169:5181-5187.
31. Dürbaum-Landmann I, Gercken J, Flad HD, Ernst M. Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect Immun* 1996; 64:5384-5389.
32. Enari M, Sakahira H, Yokohama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43-50.
33. Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim, S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1997; 65:5149-5156.
34. Fettuciari K, Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Migliorati G, Sabatini R, Fettriconi I, Rossi R, Marconi P. Group B *Streptococcus* induces apoptosis in macrophages. *J Immunol* 2000; 165:3923-3933.
35. Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Remold HG. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4 infected macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 1997; 158:4320-4327.

36. Gessani S, Testa U, Varano B, Di Marzio P, Borghi P, Conti L, Barberi T, Tritarelli E, Martucci R, Seripa D, Peschle C, Belardelli F. Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J Immunol* 1993; 151:3758-3766.
37. Glockzin S, von Knethen A, Scheffner M, Brüne B. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *J Biol Chem*, 1999; 274:19581-19586.
38. Goerdts S, Politz O, Shledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klembe CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 1999; 67:222-226.
39. Gregory CD, Devitt A. CD14 and apoptosis. *Apoptosis* 1999; 4:11-20.
40. Gutiérrez-Pabello JA, McMurray DN, Adams LG. Upregulation of thymosin  $\beta$ -10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infect Immun* 2002; 70:2121-2127.
41. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 2000; 301:5-17.
42. Häcker G, Fischer SF. Bacterial anti-apoptotic activities. *FEMS Microbiology Letters* 2002; 211:1-6.
43. Hamerman JA, Aderem A. Functional transitions in macrophages during in vivo infection with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. *J Immunol* 2001; 167:2227-2233.
44. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002; 417:182-187.
45. Hirsch CS, Toossi Z, Vanham G, Johnson JL, Peters P, Okwera A, Mugerwa R, Mugenyi P, Ellner JJ. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1999; 179:945-953.

46. Hortelano S, Alvarez AM, Boscá L. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J*, 1999; 13:2311-2317.
47. INEGI-SSA. Principales Causas de Mortalidad General. Dirección General de Estadística e Informática, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática- Secretaría de Salud. México, 1999.
48. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11848-11852.
49. Jungi TW, Adler H, Adler B, Thony M, Krampe M, Peterhans E. Inducible nitric oxide synthase of macrophages. Present knowledge and evidence for species-specific regulation. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 54:323-330.a
50. Jungi TW, Thony M, Breic M, Adler B, Pauli U, Peterhans E. Induction of nitric oxide synthase in bovine mononuclear phagocytes is differentiation stage-dependent. *Immunobiology* 1996; 195:385-400. b
51. Jungi TW, Valentin-Weigand P, Breic M. Differential induction of NO synthesis by Gram-positive and Gram-negative bacteria and their components in bovine monocyte-derived macrophages. *Microb Pathog* 1999; 27:43-53.
52. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997; 65:298-304.
53. Keane J, Remold H, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *Journal of Immunology* 2000; 164:2016-2020
54. Klinger K, Tchou-Wong KM, Brändli O, Aston C, Kim R, Chi C, Rom WN. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 1997; 65:5272-5278.

55. Kornfeld H, Mancino G, Colizzi V. The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell Death Differ* 1999; 6:71-78.
56. Lecoœur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence on endogenous endonucleases. *Exp Cell Res* 2002; 277:1-14.
57. Lewis CE, McGee JO'D, editores. The natural immune system. The macrophage. 1a ed. New York: Oxford University Press, 1992.
58. Lian-Yong G, Kwak YA. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Micr* 2000; 8:306-313.
59. Liu X, Li P, Widlack P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8461-8466.
60. Luna-Martínez E, Mejía TC, Betancourt X, Valera NM, Mas-Ibañez T, Peña FG. Secretaría de Ganadería, Agricultura y Desarrollo Rural. Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México A.C. Campañas Nacionales para la Erradicación de la tuberculosis bovina y brucelosis. Programa de aprobación de Médicos Veterinarios. Manual de Actualización Técnica para la Aprobación del Médico Veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis. 1996. p92.
61. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* infectious disease). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5243-5248.a
62. MacMicking JD, Xie Q, Nathan CF. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:323-350.b
63. Mason GL, Yang Z, Olchowy T'W, Jian Z, Bochsler PN. Nitric oxide production and expression of inducible nitric oxide synthase by bovine alveolar macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 53:15-27.

64. McAteer JA, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. Protocol 4: haemocytometer counting for total and percent viable cells. In: Davis JM. Basic cell culture, a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1998:128-130.
65. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet J 2000; 160:92-106.
66. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, Tsai MM, Flynn JL, Chan J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. Infect Immun 2001; 69:1847-1855.
67. Molloy A, Meyn PA, Smith KD, Kaplan G. Recognition and destruction of Bacillus Calmette-Guerin-infected human monocytes. J Exp Med 1993; 177:1691-1698.
68. Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. J Exp Med 1994; 180:1499-1509.
69. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. Exp Cell Res 2000; 256:12-18.
70. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:1503-1508.
71. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Azoti L, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. TUNEL : Improvement and evaluation of the method for *in situ* apoptotic cell identification. Biochemica 1997; 2:12-17.
72. Pertoft H. fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. J Biochem Biophys Methods 2000; 44:1-30.
73. Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, Sanduzzi A, Bocchino ML, Zembala M, Colizzi V. Apoptosis of human

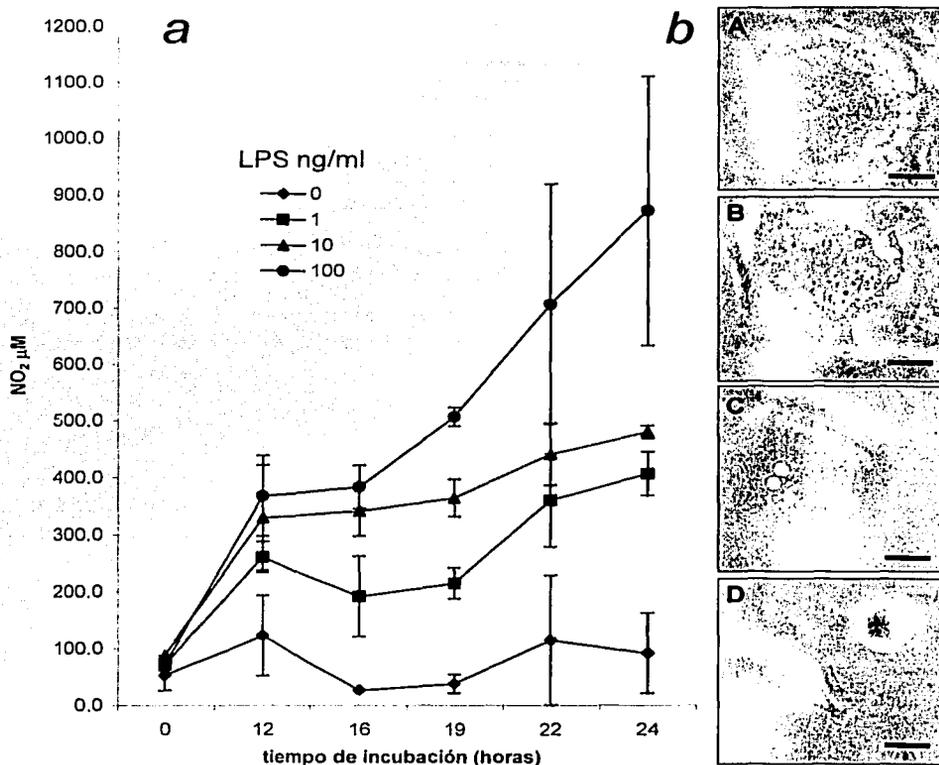
- monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Pathol 1997; 181:31-38.
74. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet J 2002; 163:1-13.
75. Qureshi T, Templeton JW, and Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. Vet Immunol Immunopathol 1995; 50
76. Ramírez R, Carracedo J, Castedo M, Zamzami N, Kroemer G. CD69-induced monocyte apoptosis involves monocyte nonredundant signaling pathways. Cell Immunol 1996; 172:192-199.
77. Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. Curr Opin Immunol 2001; 13:417-428.
78. Rhodes S, Hewinson R, Vordermeier H. Antigen recognition and immunomodulation by  $\gamma\delta$  T cells in bovine tuberculosis. J Immunol 2001; 166:5604-5610.
79. Rojas M, Barrera LF, Puzo G, García LF. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. J Immunol 1997; 159:1352-1361.
80. Rojas M, Barrera LF, Garcia LF. Induction of apoptosis in murine macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* is reactive oxygen intermediates-independent. Biochem Biophys Res Commun 1998; 247:436-442.
81. Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, García LF. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. J Immunol 1999; 162:6122-6131.

82. Rojas M, Garcia LF, Nigou J, Puzo G, Olivier M. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering Ca<sup>2+</sup>-dependent cell signaling. *J Infect Dis* 2000; 182:240-251.
83. SAGAR-SECOFI. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México, 1995.
84. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 1999; 401:168-173.
85. Samejima K, Toné S, Kottke TJ, Enari M, Sakahira H, Cooke CA, Durrieu F, Martins LM, Nagata S, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution. *J Cell Biol* 1998; 143:225-239.
86. Santillán FMA. Caracterización genética de las secuencias polimórficas ricas en GC (PGRS) en aislados de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*. México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.
87. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191:503-508.
88. Steel y Torrie. Bioestadística, principios y procedimientos. 2ª ed. Mc Graw Hill. México, 1985.
89. Stenger S, Modlin RL. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2002; 14:452-457.

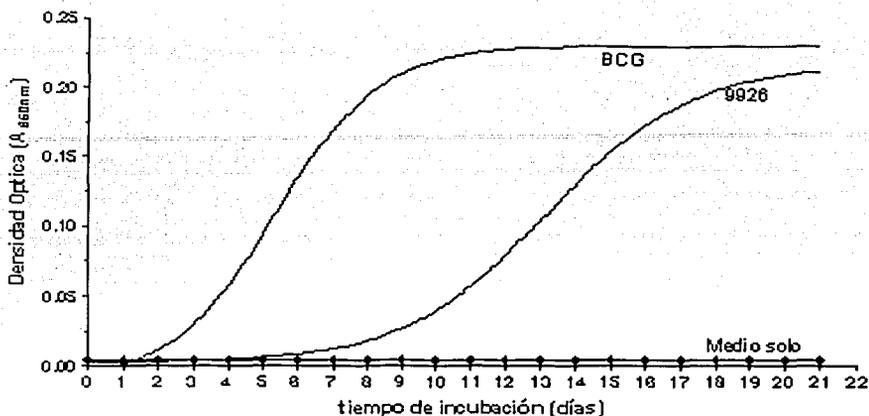
90. Stuehr DJ y Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate síntesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- $\gamma$ . J Immun 1987; 139:518-525.
91. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999; 397:441-446.
92. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacterial induced proinflammatory signaling in macrophages. Proc Natl Acad Sci, USA, 1999; 96:14459-14463.
93. Valdespino OJR. Pérdidas por desecho prematuro de vacas en un hato lechero en México. Revista Mundial de Zootecnia-FAO. 1993, 74/75:64.
94. Vallecillo MAJ. Crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares y su asociación al polimorfismo de la 3' UTR del Nramp1 (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
95. Watson VE, Hill LL, Owen-Schaub LB, Davis DW, McConkey DJ, Jagannath C, Hunter RL, Jr., Actor JK. Apoptosis in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice exhibiting varied immunopathology. J Pathol 2000; 190:211-220.
96. Widlack P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. Acta Biochim Pol 2000; 47:1037-1044.
97. Wissing D, Mouritzen H, Egeblad M, Poirier GG, Jäättelä M. Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:5073-5077.
98. Yoo HS, Rutherford MS, Maheswaran SK, Srinand S, Ames TR. Induction of nitric oxide production by bovine alveolar macrophages in response to *Pasteurella haemolytica* A1. Microb Pathog 1996; 20:361-375.

99. Zhang YH, Doerfler M, Lee TC, Guillemin B, Rom WN. Mechanisms of stimulation of interleukin-1-beta and tumor necrosis factor-alpha by *Mycobacterium tuberculosis* components. J Clin Invest 1993; 91:2076-2083.
100. Zhao M, Eaton JW, Brunk UT. Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. FEBS Letters 2001; 509:405-412.

## 7.0 CUADROS Y FIGURAS.



**FIGURA 3.2.1** Efectos de estimulación de macrófagos derivados de monocitos de bovino con LPS. **a** Niveles de óxido nítrico en sobrenadante de cultivos de macrófagos de bovino a diferentes tiempos de incubación con LPS. Se incubaron las células con LPS purificado de *E. coli* O26:B6 a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 ng/mL) y un testigo sin LPS y se midieron las concentraciones de nitrito a diferentes tiempos por medio del ensayo de Griess. Cada punto es la media  $\pm$  error estándar de un experimento por triplicado representativo de tres independientes con resultados similares. **b** Micrografías de luz de macrófagos estimulados con 100 (A), 10 (B), 1ng/mL (C) y sin LPS (D) después de 24 horas de incubación. Barra = 5 µm



**FIGURA 3.3.1** Cinética de crecimiento de *Mycobacterium bovis*. Se tomaron diariamente durante 21 días las lecturas de densidad óptica a una absorbancia de 650 nm de longitud de onda, de un cultivo de *M. bovis* cepa BCG subcepa Danesa y *M. bovis* cepa 9926 crecidas en caldo Middlebrook 7H9 con 10% de OADC, además de medio sin bacterias como control. Se tomó la absorbancia del agua bidestilada como el valor base (DO 0.00). Se representó gráficamente la ecuación de regresión no lineal para identificar el incremento logarítmico de crecimiento (LOGEC50) de cada cepa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 3.4.1.** Porcentaje de macrófagos derivados de monocitos de bovino (MDMB) con condensación de cromatina a diferentes tiempos post-infección *in vitro* con *Mycobacterium bovis*.

		Condensación de cromatina en MDMB					
		Susceptibles (% ± EE) *			Resistentes (% ± EE)		
pi	(h)	Testigo	BCG	9926	Testigo	BCG	9926
Reposo	8	4.3 ± 2.3	14.0 ± 1.7	47.7 ± 3.9	4.7 ± 1.3	32.7 ± 4.7	78.2 ± 5.3
	16	4.2 ± 1.5	22.3 ± 1.7	58.5 ± 2.3	2.2 ± 0.7	52.7 ± 1.6	88.5 ± 3.5
	24	5.5 ± 1.5	34.2 ± 3.8	68.0 ± 1.9	4.2 ± 0.3	61.8 ± 1.7	94.7 ± 2.6
Activados	8	11.3 ± 1.4	35.0 ± 3.0	52.0 ± 4.0	12.7 ± 3.2	47.5 ± 1.9	88.1 ± 0.4
	16	16.3 ± 3.1	53.8 ± 3.6	68.0 ± 3.1	12.2 ± 0.7	86.7 ± 2.7	94.5 ± 2.5
	24	19.8 ± 3.6	90.1 ± 4.2	95.0 ± 2.9	17.7 ± 2.9	85.5 ± 1.3	99.0 ± 0.6

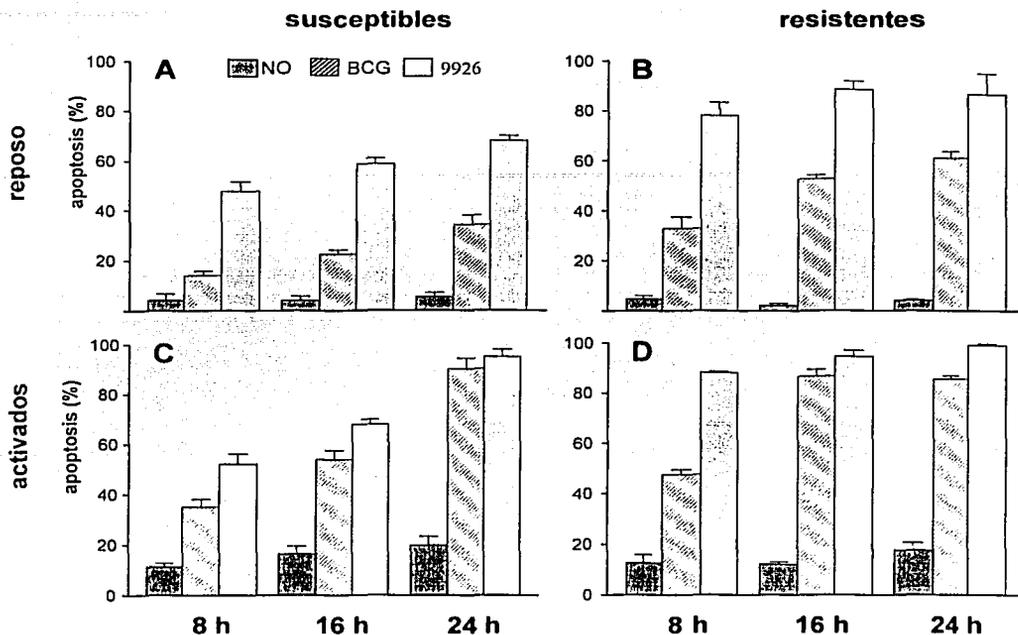
\* Media ± error estándar en porcentaje de ensayos por triplicado. Se incubaron MDMB de 12 días obtenidos por gradiente de Percoll y cultivados en matraces de teflón, durante 4 h con *M. bovis* vivo (MOI 10:1). Se contaron los núcleos con cromatina condensada teñida con yoduro de propidio, de 200 células evaluadas a diferentes tiempos post infección (pi) por triplicado con microscopio de fluorescencia. Experimento representativo de tres independientes con resultados similares. Testigo Macrófagos sin infección; BCG Macrófagos infectados con *M. bovis* BCG; 9926 Macrófagos infectados con *M. bovis* 9926. El efecto de la infección fue significativo con *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ) y con *M. bovis* 9926 ( $p < 0.001$ ) y asimismo, fue significativo con el fenotipo susceptible ( $p < 0.01$ ) y con el resistente ( $p < 0.001$ ) en la presentación de apoptosis, antes y después de la estimulación con LPS ( $p < 0.001$ ) en macrófagos activados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



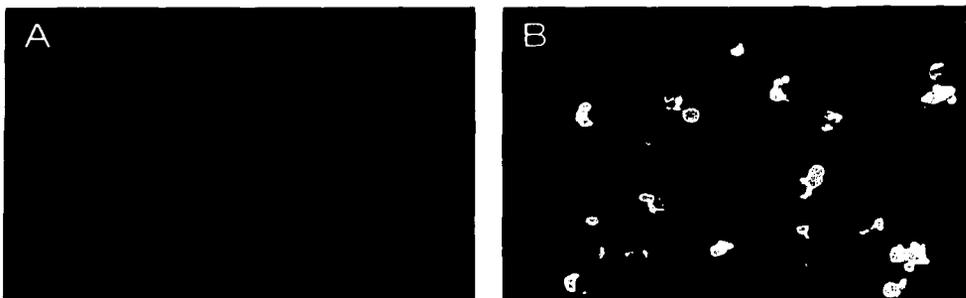
**FIGURA 3.4.1.** Microscopía de fluorescencia de macrófagos derivados de monocitos de bovino. Se incubaron las células con medio de cultivo solamente (a) o con *Mycobacterium bovis* (MOI 10:1) durante 4 horas (b), mostrándose la condensación de cromatina en células infectadas (puntas de flecha) y no infectadas (flechas) a las 24 h post infección. La morfología de los núcleos de las células testigo positivas incubadas con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de camptotecina durante 72 h (c), describe la morfología de las células apoptóticas. Tinción de ioduro de propidio. Aumento X 800.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

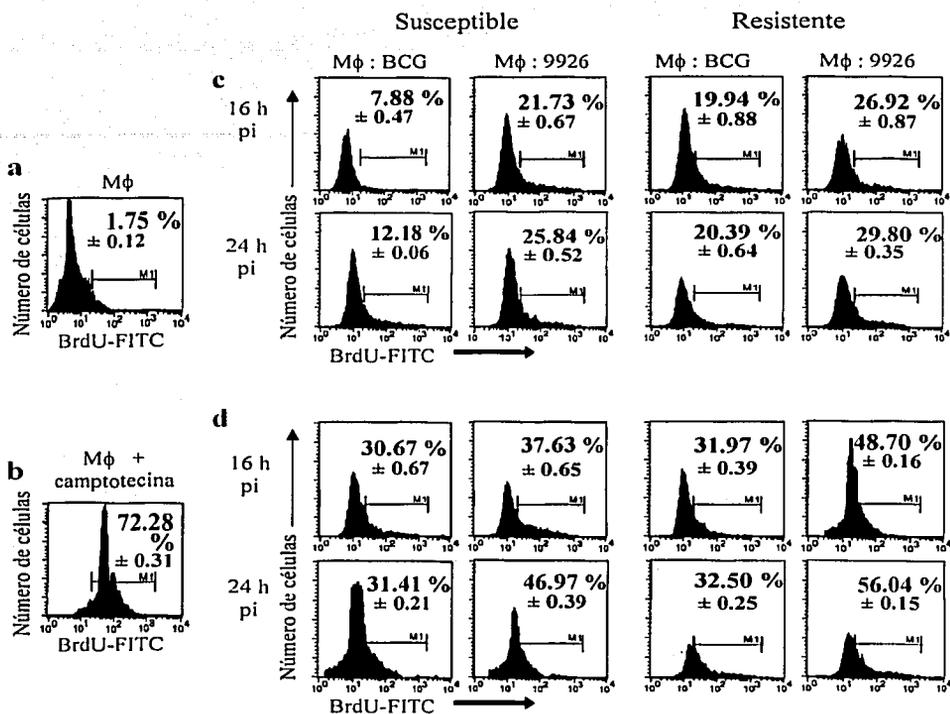


**FIGURA 3.4.2** Cinética de inducción de apoptosis de macrófagos derivados de monocitos de bovino (MDMB) en diferentes tiempos post infección (pi) con *Mycobacterium bovis*. Se incubaron MDMB susceptibles a patógenos intracelulares (A y C) y MDMB resistentes (B y D) en estado de reposo (A y B) o activados (C y D), con *M. bovis* aislado de campo (9926) o con *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) durante 4 horas (MOI 10:1) y se mantuvieron células sin infectar como testigos (NO). En el caso de los MDMB activados, se incubaron con 10 ng/mL de LPS durante 22 h y se lavaron previamente a la infección. En todos los casos, se realizó tinción de cromatina nuclear con yoduro de propidio (ver material y métodos). Promedio y error estándar en porcentaje de núcleos con cromatina condensada de 200 células analizadas por triplicado a las 8, 16 y 24 h pi. El efecto de la infección fue significativo con *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ) y con *M. bovis* 9926 ( $p < 0.001$ ) y asimismo, fue significativo con el fenotipo susceptible ( $p < 0.01$ ) y con el resistente ( $p < 0.001$ ) en la presentación de apoptosis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**FIGURA 3.4.3.** Microscopía de fluorescencia de macrófagos derivados de monocitos de bovino. Las células fueron incubadas con medio de cultivo solamente (A) o con *M. bovis* (MOI 10:1) durante 4 horas (B) y se observaron 24 horas después. La fluorescencia verde/amarillo de la FITC conjugada a anticuerpos anti-Bromo marcando los d-UTP's adicionados por la enzima TdT, distingue las células apoptóticas. Contratinción de yoduro de propidio. Aumento X 600.



**FIGURA 3.4.4.** Macrófagos derivados de monocitos de bovino (MΦ) con fragmentación de ADN por apoptosis a las 16 y 24 horas (h) post infección (pi) con *Mycobacterium bovis*. Se incubaron durante 4 horas con *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) o con *M. bovis* virulento aislado de campo (9926) (MOI 10:1), MΦ de bovino susceptible y MΦ de bovino resistente a patógenos intracelulares en estado de reposo (c) o activados (d). Se mantuvieron células sin infectar como testigos negativos (a) y células incubadas con 10 µg/mL de camptotecina por 72 h como control positivo de TUNEL (b). En el caso de los MDMB activados, se incubaron con 10 ng/mL de LPS durante 22 h y se lavaron previamente a la infección. En todos los casos, se realizó TUNEL (ver material y métodos). Datos son la media ± error estándar en porcentaje de un experimento representativo de dos independientes con resultados similares. Se analizaron 10 000 células por citometría de flujo por evento estudiado. El efecto de la infección fue significativo con *M. bovis* BCG ( $p < 0.01$ ) y con *M. bovis* 9926 ( $p < 0.001$ ) y asimismo, fue significativo con el fenotipo susceptible ( $p < 0.001$ ) y con el resistente ( $p < 0.0001$ ) en la presentación de apoptosis con respecto al testigo sin infección. M1 región de positivos expresado en porcentaje.

## 8.0 APÉNDICE

### 8.1. SOLUCIONES.

#### ANTICOAGULANTE ACD

Citrato trisódico	22.0 g
Acido cítrico	8.0 g
Glucosa (dextrosa)	24.5 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 mL
pH inicial 5.0	

#### PBS 10 X

Cloruro de sodio	87.7 g
Fosfato de sodio monobásico	1.5 g
Fosfato de sodio dibásico	13.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 mL

#### PBS 1 X

PBS 10 X	100.0 mL
Agua destilada c.b.p.	1000.0 mL

Ajustar a pH 7.4 y filtrar en poro de 22 $\mu$ m.

#### CITRATO

Acido cítrico trisódico	38.23 g
Agua mQ c.b.p.	1000.00 mL

#### PBS-CITRATO

PBS 10 X	100.00 mL
Acido cítrico trisódico	3.72 g
Agua c.b.p.	1000.00 mL

Ajustar a pH 7.4.

#### NaCl 1.5 M + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Cloruro de sodio	8.77 g
Fosfato se sodio monobásico	1.20 g
Agua c.b.p.	100.00 mL

### **CRPMI**

RPMI medium 1640 <sup>*</sup>	500.0 mL
L-glutamina	5.5 mL
MEM-no aminoácidos esenciales	5.5 mL
Piruvato de sodio	5.5 mL
Bicarbonato de sodio al 7.5%	12.0 mL

### **BSA 5% (p/v)**

Albúmina sérica bovina cristalina	50.0 g
Agua destilada estéril c.b.p.	1000.0 mL

### **TWEEN 20 AL 0.5%**

Tween <sub>20</sub>	0.5 mL
Agua destilada estéril c.b.p.	99.5 mL

Esterilizar todas las soluciones por filtrado en poro de 22µm.

### **PERCOLL-STOCK**

Percoll comercial <sup>†</sup>	10 partes
NaCl 1.5 M + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 parte

### **GRADIENTE DE PERCOLL.**

Para la recuperación de los monocitos por centrifugación isopícnica, se requiere que la suspensión a preparar de Percoll posea una gravedad específica similar a la de las células a separar (libro ).

Se requiere utilizar la suspensión de Percoll-trabajo a una gravedad específica (SG) de 1.0770. Para obtener esta gravedad específica se añade al Percoll-stock una serie de soluciones en donde cada una de ellas posee una SG particular y así finalmente se obtiene la SG deseada. Sin embargo, las SG de cada solución adicionada puede equivaler al Índice de Refracción (RI) de las mismas y con éste índice obtener los mismos resultados que al utilizar las SG. El RI del Percoll-trabajo equivalente a la SG=1.0770 es el RI=1.3460 y es el que se busca obtener al final para poder realizar la centrifugación isopícnica con Percoll.

<sup>\*</sup> Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA

<sup>†</sup> Percoll®. Pharmacia Biotech AB.Uppsala, Suiza. Código No. 17-0891-01.

Las sustancias o soluciones que necesarias para preparar el Percoll-trabajo son: Percoll stock (10:1), albúmina sérica bovina al 5% (BSA 5%), Citrato de Sodio 130 mM (Citrato) y solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X).

Sustancia	SG		RI*
BSA 5%	1.0227	=	1.3415
Citrato	1.0219	=	1.3388
PBS 1 X	1.0056	=	1.3349
Percoll-stock	1.1245	=	1.3530
Final	1.0770	=	1.3460

\* variación máxima deseada de  $\pm 0.0001$ .

Para calcular los volúmenes de cada una de las anteriores soluciones que se deben adicionar para obtener el volumen final de la suspensión de Percoll-trabajo, se resuelve la siguiente fórmula:

donde:

X= mL de PBS por mL de suspensión final

a = SG del PBS - 1

b = SG de la BSA - 1

c = SG del Citrato - 1

d = SG del Percoll - 1

$$Xa + 0.1b + 0.1c + (0.8-X)d = 1.077 - 1$$

Determinar los volúmenes de cada sustancia:

Volumen

en mL

$$\text{PBS} = (X)(\text{Volumen final en mL})$$

$$\text{BSA} = 0.1(\text{Volumen final en mL})$$

$$\text{Citrato} = 0.1(\text{Volumen final en mL})$$

$$\text{Percoll} = (0.8 - X)(\text{Volumen final en mL})$$

Realizar todas las mediciones de Índice de refracción y el cálculo de los volúmenes de las soluciones y preparar la suspensión de Percoll-trabajo el mismo día que se utilizará.



## 8.2. REACTIVOS

Nombre común	Fórmula química	Proveedor	No. de catálogo
Albúmina bovina Fracción V	No disponible	SIGMA	A-9418
Acido cítrico	$C_6H_8O_7$	SIGMA	C-0759
Acido cítrico sal trisódica	$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$	SIGMA	C-8532
Bicarbonato de sodio	$NaHCO_3$	SIGMA	S-4019
Camptotecina	$C_{20}H_{16}N_2O_4$	SIGMA	C-9911
Cloruro de sodio	$NaCl$	SIGMA	S-3014
DMSO (dimetil sulfóxido)	$C_2H_6OS$	SIGMA	D2650
Etanol ABSOLUTO	$C_2H_5OH$	MERK	1.00983.2500
E-toxa-clean	No disponible	SIGMA	210-3
Fosfato de sodio dibásico	$Na_2HPO_4$	SIGMA	S-3264
Fosfato de sodio monobásico	$NaH_2PO_4$	SIGMA	S-5011
Glucosa (dextrosa )	$C_6H_{12}O_6$	SIGMA	G-7021
Griess, reactivo	No disponible	SIGMA	G-4410
L-glutamina 200 mM	No disponible	GIBCO	25030-081
MEM aminoácidos no esenciales	No disponible	GIBCO	11140-050
Nitrito de sodio	$NaNO_2$	SIGMA	251-4
Paraformaldehído	$HCHO$	E.M.S <sup>‡</sup>	15710
Piruvato de sodio	$C_3H_3O_3 \cdot Na$	GIBCO	11360-070
Ribonucleasa A	No disponible	SIGMA	R-4642
Tritón X-100	No disponible	SIGMA	T-8787
Tween <sub>20</sub>	No disponible	SIGMA	P-2287
Tween <sub>80</sub>	No disponible	SIGMA	P-4780
Ioduro de propidio	$C_{27}H_{34}N_4I_2$	SIGMA	P-4170

<sup>‡</sup> E.M.S. Electron Microscopy Sciences

TESTE COM  
FALLA DE ORIGEN