



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DE CEPAS DE *Mycobacterium*  
*bovis* AISLADAS DE LESIONES TUBERCULOSAS EN  
MACROFAGOS DE BOVINO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
ALEJANDRO BENITEZ GUZMAN

ASESOR: DR. JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

**Dedico ésta tesis a:**

**Chonita.** A tu memoria poseedora de varias generaciones de vida, hoy desde tu ominoso encierro o montada en una nube que como un hálito angelical nos cubre en cualquier lugar, todos podemos gritarte al oído de una manera tierna y sutil; tal vez sin que escuches nada. VALIÓ LA PENA.

**Ruperto.** Por tu forma de ser, pensar y dirigirte hacia las situaciones adversas de la vida y por que eres a quién más me parezco en este planeta.

**Eligia.** Por existir y dar la existencia, dedicación, sacrificio y protección a cada uno de tus tesoros, con ese toque que solo tú sabes mezclar: lucha, combatividad y alegría. Solo tú.

**Andrés.** Por ser la persona más clemente y de buen corazón que conozco hasta hoy, ejemplo de sensibilidad y entrega, cualidades muy valiosas y en peligro de extinción en este mundo. Que sigas iluminado por ese halo invisible que solo tú posees, tranquilidad para ti y Ara.

**Marcela.** Estandarte y orgullo de muchas de mis batallas, ejemplo de disciplina, constancia y equilibrio, ¡Nunca pares! Paz y Buenaventura en tu alma, para ti y Luigi.

Nunca olvides que cuando estés atascado en ese estiércol cotidiano (sabes cuales), sintiendo la pesada y estúpida levedad, maldita y amargada soledad sin uno mismo. Siempre hay tiempo para que entres en metamorfosis y alcances ese estado de tranquilidad anhelado. Tomando como bandera a la rebeldía interna, que es la más importante y difícil de llevar a cabo, romper tus paradigmas generacionales e individuales, sin caer en la pesadumbre del miedo. Siempre lucha por satisfacerte a ti mismo DISFRUTANDO EL VENCERTE.

## **Agradecimientos**

A la **UNAM** mi alma *mater*, por ser parte fundamental no solo en mi educación profesional si no en mi vida y por ser orgullosamente pública y gratuita.

A mi asesor y amigo José Ángel G. Gutiérrez Pabello por todo el apoyo ofrecido en la realización de ésta tesis y por permitirme conocer a una persona integral, no siempre se tiene ese placer.

A la Dra Camila Arriaga Díaz y al MC Marco Antonio Santillán por el apoyo recibido en la realización de este trabajo.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias CENID- Microbiología.

A mis amigos del laboratorio ya que siempre es más placentero el trabajo cuando se comparte con personas de cualidades apremiantes.

A mis amigos, mi segunda familia ya que al estar cerca de ellos disfruto frustraciones, depresiones, alegrías, enojos, sentimentalismos, banalidades, existencialismos, rebeldía, sumisión y sobretodo una de las cosas más buscadas y anheladas, pero, no siempre alcanzadas con la plenitud que yo poseo LA AMISTAD. Ustedes saben quienes son y son correspondidos en el más mínimo detalle. TODO MI AMOR PARA USTEDES.

A todas las cosas que me hacen disfrutar de la vida.

“GRACIAS TOTALES...”

**Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento de los proyectos:**

**PAPIIT IN219999**

**Y**

**CONACYT G34799**

## ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.0 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Tuberculosis bovina en México	3
1.2 Patogenia	4
1.3 Agente etiológico	6
1.3.1 Mecanismos de virulencia	6
1.3.1.1 Componentes de la superficie celular	6
1.3.1.2 Enzimas que intervienen en el metabolismo celular	7
1.3.1.3 Aceptores de iones	7
1.4 Diagnóstico	7
1.5 Epidemiología	8
1.6 Antecedentes	9
2.0 Hipótesis	10
3.0 Objetivo general	10
4.0 Objetivos específicos	10
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS	11
5.1 Cepas bacterianas	11
5.1.1 Preparación de inóculos	11
5.1.2 Cuantificación del inóculo	12
5.2 Aislamiento de monocitos de sangre periférica	13
5.3 Ensayo bactericida	14
5.3.1 Control inóculo	14
5.3.2 Evaluación T0	15
5.3.3 Evaluación T1	16
5.4 Análisis estadístico	16
6.0 RESULTADOS	17
6.1 Evaluación de la fagocitosis	17
6.2 Evaluación de la supervivencia intracelular	17
7.0 DISCUSIÓN	21
8.0 CONCLUSIONES	23
9.0 PERSPECTIVAS	24
10.0 LITERATURA CITADA	25





## RESUMEN

**Benítez-Guzmán A.** Supervivencia intracelular de cepas de *Mycobacterium bovis* aisladas de lesiones tuberculosas en macrófagos de bovino. (Bajo la dirección de el Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello).

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial, debido a que ocasiona grandes pérdidas económicas además de ser un problema en salud pública. El agente causal de esta enfermedad es *Mycobacterium bovis*. Existen una gran variedad de cepas de este microorganismo diseminadas en el campo, sin embargo se desconoce la virulencia de cada una de ellas y si este es un factor que influya en la patogenia y el curso de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la supervivencia intracelular de cepas de *Mycobacterium bovis* aisladas de diferentes casos clínicos como un factor asociado a la virulencia. Se aislaron monocitos a partir de sangre periférica mediante un gradiente de Percoll y se maduraron durante 14 días en matraces de teflón. Un total de 18 cepas de *M. bovis* fueron crecidas en caldo 7H9 adicionado con el 10% de OADC en agitación orbital constante, hasta alcanzar la fase logarítmica media de crecimiento en el día 11 y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los macrófagos se infectaron en placas de Terasaki utilizando una MOI de 10:1, evaluando 2 tiempos:  $T_0$  bacterias fagocitadas a las 4 horas postinfección (pi), y  $T_1$  crecimiento intracelular 24 horas pi. La tasa de supervivencia se obtuvo de la diferencia existente entre estos dos valores de cada una de las cepas y se estableció diferencias estadísticas para la supervivencia utilizando la prueba de Tukey, además de comprobar el efecto de las variables con una prueba de regresión lineal simple. Con base en las diferencias estadísticas encontradas ( $P < 0.05$ ) en la supervivencia intracelular se formaron dos grupos, los rangos que se establecieron para formarlos son los siguientes. Grupo 1, cepas con supervivencia mayor a 111% y hasta 184% no tienen diferencias estadísticas significativas entre cada una de ellas y representan el 45% de la población. Grupo 2 cepas con supervivencia menor a 110.9% y hasta 35% no mostraron diferencias estadísticas significativas y representan el 55% de la población. No existió una correlación directa entre fagocitosis y supervivencia intracelular. Las diferencias en la tasa de supervivencia intracelular sugieren que la virulencia de las cepas estudiadas es diferente, lo cual puede repercutir en la diseminación de las mismas en el campo.

## ABSTRACT

**Benítez-Guzmán A.** Intracellular survival of *Mycobacterium bovis* strains isolated of tuberculosis lesions in bovine macrophages. (Under the tutoring of Dr. Jose Angel Gutierrez Pabello)

Bovine tuberculosis is one of the most important diseases in the world. It is not only a threat to public health but also the cause of huge economical losses. *Mycobacterium bovis* is the etiological agent of bovine tuberculosis, a multiple number of strains with different levels of genetic variation has been identified in the field, however the virulence of the strains and their impact in disease dissemination are not well understood. The main goal of this study was to assess the intracellular survival of *Mycobacterium bovis* strains isolated from clinical cases as a virulence associated factor. Peripheral blood monocytes were obtained by isopicnic centrifugation and cultured for 14 days in Teflon flasks. A total of 18 strains were grown in 7H9 broth with 10% OADC, at 37°C under shaking conditions during 11 days to reach the medium logarithmic phase of growth and stored at -80°C until further use. Macrophages were infected in Terasaki plates using a MOI 10:1 and 2 different times post infection were evaluated: T<sub>0</sub> phagocytosed bacteria after 4 hours and T<sub>1</sub> intracellular survival after 24 hours. The survival rate was obtained subtracting these 2 values and statistical significant differences were established using the Tukey test. In addition, the variable effects were corroborated by lineal regression. Based on the statistical differences (P<0.05) two groups were identified. Group 1 clusters all the strains with a survival rate ≥111% and ≤184%, it comprises 45% of the strains. Group 2 includes the strains with a survival rate ≥35% and ≤110.9% representing 55% of the population studied. There was no correlation between phagocytosis and intracellular survival. The intracellular survival differences amongst strains suggested that the polymorphism identified in this study may be a factor affecting the virulence of these field isolates.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad de importancia a nivel mundial, se tienen datos de la presencia de este bacilo en momias con una antigüedad de 4000 años, <sup>1,2</sup> comprobando su existencia desde tiempos milenarios y con marcos de referencia históricamente importantes, en el siglo XIX donde alcanza su cúspide fue conocida como la plaga blanca, desde entonces hasta nuestros días es de gran importancia ya que es de difícil eliminación para el hospedero, aunado a la falta de vacunas totalmente efectivas, así como un tratamiento costoso y prolongado. <sup>3</sup>

### 1.1 Tuberculosis bovina en México

La tuberculosis es una enfermedad que afecta a un gran número de especies, en la industria pecuaria es de gran importancia *Mycobacterium bovis*, agente etiológico de la tuberculosis bovina, que en México se encuentra dentro de una campaña nacional de control (prevalencia menor al 5% con distribución conocida), con solo 7 estados en ésta fase (Sonora, Chihuahua, Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León Quintana Roo y Yucatán) y erradicación (prevalencia mayor al 5% con distribución desconocida) en donde se encuentra los estados restantes de la república mexicana (25 estados), es por ello que en el país ésta enfermedad representa grandes pérdidas principalmente económicas, <sup>4</sup> Valdespino <sup>5</sup> reporta que hay una disminución de peso en el animal, así como en la producción láctea y duración de las lactancias, en ocasiones la micobacteria es eliminada por leche, por lo que el consumo de ésta sin pasteurizar puede, ser un factor de riesgo para la población ya que es considerada una zoonosis, no de gran importancia a nivel mundial, aunque se tienen datos en poblaciones demarcadas en donde es un factor de riesgo primario importante y puede asociarse a una gran cantidad de casos con un origen similar. <sup>6</sup> Además, la normatividad establece que en los hatos donde existan animales reactivos se eliminarán, y será limitada su comercialización y traslado.<sup>4</sup>

En el 2001 la inversión realizada en la campaña contra la tuberculosis bovina fue de más de 40 millones de pesos; con un total de 30,096 de cabezas reactivas, el total de hatos tuberculinizados fue de 68 847, por lo que son necesarios diversas estrategias para que la campaña sea de mayor amplitud en la detección de animales reactivos y se cuente con una correcta aplicación.

## 1.2 Patogenia

La principal vía de transmisión de la enfermedad es por aerosoles por lo que se considera de importancia el tipo de tecnificación que existe en las unidades productivas, las de tipo intensivo permiten la transmisión de la enfermedad de una manera más rápida que en hatos con un sistema productivo a nivel extensivo,<sup>7,8</sup> la segunda vía de transmisión es la oral donde se producirá la tuberculosis digestiva, en donde la dosis infectante es mayor para poder desarrollar un proceso patológico, otra vía de entrada reportada es la reproductiva con una baja frecuencia (>1%).<sup>9,10</sup> La resistencia de la bacteria en el ambiente es variable y depende de algunos factores como temperatura, humedad, presencia de materia orgánica para sobrevivir (hasta 700 días). Es sensible a la luz solar, se ha probado que puede durar en suelo hasta 87 días sin exposición a la luz y el tiempo de resistencia aumenta si está en heces o agua.<sup>10,11</sup>

Aunque la micobacteria afecta a diferentes células, una de las más comúnmente afectadas es el macrófago que actúa como la primer barrera de defensa,<sup>12,13,14</sup> el cuál es una célula del sistema inmune inespecífico de defensa con un tamaño aproximado de 40  $\mu\text{m}$ , proveniente de la médula ósea a partir de células progenitoras o unidades formadoras de colonias granulocitos-macrófagos, en donde maduran a monoblastos, promonocitos y son liberados a la circulación sanguínea como monocitos constituyendo el 5% del total de leucocitos circulantes, duran aproximadamente 70 horas en circulación para después migrar a los tejidos. Tienen la capacidad de fagocitar (partículas mayores a 250 nm) un gran número de veces y destruir al microorganismo problema.<sup>15</sup> Posee en la superficie diferentes receptores para fagocitar antígenos, en el caso de la tuberculosis los utilizados son; del complemento, de manosa, y WC1, WC2.<sup>16,17,18,19</sup> A partir de la adhesión, la bacteria es internalizada por una invaginación de la membrana plasmática formándose el fagosoma temprano (pH de 4.5),<sup>20</sup> después madura a fagosoma tardío, se fusiona con los lisosomas (fagolisosoma) para destruir al agente; al ser la micobacteria un parásito intracelular facultativo posee mecanismos de defensa que impiden su destrucción dentro del macrófago.<sup>21</sup>

Al entrar la bacteria (infección primaria) se produce una importante respuesta TH1 CD4+ (Moléculas de histocompatibilidad tipo II) estimulada por la producción de Interleucina 12 (IL12), además de otras citocinas como interferón gama ( $\text{IFN}\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{FNT}\alpha$ ), activando a macrófagos para promover una mayor actividad

microbicida, elevando la producción de óxido nítrico e intermediarios reactivos de nitrógeno vía sintetasa del óxido nítrico.<sup>22,23,24</sup> Otras células que tienen un papel secundario en la primoinfección son las células T CD8+, las cuales muestran una serie alternativa de péptidos por moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC I) y CD1, además de células  $\gamma\delta$  que tienen una respuesta hacia antígenos no protéicos. En ésta fase existe una proliferación y diseminación bacilar desencadenado la aparición de la siguiente signología; disminución de peso, cansancio, depresión y fiebre en algunas ocasiones.<sup>25,26,27</sup>

Cuando la infección primaria es controlada, el primer mecanismo que utiliza es la formación de un granuloma el cual es un agregado de células del sistema inmune y está compuesto por células mononucleares inmaduras, rodeadas por células T CD4+, CD8+, además de la formación de células gigantes e interdigitadas, limitando así el sitio de la infección. Al centro del granuloma se encuentra material calcificado o bien necrosis caseosa, en una atmósfera con bajas concentraciones de oxígeno, altas concentraciones de dióxido de carbono y enzimas hidrolíticas. Finalmente los macrófagos activados y linfocitos que rodean al centro liberan una gran cantidad de compuestos antimicrobianos. A ésta etapa de la enfermedad se le llama persistencia y el animal puede mostrarse asintomático, hasta que entre a una etapa de reactivación y progresión de la enfermedad debido a algún agente inmunosupresor.<sup>28,29,30,31</sup>

Las lesiones que se observan en la necropsia son la presencia de granulomas, la distribución puede ser localizada o difusa (tuberculosis miliar), y la presentación dependerá de la vía de entrada y diseminación de la enfermedad, cuando la entrada es por vía aérea y las bacterias infectan al pulmón las lesiones se presentan principalmente en el lóbulo caudal, cuando la vía de diseminación son las tonsilas las lesiones se pueden observar en linfonodos mesentéricos.<sup>32</sup>

Para el desarrollo de la infección son importantes la virulencia de la bacteria y la susceptibilidad del hospedero, por lo tanto al ser un parásito intracelular facultativo los mecanismos que utiliza para la resistencia, replicación y evasión de la fagocitosis son factores importantes para el desarrollo de la enfermedad.

### 1.3 Agente etiológico

*Mycobacterium bovis*, forma parte del complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti* *M. africanum* y *M. bovis*), asimismo es considerado como una zoonosis y comparte el 99% de homología con las otras bacterias que conforman el complejo tuberculosis.<sup>33,34,35</sup> Es un microorganismo ácido alcohol resistente de crecimiento lento (intervalo generacional es de 16 a 20 horas)<sup>36</sup> debido a la gran cantidad de lípidos que conforman su pared (60 % del peso seco de la bacteria), principalmente ácidos micólicos y lipoarabinomananas que pueden actuar como mecanismos de virulencia. Es aerobio facultativo, tiene la capacidad de cambiar su ruta metabólica para la producción de energía del ciclo de Krebs al ciclo del glioxilato, utilizando la enzima isocitrato liasa (Icl).<sup>37</sup> El tiempo de crecimiento en medios de cultivo es de 3-4 semanas a una temperatura óptima de 35-37°C, detiene su crecimiento a 39°C. Es exigente en sus requerimientos nutricionales por lo que necesita medios específicos para su cultivo tales como Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11, 7H12, (la diferencia radica en la cantidad de los inhibidores de crecimiento), Dubos, Petragnani y Stonebrink-Leslie. La adición de glicerol inhibe el crecimiento de *M. bovis* a diferencia de *M. tuberculosis* que es favorecido.<sup>38-42</sup>

#### 1.3.1 Mecanismos de virulencia

Los mecanismos de virulencia en la bacteria son los que utiliza para evitar la fagocitosis, así como acelerar su replicación. Al entrar la bacteria en contacto con el macrófago tiene proteínas que sirven para la supervivencia, algunas de éstas son KatG (catalasa peroxidasa),<sup>43,44,45</sup> SodA, SodC (superóxido dismutasa), glnA1 (glutamina sintasa),<sup>50,51</sup> que son enzimas que degradan reactivos intermediarios de oxígeno por lo tanto son solubles.<sup>46,47</sup> HspX (Acr)<sup>48,49</sup> que es una proteína en la cual su expresión es inducida bajo condiciones de anoxia y es reconocida en organismos infectados pero se desconoce su función. Otra proteína que es importante en la vía de entrada de la micobacteria es la proteína de 19 kDa que interactúa con los receptores toll like 2.<sup>52,53,54,55</sup>

##### 1.3.1.1 Componentes de la superficie celular.

La síntesis de lípidos es importante para una mayor proliferación y diseminación de los componentes de la superficie celular, algunos de éstos componentes que tienen efecto en este proceso son: Erp, proteína que interviene en la velocidad de la replicación bacteriana, asimismo<sup>56</sup> Mas, <sup>57</sup>Fad26, Fad 28, LipF intervienen en síntesis y degradación de ácidos grasos alterando el metabolismo bacteriano con una replicación más lenta, por

otra parte Mmpl7; altera la síntesis de PMID (ácidos micoséricos y ptiocero dimicoserato),<sup>58,59,60</sup> FbpA (antígeno 85A, 85B, 85C), se encarga de transportar ácidos micólicos y derivados de trehalosa ligándolos a la matriz extracelular.<sup>61,62,63</sup> Otras proteínas que se encuentran asociadas a los lípidos de la pared son; OmpA que es una porina encontrada en *M. tuberculosis* solo en cepas virulentas,<sup>64,65</sup> LAM (lipoarabinomananas) que conforma la mayor parte de la pared bacteriana y actúa como un importante inmunomodulador disminuyendo la producción de IFN $\gamma$ .<sup>66</sup>

### 1.3.1.2 Enzimas que intervienen en el metabolismo celular.

Algunas enzimas utilizadas en rutas metabólicas por la micobacteria son importantes para su desarrollo y replicación, al mutar los genes que codifican para éstas proteínas se a notado una disminución en su replicación, es por ello que se consideran como factores de virulencia, tal es el caso de FadD33, que en la infección por cepas virulentas se detecta una alta expresión del gen que codifica para ésta proteína, pero se desconoce el mecanismo.<sup>67,68</sup> Fosfolipasas C (PclA, PclB, PclC, PclD) que en *M.bovis* se encuentra solo el PclD. PauC/PauD y juegan un papel importante en la síntesis, degradación y metabolismo intermediario de ácidos grasos, al mutar los genes que codifican para éstas proteínas hay una disminución en la virulencia.<sup>69,70</sup> De la misma forma algunos genes que intervienen en la producción de aminoácidos son; *LeuD* codifica para isoisopropimalato isomerasa y ayuda en la biosíntesis de leucina, al mutar este gen disminuye la virulencia.<sup>71,72</sup> *TrpD* interviene en la síntesis de triptofano, *ProC* síntesis de prolina *PurC* síntesis de purina.<sup>73,74</sup>

### 1.3.1.3 Aceptores de iones.

MgtC es un transportador que interviene en la toma de iones de Mg<sup>2+</sup> y es esencial para el crecimiento a bajas dosis de Mg<sup>2+</sup> en el medio y en el macrófago.<sup>75,76</sup> MbtB, se encarga de transportar de hierro<sup>77,78</sup> Nitrato reductasa, juega un papel importante en la ausencia de oxígeno<sup>79,80</sup> e inhibe la fusión maduración del fagosoma temprano al tardío secuestrando las proteínas Rab, e inhibiendo a la proteína TACO.<sup>81</sup>

## 1.4 Diagnóstico

El método que se utiliza para la detección de la tuberculosis bovina en la campaña nacional de control y erradicación, está basada en una prueba de hipersensibilidad de tipo IV (intradermoreacción) donde se inocula un derivado proteínico de la micobacteria

cepa de laboratorio AN5 compuesto por una serie de antígenos, azúcares, lípidos y proteínas.<sup>82, 83</sup> Los sitios anatómicos en donde el derivado proteico puro (PPD) se aplica es en la tabla del cuello (cervical simple) y en pliegue caudal, la zona de aumento en la piel se mide a las 72 horas. Cuando un animal es reactor, se utiliza la prueba doble comparativa, en donde se inocula otro derivado proteico pero de *Mycobacterium avium* proveniente de la cepa D4ER o TB56, el proceso inflamatorio se mide con un micrómetro, para establecer una reacción positiva o negativa.

Otras pruebas utilizadas con base en el perfil inmunológico son el ensayo inmunoenzimático (ELISA) e interferón gamma (INF $\gamma$ )<sup>83,84</sup>

#### 1.4.1 Aislamiento

El aislamiento de la micobacteria es la prueba de oro hasta la fecha, se hace a partir de las lesiones encontradas a la necropsia, eliminando restos de tejidos por medio de compuestos ácidos y alcalinos, se cultiva en medio Stonebrink-Leslie por al menos 8 semanas para observa colonias con morfología parecida a las del género (colonias blanquecinas, redondas difíciles de despegar) confirmando con la tinción de Ziehl Neelsen, y realizando pruebas bioquímicas.<sup>84</sup>

#### 1.5 Epidemiología.

En la actualidad la microbiología molecular provee de nuevas herramientas para el estudio y distribución de las enfermedades evaluándolas por características más específicas y tipificando a la bacteria problema de una manera más exacta por secuencias insertadas en su genoma (tipificación genética). Las técnicas moleculares utilizadas para el estudio del género *Mycobacterium* son las siguientes: Tipificación por espaciadores (Spoligotyping), polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), con éstas herramientas se puede hacer un seguimiento por cepa en diferentes regiones de un estado o bien de un país, relacionando o formando mapas de transmisión, siendo de gran utilidad cuando la fuente de transmisión es la fauna silvestre.<sup>85</sup>

Existen diferentes modelos en los cuales se pueden estudiar los efectos causados por la micobacteria en el huésped, los más utilizados son el modelo ratón, que en el caso de *M. tuberculosis* es ampliamente usado para el estudio de producción de diferentes citocinas, lesiones en el huésped, replicación de la micobacteria y estudio de cepas mutantes. Otros modelos que se utilizan con los mismos fines es el modelo conejo y cuye. Las líneas



celulares, son utilizadas para el estudio en la interacción con el macrófago, actualmente existen líneas celulares de ratón susceptible (J774) y líneas celulares de ratones resistentes.<sup>86</sup>

### 1.6 Antecedentes

Campbell GA. y Adams L.G. (1994) comprobaron que por medio de ensayos bactericidas se pueden caracterizarse fenotípicamente a los animales, en resistentes y susceptibles, dependiendo del porcentaje de supervivencia con una cepa apatógena de *M. bovis* en macrófagos obtenidos a partir de sangre periférica, por lo tanto se puede observar una respuesta mas adecuada en la interacción con la célula.<sup>87,88,89.</sup>

Existe una variedad de cepas de campo diseminadas por diferentes regiones del país, algunas de las cuales con gran parentesco en su origen. Sin embargo, en recientes estudios se comprobó que el género *Mycobacterium* tiene gran polimorfismo en secuencias repetidas, debido principalmente a los numerosos genes que conforman el genoma, incluyendo algunos que son factores de virulencia e inmunogenicidad, como fosfolipasa C, membrana lipoprotéica, la familia de las adenilato ciclasas y las familias de la proteínas ricas en glicina (PE y PPE).<sup>90</sup>

En el presente estudio se evaluó la supervivencia intracelular de diferentes cepas de *M. bovis* en macrófagos bovinos derivados de monocitos asociando la supervivencia a los diferentes mecanismos que puede establecer la bacteria para evadir su destrucción así como el origen de la cepa.

## **2.0 Hipótesis**

El género *Mycobacterium* ha mostrado diferentes grados de polimorfismo en su genoma, por lo que se espera que las cepas de *M. bovis* aisladas de lesiones tuberculosas muestren una diferencia significativa en el grado de fagocitosis y de supervivencia intracelular en macrófagos bovinos

## **3.0 Objetivo general**

Evaluar la fagocitosis y la supervivencia intracelular de 18 cepas de campo de *M. bovis* mediante ensayos microbicidas en macrófagos de bovino derivados de sangre periférica.

## **4.0 Objetivos específicos**

1. Determinar si la fagocitosis influye en el crecimiento intracelular y por lo tanto en la supervivencia de cepas de *M. bovis* en macrófagos de bovino.
2. Establecer las posibles diferencias significativas entre los valores de supervivencia intracelular de cada cepa de *M. bovis* en macrófagos de bovino.

## 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas Bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron identificadas como *Mycobacterium bovis* mediante pruebas bioquímicas, en el laboratorio de diagnóstico bacteriológico del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

ORIGEN	IDENTIFICACIÓN
1. Jalisco	9917
2. Jalisco	9920
3. Jalisco	9918
4. Jalisco	9926
5. Jalisco	9916
6. Jalisco	9927
7. Jalisco	9923
8. Jalisco	9930
9. Jalisco	9914
10. Estado de México	9524
11. Estado de México	CO3
12. Estado de México	CO5
13. Estado de México	9563
14. Querétaro	163QP
15. Querétaro	129QP
16. Torreón	T41C
17. Torreón	T3
18. Nayarit	9912

#### 5.1.1 Preparación de inóculos

Las cepas de *Mycobacterium bovis* se cultivaron en agar Middlebrook 7H11 enriquecido con 10% de ácido oléico, catalasa y dextrosa (OADC). Se tomaron de 3 a 5 colonias con características morfológicas semejantes y se sembraron en 15 ml de caldo Middlebrook 7H9 con 10% de OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Anexo 2). Las cuales se incubaron por un periodo de 8 días a 37°C en agitación orbital. Al final de la incubación

cada cultivo bacteriano fue transferido a un matraz con 135 ml de medio fresco para incubarlo en las mismas condiciones durante 11 días, tiempo requerido para alcanzar la fase logarítmica media de crecimiento.

Los cultivos bacterianos se centrifugaron en tubos de polipropileno de 50 ml durante 15 minutos a 3300 X g y se lavaron 2 veces con PBS 1X (cbp 50 ml). El paquete celular se resuspendió en 11 ml de medio completo Roswall Park Memorial Institute (CRPMI) adicionado con 15% suero fetal bovino (SFB). Para su preparación se necesita adicionar al medio RPMI de 500 ml, 5.5 ml de aminoácidos esenciales (0.1mM), 5.5 ml de piruvato de sodio (1mM), 5.5ml de L-glutamina (2mM) y 12 ml de bicarbonato de sodio (NaHCO<sup>3</sup>) al 7.5% (20 mM). La suspensión bacteriana se pasó 2 veces a través de una aguja de calibre 29 g x 13mm utilizando una jeringa con el propósito de dispersar los agregados bacterianos. Cada suspensión bacteriana fue almacenada en alícuotas de 1 ml a -80°C hasta su uso en los ensayos bactericidas.

### 5.1.2 Cuantificación del inóculo

A una alícuota de cada inóculo preparado se descongeló incubándola a una temperatura de 37°C durante 40 minutos en baño maría. Se realizaron diluciones décuples seriadas (450 µl de diluyente y 50 µl de soluto), inoculando 100 µl en placas de agar 7H11 a partir de la dilución 10<sup>-3</sup> a la 10<sup>-5</sup> por triplicado. Las placas se incubaron durante 3 a 4 semanas a una temperatura de 37°C. El conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) se realizó obteniendo la cantidad de UFC por ml, aplicando la siguiente ecuación.

$$(UFC)(FD)(10) = \text{bacterias/ml}$$

UFC= unidades formadoras de colonias

FD= factor de dilución

## **5.2 Aislamiento de monocitos derivados de sangre periférica.**

Los bovinos donadores provinieron de un hato considerado libre de tuberculosis que pertenece al Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. De forma aséptica se colectaron 30 ml de sangre con anticoagulante ácido cítrico-dextrosa (ACD) a una proporción de 4.0 ml por cada 30 ml de sangre y se procesaron en las primeras 4 horas a partir de su recolección.

La sangre se diluyó 1:1 con PBS citrato (PBSc) en 2 tubos de polipropileno de 50 ml obteniendo un volumen final de 30 ml de sangre en cada tubo. La sangre se procesó por centrifugación isopícnica utilizando un gradiente de Percoll (ver anexo 1) con un índice de refracción final de 1.3460. La sangre se depositó deslizándola por las paredes del tubo para evitar que se mezclara con el Percoll y se centrifugó a 1380 X g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al final de la centrifugación se observa la separación de cuatro fases compuestas por eritrocitos, Percoll, leucocitos y plasma.

Se removió 20 ml de plasma de cada tubo, a otro tubo de polipropileno de 50 ml para su uso en lavados, la capa flogística se colectó en otro tubo, cuidando de retirar la menor cantidad de Percoll, agregando c.b.p. 20 ml de plasma y c.b.p. 50 ml de PBSc, posteriormente se centrifugó a 500 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó, cuidando no remover la pastilla celular resuspendiendo en 20 ml de plasma y c.b.p 50 ml de PBSc para centrifugarlo a 500 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente 2 veces. Se desechó el sobrenadante para resuspender la pastilla celular en 12 ml de medio CRPMI adicionado con 4% suero autólogo (SA). El cual se colectó de una manera aséptica a partir de sangre en tubos para vacutainer sin anticoagulante centrifugando 10 minutos a 200X g para separarlo. Se preparó en 44 ml de CRPMI, 6 ml de suero autólogo y se esterilizó por medio de filtración con un poro de 20  $\mu$ m en un tubo de propileno de 50 ml. La suspensión celular se transfirió a un matraz recubierto con teflón, con una capacidad de 50 ml e incubó a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad las primeras 48 horas para permitir la adhesión de los monocitos, las células que no se adhirieron fueron removidas por medio de lavados, los monocitos adheridos fueron cultivadas durante 13 días cambiando el medio cada 4 días para obtener una población homogénea de macrófagos con medio CRPMI 12 % SA.

La obtención se realizó en el día 13, los matraces se colocaron en una cama de hielo durante 30 minutos. Las células se removieron golpeando la base del matraz contra una

superficie sólida. La suspensión de células se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml, y se realizó el conteo con un hemocitómetro. El número de células se obtuvo aplicando la siguiente fórmula.

$(a)(10^4)(b) = \text{Total de macrófagos}$

a= promedio de células contadas

b= ml de medio en que están suspendidas

Las células se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  de células y se depositaron  $10 \mu\text{l}$  en tres pozos de cada una de dos placas de Terasaki (Nunclon, Nunc Brand products, Nalge Nunc International, Denmark Denmark) obteniendo un total de  $1 \times 10^4$  células por pozo. Las placas se centrifugaron a  $1200 \times g$  y se depositó una gota de agua destilada estéril en cada una de las esquinas para evitar la deshidratación de las células. Las placas se incubaron toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  a una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  y humedad.

### **5.3 Ensayo bactericida**

El inóculo bacteriano se descongeló de la forma ya descrita y se centrifugó a 3300 X *g* durante 10 minutos para finalmente ajustar la concentración bacteriana a  $2 \times 10^4$  bacterias/ $\mu\text{l}$  para cada una de las cepas.

Se retiró el agua de las esquinas de cada placa de Terasaki, así como el medio de los pozos para inmediatamente adicionar 5  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana ( $1 \times 10^4$ ) para alcanzar una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. De igual manera se agregaron 5  $\mu\text{l}$  a 2 pozos sin células los cuales sirvieron como control del inóculo. Las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 300 X *g* agregando una gota de agua destilada estéril en cada una de las esquinas de ambas placas para incubarlas 4 horas en las mismas condiciones.

#### **5.3.1 Control inóculo**

Se tomaron 5  $\mu\text{l}$  del inóculo con el que se infectaron los macrófagos y se depositó en un tubo con 197  $\mu\text{l}$  de PBS 1X, para realizar diluciones décuples seriadas y sembrar las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en cajas de petri con agar 7H11 para verificar la concentración bacteriana.

#### **5.3.2 Evaluación del tiempo 0 ( $T_0$ )**

Transcurridas 4 horas que es el tiempo determinado para que los macrófagos fagociten a las bacterias, se retiró el medio de cada uno de los pozos excepto el del pozo con bacterias y se realizaron 5 lavados con 10 $\mu\text{l}$  de CRPMI a cada uno de los pozos para retirar las bacterias que no fueron fagocitadas ni adheridas a los macrófagos, para la placa del  $T_1$  se depositaron 10  $\mu\text{l}$  de medio fresco en cada uno de los pozos excepto en el testigo incubando en las mismas condiciones durante 24 horas. Para determinar el porcentaje de bacterias fagocitadas en la placa correspondiente al  $T_0$ , las células se lisaron al incubarlas con Tween 20 al 0.5% en una cantidad de 10  $\mu\text{l}$  por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente, el contenido de cada pozo, así como 2 lavados adicionales fueron transferidos a un tubo con 170 $\mu\text{l}$  de PBS obteniéndose un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  y se realizaron diluciones décuples seriadas, sembrándose 100 $\mu\text{l}$  en placas con medio 7H11 enriquecido con 10% OADC. Las placas se incubaron durante 3 o 4 semanas a una temperatura de 37°C.

### 5.3.3 Evaluación del Tiempo1 (T<sub>1</sub>)

Después de incubar 24 horas se depositó el contenido de cada uno de los pozos en tubos para diluciones conteniendo 160µl de PBS 1X después se agregó a cada uno de los pozos con células 10µl de Tween 20 al 0.5% y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. El tween 20 se retiró y depositó en tubos de dilución al igual que los 2 lavados con 10 µl de PBS 1X para obtener un volumen final de 200 µl, a partir del cual se hicieron diluciones décuples seriadas inoculando 100 µl de las diluciones 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> de cada uno de los pozos en placas con medio 7 H11 adicionado con 10% de OADC y se incubaron durante 3 a 4 semanas a 37°C para finalmente determinar el número de UFC.

### 5.4 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en forma independiente y los resultados se expresan como la media en porcentaje. Las comparaciones entre medias se evaluaron con la prueba de ANDEVA para el contraste de hipótesis entre más de dos de medias y con la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey. Después del análisis de varianza el valor de  $\alpha$  se fijó en 0.05 para todos los casos. La relación existente entre cada evento se evaluó con un análisis de regresión lineal simple, utilizando el programa SAS System for Windows versión 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) <sup>91</sup>



## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 Evaluación de la fagocitosis

A los resultados obtenidos cuatro horas después de la infección se les considero como fagocitosis. El grado de fagocitosis mostrado para cada cepa fue muy variable. El 50% de las cepas mostró un índice de fagocitosis de 3-4 bacterias/macrófago, 30% de los aislados mostró un índice de 1-2 bacterias por macrófago, mientras que el índice para el 20% restante fue menor a una bacteria por macrófago (Cuadro 1).

Cuadro 1. Promedio de los porcentajes de fagocitosis, Crecimiento intracelular y Supervivencia intracelular de cepas de *Mycobacterium bovis*

Cepa	Lugar	Fagocitosis	Crecimiento	Supvncia
9917	Jalisco	327.00	418.50	129.28
9920	Jalisco	341.67	382.00	111.55
9918	Jalisco	415.33	444.67	107.01
9926	Jalisco	743.00	773.00	104.04
9916	Jalisco	322.33	249.33	80.56
9927	Jalisco	367.50	277.00	75.63
9923	Jalisco	336.00	247.67	73.66
9930	Jalisco	120.00	72.67	128.23
9914	Jalisco	175.50	62.00	35.60
9524	Edo de Mex	138.50	244.50	183.97
CO3	Edo de Mex	26.67	34.67	128.23
CO5	Edo de Mex	47.67	43.67	98.14
9563	Edo de Mex	165.00	85.33	53.19
163QP	Qro	127.00	201.00	158.62
129QP	Qro	86.67	97.33	111.44
T41C	Torreón	56.50	57.00	101.32
T3	Torreón	123.50	84.00	69.11
9912	Nayarit	221.00	390.00	176.46

### 6.2 Evaluación de la supervivencia intracelular

La supervivencia intracelular fue evaluada 24 horas después de realizar el T<sub>0</sub>. La tasa de supervivencia intracelular observada también mostró una gran variación entre las cepas. En el 60% de la población se encontró una supervivencia intracelular positiva (> a 100%), mientras que en el 40 % de la población el crecimiento bacteriano fue menor al 100%, es decir, el número de bacterias fue menor a la MOI establecida. Los resultados fueron analizados utilizando la prueba de Tukey para identificar la presencia de diferencias significativas entre las cepas (Gráfica 1A, 1B y Figura 1A, 1B).

### Supervivencia intracelular >100%

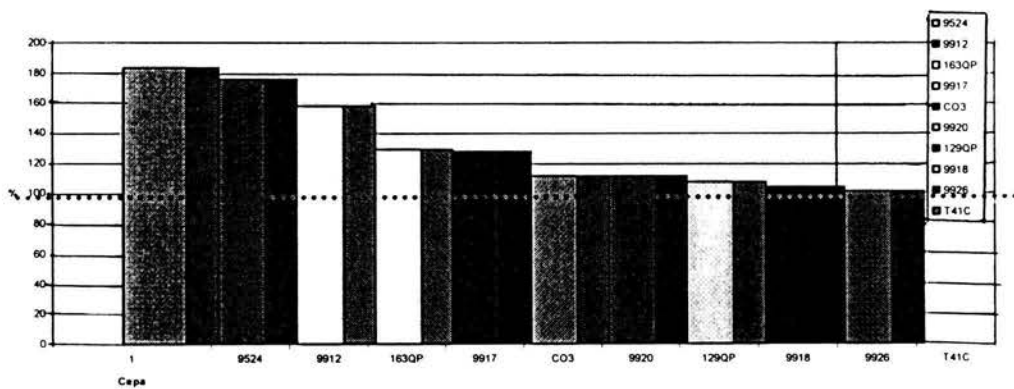


Figura 1A. Cepas con una replicación mayor a 100 % después del T<sub>1</sub> representando el 60% de la población.

### Supervivencia Intracelular <100%

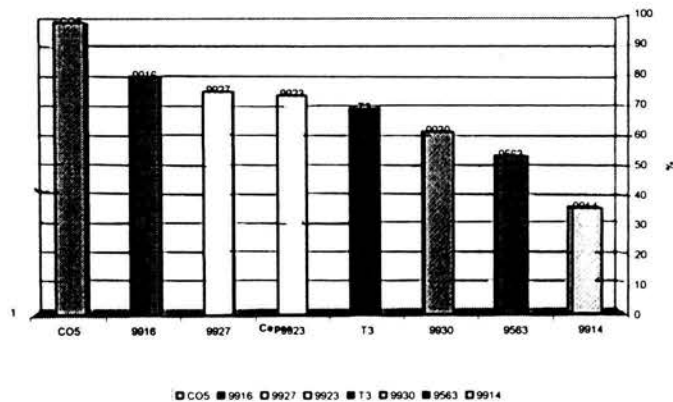


Figura 1B. Cepas con supervivencia menor a 100% representando el 40% de la población.

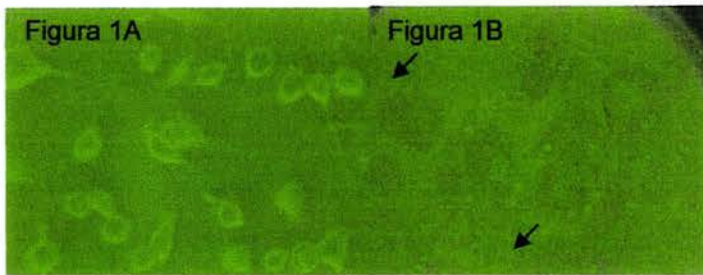
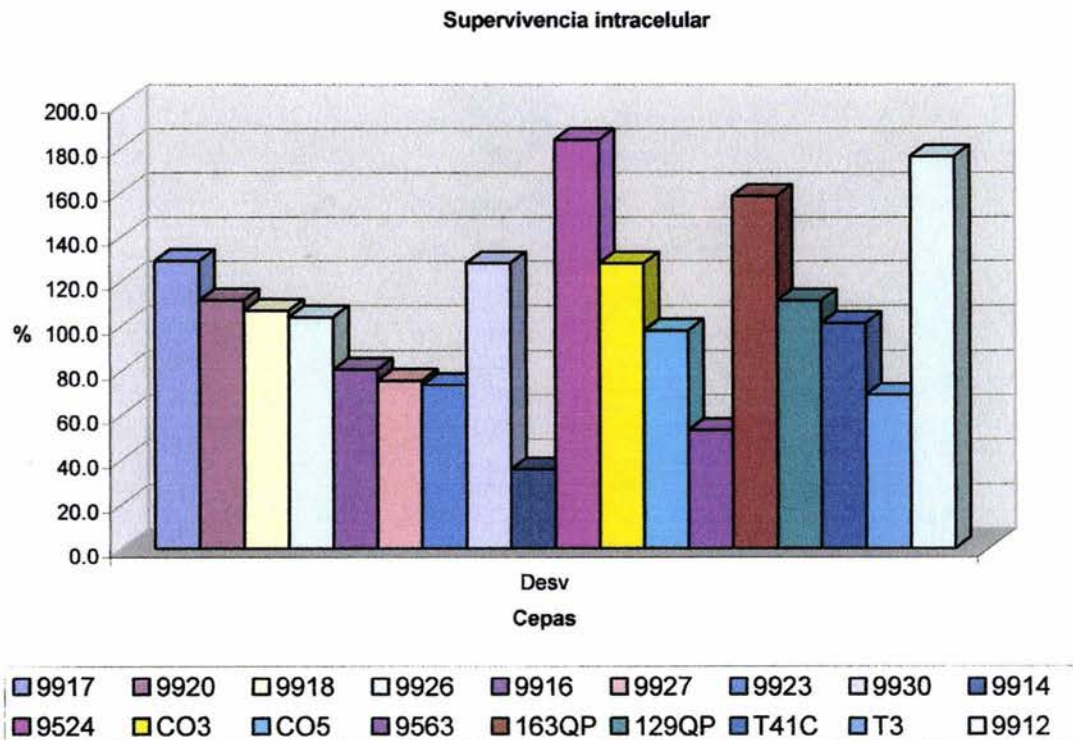


Figura 1A. Macrófagos sin infectar.  
 Figura 1B. Macrófagos T<sub>1</sub> (24 horas postinfección (las flechas indican: micobacterias fuera del macrófago.

Con base en los resultados de ésta prueba las cepas que mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), se incluyeron en 2 grupos. El grupo 1 integra todas las cepas con supervivencia mayor a 111% y hasta 184% no existiendo diferencias estadísticas significativas entre cada una de ellas. Las cepas que pertenecen a este grupo fueron; 9524, 9912, 163QP, 9917, CO3, 9920, 129QP, las cuales representan el 45% de la población total. El grupo 2 asocia a las cepas con supervivencia menor a 110.9% y hasta 35%. Las cepas incluidas en este grupo fueron; 9918, 9926, T41C, C05, 9916, 9927, 9923, T3, 9930, 9563, 9914. Representando al 55% de la población (Gráfica 1).

**GRÁFICA 1. Supervivencia intracelular de cepas de *Mycobacterium bovis***



Los resultados de cada experimento están expresados en porcentajes y como la media de tres repeticiones en donde el 45 % de las cepas muestran una diferencia estadística significativa (encerrado en el recuadro) con respecto al otro 55%.

En cuanto a las variables dependientes (fagocitosis y crecimiento intracelular) se realizó una correlación lineal para observar la influencia de una sobre la otra y entre cada uno de los grupos. La tendencia que existe entre el crecimiento y la supervivencia es positiva, a medida que aumenta el crecimiento intracelular aumenta la supervivencia para cada una de las cepas. Sin embargo, no existió una correlación directa entre la fagocitosis y el crecimiento intracelular y por lo que tampoco es directa para la supervivencia intracelular de cada una de las cepas.

## 7.0 DISCUSIÓN

El género *Mycobacterium* está compuesto por bacterias que presentan una gran diversidad genética, en el trabajo de Sales *et al* (2001) <sup>92</sup> encontraron diversos genotipos para *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* basándose en el polimorfismo de los genes *pncA* y *oxyR*, entre ambos géneros. En otro estudio realizado por Fleischmann *et al* (2001), <sup>90</sup> demostraron la presencia de polimorfismo en numerosos genes de *Mycobacterium tuberculosis* observando que algunos de estos repercuten directamente en la virulencia de este género. Por su parte, Milián Suazo *et al* (2001) <sup>93</sup> evidenciaron la presencia de diferentes genotipos de *M. bovis* en la república mexicana mediante la técnica de tipificación por espaciadores. Los resultados de este estudio muestran de igual forma una gran variación en la fagocitosis y la supervivencia intracelular de las cepas de *M. bovis* estudiadas apoyando de esta forma la hipótesis de la diversidad genética del género *Mycobacterium*.

La entrada de la bacteria a la célula es mediada por receptores, Al existir diferencias estadísticas en cuanto a la fagocitosis, estos resultados nos sugieren que algunas cepas se fagocitan más que otras por lo tanto se puede suponer que es importante la vía de entrada de la bacteria a la célula, ya que existen diferentes formas en la que esta bacteria se puede fagocitar, los principales receptores involucrados en la fagocitosis bacteriana son; de manosa, del complemento CR1, CR3, CR4 y receptores WC1, WC2. <sup>14-17</sup> Algunos de los componentes bacterianos que son reconocidos por estos receptores incluyen a las lipoarabinomananas, el antígeno 85 y la proteína de 19 kDa que son inmunógenos importantes, y pueden ser tal vez la cantidad de éstas estructuras lo que determina la afinidad para la fagocitosis.

Las diferencias estadísticas mostradas en la supervivencia intracelular pueden ser correlacionadas directamente con diferencias en el grado de virulencia para cada grupo antes mencionado ya que se ha observado en el caso de *M. tuberculosis* que existen diferencias en el grado de virulencia y de respuesta inmune dependiendo de la cepa, Zhanh *et al* (1998) <sup>94</sup> establecen un precedente al identificar diferencias fenotípicas para genotipos distintos en macrófagos de humano, ya que comparan dos genotipos distintos obtenidos de pacientes con signologías parecidas encontrando diferencias en los ensayos de supervivencia intracelular. López *et al* (2003) <sup>95</sup> confrontan diferentes genotipos de *Mycobacterium tuberculosis* en tres experimentos distintos en un ensayo microbicida con

macrófagos de ratón, así como un modelo de infección *in vivo*. Sus resultados demuestran que hay diferencias marcadas en la patogenia de la enfermedad cuando comparan distintos genotipos, mientras que la diferencia desapareció cuando utilizaron bacterias del mismo genotipo.

Al existir en este estudio una correlación positiva entre la fagocitosis y la supervivencia intracelular, se puede inferir que las cepas que tuvieron una mayor replicación son más virulentas ya que estarán evadiendo los mecanismos de defensa del macrófago, tal es el caso de las cepas 9524, 9912, 163QP, 9917, CO3, 9920, 129QP y 9918. Esta inferencia se ve apoyada por los resultados de estudios previos donde se utilizaron los ensayos microbicidas con macrófagos de bovinos clasificados como naturalmente resistentes a la infección por *M. bovis*, encontrando que la cepa avirulenta *M. bovis* BCG mostró un 65% de supervivencia en todos los casos, mientras que una cepa virulenta aislada de las lesiones tuberculosas de una vaca mostró una supervivencia de 106% o superior.<sup>96.97</sup> Al combinar ambos resultados, es posible teorizar que la supervivencia intracelular de una cepa puede ser utilizada para predecir la virulencia de las cepas de *M. bovis*. Por lo tanto, se sugiere el uso de los ensayos microbicidas como uno de los parámetros que permitirían identificar el grado de patogenicidad de cepas de *M. bovis* aisladas de lesiones tuberculosas.

En este estudio se encontró una relación directa en el origen geográfico y los porcentajes de fagocitosis, así como de supervivencia intracelular, sobre todo en las cepas provenientes de Jalisco, por lo que se puede suponer que en este caso pueda existir un parecido en el genotipo de éstas cepas. Por lo tanto, sería recomendable genotipificar éstas cepas para investigar esta posibilidad.

Los resultados del presente trabajo demuestran que no existe una correlación directa entre la fagocitosis y la supervivencia intracelular en las diferentes cepas de *Mycobacterium bovis* procedentes de distintos lugares geográficos. Este fenómeno nos puede indicar que cada evento es independiente, es decir las cepas que mejor se fagocitaron no van a replicarse intracelularmente mejor, sino tal vez dependerá de algunas características de las cepas para multiplicarse mejor intracelularmente.

Dentro de las ventajas de este modelo *in vitro* esta la obtención de resultados rápidos al compararlos con una infección experimental, además de ser un método que requiere menor infraestructura al compararlo con infecciones *in vivo*, ya que para enfermedades zoonóticas se necesita de unidades de aislamiento. Otra ventaja que surge de este ensayo es el trabajar con células de la especie en la cual causa mayor impacto por lo que los resultados se aproximan más a la realidad de la enfermedad.

Las desventajas que tiene el modelo es el no contar con una línea celular de macrófagos bovinos por lo que se tienen que aislar las células cada vez que se realiza un ensayo bactericida. Además, en el caso de la tuberculosis bovina para estudiar la fase de persistencia de la enfermedad no se considera útil por la cantidad de eventos celulares que intervienen en este proceso y aunque se ha comprobado que el macrófago en ambas etapas juega un papel importante se ha comprobado que en la fase de persistencia otros tipos celulares son de vital importancia para el transcurso de la patogenia, tal es el caso de los linfocitos y células dendríticas.

## 8.0 CONCLUSIONES

1. Existen diferencias en la fagocitosis de las cepas de *M. bovis*
2. Existen diferencias en cuanto a la supervivencia intracelular de diferentes cepas, provenientes de diferentes lugares geográficos.
3. No hay una correlación directa entre el lugar de origen y la supervivencia intracelular.
4. No existe una correlación directa entre fagocitosis y supervivencia intracelular.
5. Existe relación entre crecimiento intracelular y supervivencia intracelular.
6. El ensayo microbicida se puede utilizar como una de las técnicas *in vitro* para predecir diferencias en el grado de patogenicidad de cepas de *M. bovis*



## 9.0 PERSPECTIVAS

1. Con los resultados obtenidos en este estudio la primera de las estrategias a seguir es saber el origen genético de las cepas, para formar grupos con características filogenéticas parecidas y compararlas con origen geográfico y porcentajes de supervivencia intracelular. Algunas técnicas utilizadas para *Mycobacterium bovis* son el spoligotyping y el RFLP.
2. Otro punto que se debe de cubrir es hacer infecciones *in vivo* para caracterizar la virulencia de cada cepa y compararla con los resultados obtenidos en los ensayos microbicidas midiendo la producción de citocinas e interleucinas en líneas de ratones resistentes y susceptibles
3. Analizar la expresión de genes, tanto de la bacteria hacia el hospedero, así como del hospedero hacia la bacteria, en infecciones *in vitro*.
4. Evaluar si la vía fagocítica es determinante en la resistencia o susceptibilidad del hospedero.

## 10.0 LITERATURA CITADA

1. Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med* 1997;18:65–77.
2. Zink RA, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich G. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2003;Jan:359–367.
3. Romero HC. La tuberculosis en la época del romanticismo europeo: Un recorrido literario. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2000;13:63-64.
4. NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). 3-Agosto-1996.
5. Valdespino OJR. Pérdidas por desecho prematuro de vacas en un hato lechero en México. *Revista Mundial de Zootecnia-FAO* 1993;74/75:64.
6. Wayne MDE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of Tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California Sur Region. *Pediatrics* 2000;105:1-5.
7. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis (Edinb)* 2001;81:79-86.
8. Neill SD, Menzies FD. Cattle-to cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000;16:92-106.
9. Hardie RM, Watson JM. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol Infect* 1992;109:23-33.
10. Morris RS, Pfeiffer DU Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 1994;40:153-177.
11. Neill SD, Hanna J, O'Brien. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion for tuberculosis cattle. *Vet Microbiol* 1991;28:103-109.
12. Duffield B, Young DA. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Vet Microbiol* 1985;10:193-197.
13. Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 2001;3:249-255.
14. Siamon G. Macrophage function disorders. *Encyclopedia of life sciences* 2001;1-11.
15. Celli J, Finlay B. Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol* 2002;10:5, 232-237.

16. Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage en: Lewis CE, Mc Gee JO'D. The Natural Immune System: The Macrophage. IRL PRESS New York: Oxford University Press, 1992: 3-6, 16-19.
17. Daeron M. Fc receptor biology, *Annu Rev Immunol* 1997;15:203-234.
18. Ezekowits RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM, Uptake of *Pneumocistis carinii* mediated by the macrophage manose receptor. *Nature* 1991;351:155-158
19. Brown EJ. Complement receptors, adhesion, and phagocytosis. *Infect Agents Dis* 1992 Apr;1(2):63-70.
20. Astaire C, Elsa-NoahN, Le Cabec V, Ritting MG, Prandi J Maridonneau I. The manose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses bactericidal response in human macrophages. *Infect Immun* 1999;67:469-477.
21. Mellman I, Fuchs R, Helenius A, Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 1986;55:663-700.
22. Helen L. Collins, Stefan HE, Kaufmann. The many faces host responses to tuberculosis. *Immunology* 2001;103:1-9.
23. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129
24. González-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM, Temporal and spacial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2001;69:1722-1728.
25. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2001
26. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Sounders, 1994: 60-72
27. Roitt Brostoff J, Male D. Immunology. Press in UK. Mosby, 1993: 70-85
28. Tizard IR. Inmunología Veterinaria. México. Mc Graw-Hill, 2002:20-51
29. GatfieldJ, Pieters J, Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria in macrophages *Science* 2000;288:1647-1650.
30. Schorey JS, Carroll MC Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 1997;277:1091-1093.
31. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis latency and reactivation. *Infect Immun* 2001; 4195-4201.

32. Zahrt TC, Deretic V, Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses. Unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis* Antioxi Redox Signal 4 2002;141-159.
33. Costello ED, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF A study cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. Vet J 1998;155:245-250.
34. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr M. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Infect Dis 2002;186:74-80.
35. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev Sci Tech 2001; 20: 21-54
36. Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology 2002 Oct;148(Pt 10):2919-28.
37. Carter GR, Chengappa MM. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Fourth edition 1986.
38. McKinney J, Höner KB, Muñoz-Elias J, Miczak A, Chen B, Chan T, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs WR, Rusell DG. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxilate shunt enzyme isocitrate lyase. Nature 2000;406:735-738.
39. Milner R, Stottmeier K. Formaldehyde: a photothermal activated toxic substance produced in middelbrook 7H10 medium. Am Rev Respir Dis 1969;99:603-607.
40. Dubos J, Davis D. Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Reseach 1946.
41. Kilburn J, Stottmeier K, Kubica G. Aspartic acid as a precursor for niacin synthesis by tubercle bacilli grown on 7H10 agar medium. Am J Clin Pathol 1968;50:582-586.
42. Mitchison DA., Allen B. W, Carrol L., Dickinson JM Aber VR. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. J Med Microbiol 1971;5:165-175.
43. Cohn ML, Waggoner R, McClathy J. The 7H11 medium for the cultivation of *Mycobacteria*. Am J Clin Pathol 1968;98:295-296.
44. Marcinkeviciene, J. A., R. S. Magliozzo, and J. S. Blanchard. Purification and characterization of the *Mycobacterium smegmatis* catalase-peroxidase involved in isoniazid activation. J Biol Chem 1995;38:22290–22295.

45. Wilson TM, de Lisle GW, Collins DM. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol Microb* 1995;15:1009–1015.
46. Li, Kelley ZC, Collins F, Rouse D, Morris S. Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* 1998;177:1030–1035.
47. Dussurget, O, Stewart G, Neyrolles O, Pescher P, Young D, Marchal G. Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxidedismutase. *Infect Immun* 2001;69:529–533.
48. Piddington, Fang, Laessig T, Cooper M, Orme IM, Buchmeier NA. Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infect Immun* 2001;69:4980–4987.
49. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu Y, Hickey MJ, Sherman DR, Barry III CE. The 16-kDa  $\alpha$ -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9578–9583.
50. Yuan Y, Crane DD, Barry III CE. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 1996;178:4484–4492.
51. Harth G, Horwitz MA. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy in vivo. *Infect Immun* 2003;71:456–464.
52. Harth G, Horwitz MA. An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. *J Exp Med* 1999;189:1425–1436.
53. Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J.
54. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285:732–736.
55. Hickman, S. P., J. Chan, and P. Salgame. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol* 2002;168:4636–4642.

56. Noss E H, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2001;167:910–918.
57. Berthet FX, Lagranderie M, Gounon P, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Chavarot P, Thouron F, Maranghi E, Pelicic V, Portnoi D, Marchal G, Gicquel B. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science* 1998;282:759–762.
58. Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol* 2002;4:9–19.
59. Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999;34:257–267.
60. Cox JS, Chen BM, MacNeil M, Jacobs WR. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999;402: 79–83.
61. Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daffe M, Guilhot C. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* 2001;276:19845–19854.
62. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 1997;276:1420–1422.
63. Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect. Immun.* 2000;68: 767–778.
64. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13853–13858.

65. Senaratne RH, Mobasher H, Papavinasasundaram KG, Jenner P, Lea EJ, and Draper P. Expression of a gene for a porin-like protein of the *OmpA* family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* 1998;180:3541–3547.
66. Raynaud C, Papavinasasundaram KG, Speight RA, Springer B, Sander P, Bottger EC, Colston MJ, Draper P. The functions of OmpA Tb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2002;46:191–201.
67. Chan J, Ran X, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* 1991;59:1755–1761.
68. Rindi L, Fattorini L, Bonanni D, Iona E, Freer G, Tan D, Deho G, Orefici G, Garzelli C. Involvement of the *fadD33* gene in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the liver of BALB/c mice. *Microbiology* 2002;148:3873–3880.
69. Dubnau E, Fontan P, Manganelli R, Soares-Appel S, Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages. *Infect Immun* 2002;70:2787–2795.
70. Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B, and M. Jackson. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2002;45:203–217.
71. Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, Russell RG, Derrick S, Collins FM, Morris SL, Jacobs WR. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 2002;8:1171–1174.
72. McAdam RA, Weisbrod TR, Martin J, Scuderi JD, Brown AM, Cirillo JD, Bloom BR, Jacobs WR. In vivo growth characteristics of leucine and methionine auxotrophic mutants of *Mycobacterium bovis* BCG generated by transposon mutagenesis. *Infect Immun* 1995;63:1004–1012.
73. Bange FC, Brown AM, Jacobs WR. Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. *Infect Immun* 1996;64:1794–1799.
74. Parish TB, Gordhan G, McAdam RA, Duncan K, Mizrahi V, Stoker NG. Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination. *Microbiology* 1999;145:3497–3503
75. Smith DA, Parish T, Stoker NG, Bancroft GJ. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* 2001;69:1142–1150.

76. Buchmeier NA, Blanc-Potard, Ehrh S, Piddington D, Riley L, Groisman EA. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2000;35:1375–1382.
77. Moncrief MB, Maguire ME. Magnesium and the role of MgtC in growth of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1998;66:3802–3809.
78. Litwin CM, Calderwood SB. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:137–149.
79. Fritz CS, Maass, Kreft A, Bange FC. Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infect Immun* 2002;70:286–291.
80. Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 1997;272:13326-13331.
81. Zerial M. Stenmark h, Rab GTPases in vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:613-620.
82. Ferrari G, Naito M, Langen H, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 1999;97:435-447.
83. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. *Vet Microbiol* 1994;40:111-124.
84. Inwald J, Hinds J, Palmer S, Dale J, Butcher PD, Hewinson RG, Gordon SV. Genomic analysis of mycobacterium tuberculosis complex strains used for production of purified protein derivate. *J Clin Microbiol* 2003;39:29-3935.
85. Durr PA, Hewinson RS, Clifton- Hadley. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2000 19; 3:675-688.
86. Graham RS, Robertson DB, Young DB. Tuberculosis a problem with the persistence. *Nature Reviews* 2003;1:97-105
87. Campbell GA., Adams L.G. 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..
88. Campbell GA, Adams L.G, Sowa BA. Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;41:295-306.



89. Adams GL. Natural Disease resistance in domestic animal with emphasis on intracellular bacterial diseases: functional and genetic basis. Academia Veterinaria A.C. 1996.
90. Flesischmann RD, Allan D, *et al.*, Whole-Genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol 2002;184:5479-5490.
91. Daniel Wayne W. Bioestadística. Limusa. México, 1980.
92. Sales MPU, Taylor GM, Hughes S, Yates M, Hewinson G, Young DB, Shaw RJ. Genetic diversity among *Mycobacterium bovis* isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. J Clin Microbiol 2001;39:4558-4562 .
93. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando, Huygen K, Van Soolingen D. A marked differences in pathogenesis and inmune response induced by different mycobacterium tuberculosis genotypes. Clin Exp Immunol 2003;133:30-37.
94. Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. Enhanced capacity of Widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages JID 1999;179:1213-1217
95. Milián-Suazo F, Banda-Ruiz V, Ramírez-Casillas C, Arriaga-Díaz C. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. Prev Vet Med 2002;1688:1-10.
96. Gutiérrez-Pabello JA. Apoptosis and differential gene expression of *Mycobacterium bovis* infected bovine macrophages. Phd thesis. Texas A&M University College of Veterinary Medicine. U.S.A Texas 1999.
97. 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. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.

## Anexo 1

### PERCOLL-STOCK

Percoll comercial <sup>1</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 necesitó una suspensión de Percoll con una gravedad específica similar a la de las células a separar.

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

Las sustancias o soluciones que son 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	GE	=	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  $\pm 0.0001$ .

<sup>1</sup> Percoll®. Pharmacia Biotech AB.Uppsala, Suiza. Código No. 17-0891-01.

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:

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

donde:

X= ml de PBS por ml de suspensión final

a = GE del PBS - 1

b = GE de la BSA - 1

c = GE del Citrato - 1

d = GE del Percoll -1

Determinar los volúmenes de cada sustancia:

Volumen

en ml

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

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

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

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

## **Anexo 2**

### **SOLUCIONES.**

#### **ANTICOAGULANTE ACD**

Citrato trisódico	22.0	gs
Acido cítrico	8.0	gs
Glucosa (dextrosa)	24.5	gs
Agua destilada c.b.p.	1000.0	ml

pH inicial 5.0

Esterilizar por filtrado en poro de 22 $\mu$ m.

#### **PBS 10 X**

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

Esterilizar por filtrado en poro de 22 $\mu$ m.

#### **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	gs
Agua mQ c.b.p.	1000.0	ml

0

Esterilizar por filtrado en poro de 22 $\mu$ m.

#### **PBS-CITRATO**

PBS 10 X	100.00	ml
Acido cítrico trisódico	3.72	gs
Agua c.b.p.	1000.0	ml

0

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

**NaCl 1.5 M + NaH<sub>2</sub>**

Cloruro de sodio	8.77	gs
Fosfato se sodio monobásico	1.20	gs
Agua c.b.p.	100.00	ml

**CRPMI**

RPMI medium 1640 <sup>2</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

Esterilizar por filtrado en poro de 22µm.

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

Albúmina sérica bovina cristalina	50.0	gs
Agua destilada estéril c.b.p.	1000.0	ml

Esterilizar por filtrado en poro de 22µm.

**TWEEN 20 AL 0.5%**

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

Esterilizar por filtrado en poro de 22µm.

**PERCOLL-STOCK**

Percoll comercial <sup>3</sup>	10	parte
		s
NaCl 1.5 M + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	parte

<sup>2</sup> Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA

<sup>3</sup> Percoll®. Pharmacia Biotech AB.Uppsala, Suiza. Código No. 17-0891-01.

## 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
Cloruro de sodio	$NaCl$	SIGMA	S-3014
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
Piruvato de sodio	$C_3H_3O_3 \cdot Na$	GIBCO	11360-070
Tween <sub>20</sub>	No disponible	SIGMA	P-2287
Tween <sub>80</sub>	No disponible	SIGMA	P-4780