



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SOBREVIVENCIA Y MULTIPLICIDAD DE  
DIFERENTES SUBCEPAS DE *Mycobacterium  
bovis* BCG EN MACRÓFAGOS DE LA LÍNEA  
THP-I**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:  
GABRIELA MOLINA OLVERA**



**MÉXICO, D. F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

**VOCAL:** GONZALO CASTILLO ROJAS

**SECRETARIO:** ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL

**1ER. SUPLENTE:** LAURA CECILIA BONIFAZ ALONSO

**2° SUPLENTE:** LUCIANO HERNÁNDEZ GOMEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** PROGRAMA DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR MICROBIANA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**ASESOR DEL TEMA:** M. EN C. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL

---

**SUPERVISOR TÉCNICO:** DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

---

**SUSTENTANTE:** MOLINA OLVERA GABRIELA

---

## RESÚMEN

La tuberculosis es una enfermedad crónica y se estima que un tercio de la población mundial está infectado con el bacilo tuberculoso. Actualmente, el único tratamiento para prevenir este padecimiento es la vacuna de *Mycobacterium bovis* BCG que ha sufrido cambios tanto fenotípicos como genotípicos. Diversos estudios han demostrado que la protección que confiere puede depender de la subcepa empleada, además de otros factores, pero sólo se enfocan en la respuesta inmune adquirida, la cual depende de la sobrevivencia del bacilo en el interior de macrófagos. **Objetivo:** Evaluar la sobrevivencia y multiplicidad de seis subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG en macrófagos humanos. **Metodología:** Macrófagos humanos provenientes de la línea celular THP-1 se infectaron con las subcepas BCG Moreau, Japón, Danesa, Tice, Phipps y México con un índice de Multiplicidad de 1:10. Se determinaron las bacterias viables a las 4 y 72h post-infección por ensayo de cuantificación de ATP, a la par se cuantificó la concentración de nitritos en el sobrenadante. **Resultados:** La subcepa BCG México fue fagocitada preferentemente pero no persistió en el macrófago, al contrario, la subcepa Phipps se fagocitó en menor proporción y presentó mayor índice de multiplicidad. Tres de las subcepas se multiplicaron con eficiencia por lo que se requiere de mayor producción de nitritos por parte de los macrófagos. **Conclusiones:** Existen variaciones en la sobrevivencia y multiplicidad entre las seis subcepas BCG estudiadas en macrófagos, presentando la subcepa Phipps una mayor multiplicidad. Además, la activación del Estallido Respiratorio, medido por la producción de nitritos por macrófagos infectados con las subcepa BCG Japón, Danesa y Phipps es mayor que con la infección por BCG Moreau, Tice y México.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por la oportunidad de formar parte de su equipo, por la asesoría y confianza brindada para la realización de este tema.

A la Dra. Antonia Castillo Rodal por el apoyo, orientación, confianza, paciencia y cuidado no sólo académicamente. Muchísimas gracias por todo.

Al Dr. Hugo Esquivel Solís por su guía, consejos y críticas, por la gran paciencia y atención brindadas.

A los miembros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana cuyo apoyo ha sido fundamental para la conclusión de este ciclo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la formación académica y personal brindadas.

El proyecto fue financiado por los proyectos: DGAPA-PAPIIT IN209708, CONACyT SALUD-2007-C01-68729.

Durante la realización de la tesis gocé de una beca concedida por el Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas del Macroproyecto “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública” dentro de la línea de investigación ENFERMEDADES INFECCIOSAS 10 SDEI.PTID.05.4.

## DEDICATORIAS

**A mi madre y hermana, porque este logro es nuestro. Por su amor, paciencia y consejos, por escucharme sin tener idea de lo que estaba diciendo, por creer en mis ideales. Pet eres mi más grande apoyo y mi mejor amiga, te quiero.**

**A mi familia, por el tiempo que no estuve con ustedes. Nury, gracias por David, mi pequeño motorcito, quien siempre me saca una sonrisa.**

**Por darme otra visión del entorno, por dejar que entrara en tu vida y por llenar la mía... Xiúhnel, gracias por todo, te amo!**

### **A los buenos químicos:**

**Karen, valedora, sé que sin esa mancuerna esto sería más difícil... o peor. Agradezco que seas diferente, por eso me entiendes.**

**Carlos y Rox, amigos realmente dentro y fuera de clase. Hicieron tan ameno todo que hasta los extrañé.**

**Sebas, Patt y Lupita, gracias por tener siempre una sonrisa y un consejo, por hacer que razonara.**

### **A los malos químicos:**

**Frank, por ser tal cual, nocivo para mi salud física y mental.**

**Juanjo, Francisco, Gez y Carlitos, por sonsacarme al jolgorio.**

## ÍNDICE GENERAL

	Pág
RESÚMEN	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL	IV
ABREVIATURAS	V
INTRODUCCIÓN	1
Epidemiología	2
Género <i>Mycobacterium</i>	3
Respuesta del Sistema Inmune Innato asociada a la infección de micobacterias	5
Mecanismos de evasión de la fagocitosis	11
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	12
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO	18
Objetivos Particulares	18
METODOLOGÍA	19
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS	34
ANEXO	39

## ABREVIATURAS

%	Por ciento
·ON	Óxido nítrico
°C	Grados Celsius
AMP	Adenosín Monofosfato
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
araLAM	Arabinosa-Lipoarabinomanana
BAAR	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
BCG	Bacilo de Calmette y Güerin
cAMP	Adenosín Monofosfato cíclico
CD	Molécula de diferenciación celular
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cu <sup>2+</sup>	Cobre (II)
D.O.	Densidad óptica
DU	Unidad Duplicada
EEA1	Molécula de Unión Específica Antígeno Endosomal Específico
Fas-L	Ligando de la proteína Fas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
h	Horas
IFN-γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltones
LAM	Lipoarabinomanana
LAM Pi	Lipoaraboinomanana fosforilada
LBP	Proteína de unión a Lipopolisacárido

LPS	Lipopolisacárido
LM	Lipomanana
manLAM	Manosa-Lipoarabinomanana
$\mu\text{m}$	Micrómetros
MPO	Mieloperoxidasa
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NK	Células asesinas naturales
$\text{NO}^{2-}$	Nitrito
$\text{NO}^{3-}$	Nitrato
$\text{O}^{2-}$	Superóxido
$\text{OH}^-$	Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PI(3)P	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PIM	Fosfatidilinositol manósido
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RD	Región Delatada
SapM	Fosfatasa ácida de M tuberculosis de 28 kDa
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SOD	Superóxido Dismutasa
TB	Tuberculosis
T CD4+	Linfocitos T citotóxicos positivos para el marcador CD4
T CD8+	Linfocitos T citotóxicos positivos para el marcador CD8
Th1	Células T cooperadoras tipo 1
TLR	Receptor tipo Toll

TNFR1	Receptor 1 para TNF
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Vsp34	Proteína de clasificación vacuolar 34

## INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, que afecta gravemente a la población mundial. Más de 2000 millones de personas (un tercio de la población mundial) están infectadas por el bacilo de la tuberculosis. Cada persona enferma es capaz de infectar en promedio de 10 a 15 personas al año, por lo que cada segundo se produce una nueva infección y cada 20 segundos muere una persona por tuberculosis a pesar de tratarse de una enfermedad prevenible y con tratamiento efectivo [WHO 2009].

Las micobacteriosis continúan siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, especialmente en países con estrato socioeconómico bajo. Los factores que impiden el control y/o erradicación de la TB son diversos (factores ambientales, genéticos, desnutrición, alteraciones en el sistema inmunológico y el desarrollo acelerado de farmacorresistencia) [WHO 2009, Solución TB 2010]

Las personas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) presentan un riesgo mayor que la población general para desarrollar la TB al igual que pacientes con diabetes mellitus, ya que presentan alteraciones en su sistema inmune que los hace más susceptibles a las infecciones nuevas, reinfecciones, o reactivaciones que generalmente desarrollan la enfermedad a forma activa grave y con frecuencia la muerte. El binomio SIDA-TB genera el 8% de las muertes ocurridas en personas con SIDA. Debido a las condiciones socioeconómicas que rodean al paciente, el diagnóstico tardío ocasiona que el tratamiento no sea lo suficientemente efectivo, aunado a la alta tasa de bacilos con resistencia primaria o secundaria a los fármacos de elección [Solución TB 2010]

El único tratamiento profiláctico contra esta enfermedad es la vacuna con el bacilo de *Mycobacterium bovis* de Calmette y Güerin (BCG), aunque se ha demostrado por diversos autores que el nivel de protección conferido es variable.

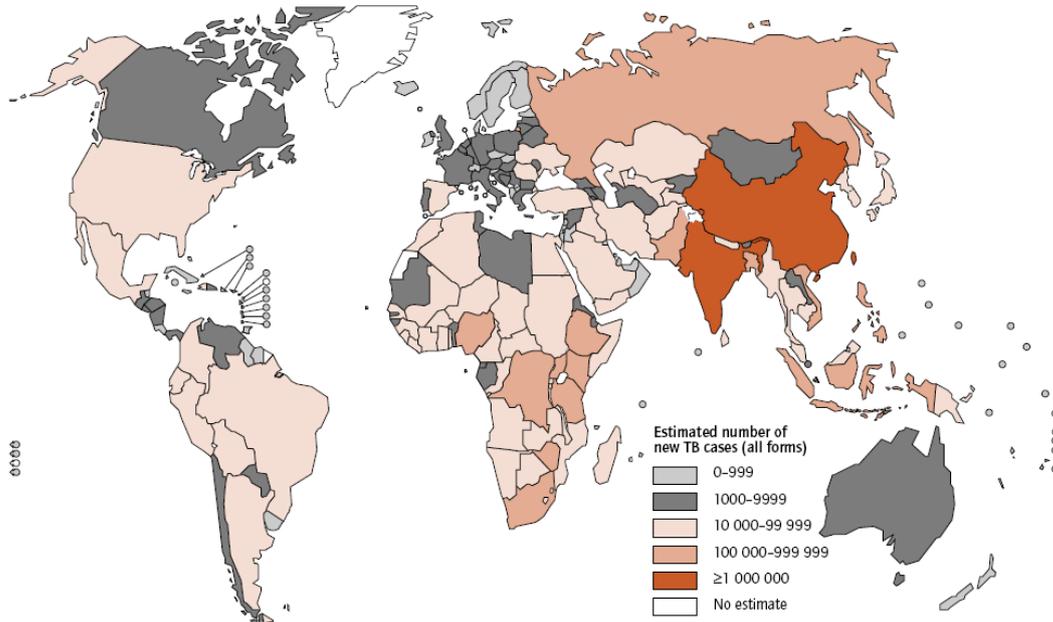
La tuberculosis debe ser combatida de diferentes formas: Contar con un diagnóstico oportuno, con un tratamiento efectivo, contar con medidas que afronten las formas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) tanto de

manera única como en combinación con la infección del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y promover la investigación para una(s) vacuna(s) que asegure la protección efectiva contra esta enfermedad. A pesar de que en los últimos 10 años las aportaciones han sido considerables, los nuevos prototipos de vacunas sustitutas de BCG en la fase 3 no han resultado por mucho, mejor a la BCG [WHO 2009].

## Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que cerca de 9.27 millones de casos nuevos (139 por cada 100 000 habitantes) ocurrieron en 2007 y que la prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial es de 13.72 millones de personas (206 por cada 100 000 habitantes). La mortalidad asociada a esta enfermedad es cercana a 2 millones de personas al año [WHO 2009]. Los países más afectados son aquellos en vías de desarrollo (Figura 1).

Estimated number of new TB cases, by country, 2007



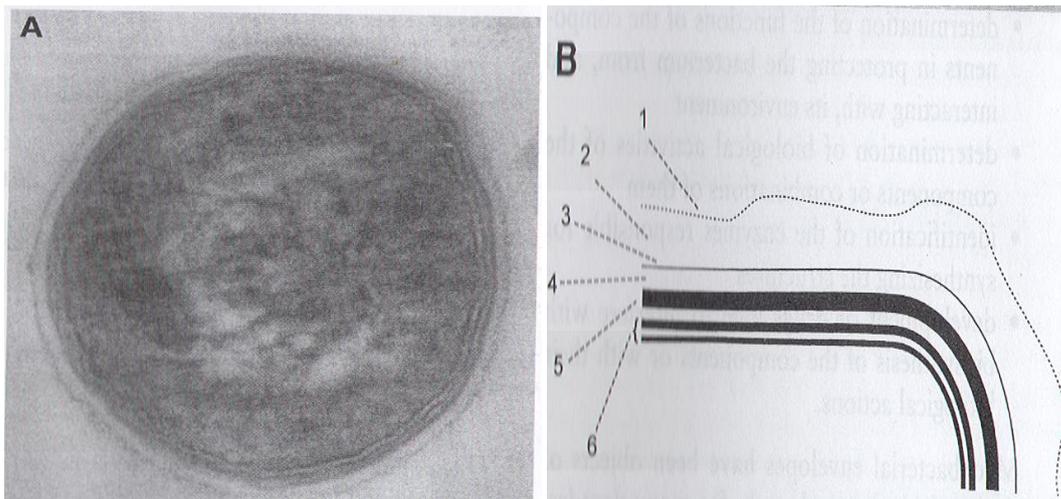
**Figura 1.** Nuevos casos de TB en 2007 [WHO 2009].

De acuerdo al último reporte, en 2009, la incidencia de la TB en México fué de 17 598 casos, de los cuales más del 83% fueron de la forma pulmonar y la muerte por esta enfermedad superó los 2 300 casos en 2008 [Solución TB 2010]

## Género *Mycobacterium*

Ubicado dentro del orden de *Actinomycetales*, la familia *Mycobacteriaceae* está formada por bacilos aerobios inmóviles, no esporulados con un tamaño de 0.2 a 0.6 x 1 a 10 µm y no presentan flagelos [Pfyffer 2003].

Las micobacterias poseen una pared celular compleja con un gran contenido en proteínas, lipoproteínas y carbohidratos, que les confiere una barrera física con alta resistencia a la desecación, a diversos desinfectantes, tinciones comunes, químicos y antibióticos. Debido a esa pared compleja presentan una baja permeabilidad que las hace resistir a la decoloración con alcohol ácido, por lo que se les denomina Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) [Murray 2009].



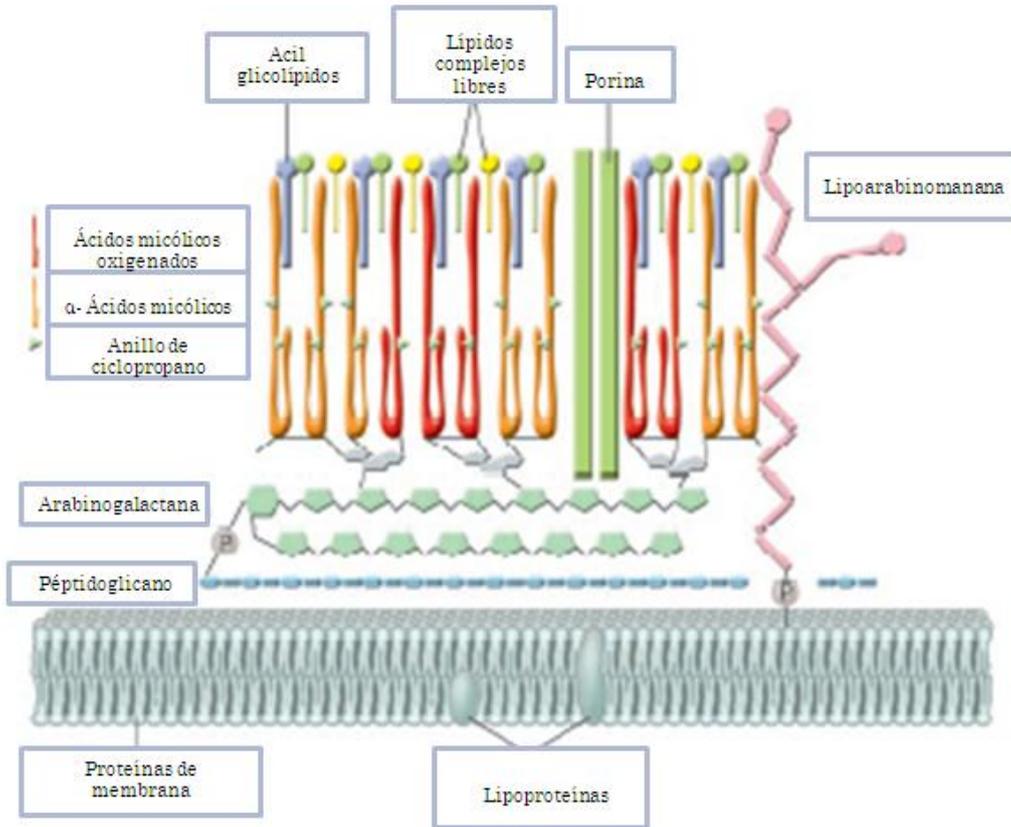
**Figura 2.** Envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* al microscopio electrónico de una sección ultrafina. Cole 2005.

La envoltura de las micobacterias está conformada del exterior al interior por la cápsula externa de lípidos que recubre una segunda cápsula compuesta por polisacárido y proteínas, la tercera es otra capsula de lípidos inmersos y la cuarta envoltura está compuesta por micolatos que probablemente incluya otra capsula de lípidos, la quinta envoltura la constituye el peptidoglicano y arabinogalactana en un estructura aún no muy bien definida, y finalmente, la

sexta en una membrana plasmática triple, de las cuales la más externa tiene un mayor grosor (Figura 2) [Cole 2005]

Otros componentes que se intercalan en la pared celular son porinas y proteínas transportadoras, que constituyen aproximadamente el 15% del peso húmedo de la pared celular [Riley 2006, Fenton 1996, Trivedi 2004]. Con respecto a su peso seco, cerca del 40% del bacilo y 60% de su pared celular se encuentran constituidos por lípidos que se asocian a la pared por cadenas cortas y largas de ácidos grasos que se unen a la membrana interna a través de polisacáridos asociados a la pared externa. Éstos polisacáridos conformados por lipoarabinomanana (LAM), lipomanana, ptiocerol, trealosa-6,6-dimicolato (factor cordón), sulfolípidos y el fosfatidilinositol manosa, se anclan por medio de enlaces fosfodiéster a lo largo de la membrana celular (Figura 3) [Riley 2006].

Las LAM son polisacáridos de gran masa molecular que contienen mezclas heterogéneas de arabinosa y manosa. En la porción externa de la arabinosa terminal de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* BCG existe una envoltura adicional de residuos de manosa (manLAM), mientras que las LAM de micobacterias no patógenas de rápido crecimiento está cubierta con residuos de arabinosa (araLAM) [Fenton 1996]. El estudio de la pared celular es relevante para la especie ya que presenta un factor de virulencia importante.



**Figura 3.** Pared celular de *M. tuberculosis*. Modificado de Riley 2006.

### Respuesta del sistema inmune innato asociada a la infección de micobacterias

La respuesta inmune hacia las micobacterias inicia con la entrada del bacilo al cuerpo ya sea por inhalación, contacto directo a través del tejido que ha perdido su continuidad o vía intradérmica por la vacunación con *M. bovis* BCG.

En el tejido se encuentran células del sistema inmune innato, algunas con actividad fagocítica (monocitos/macrófagos, neutrófilos, etc), que expresan en su superficie diferentes receptores específicos, entre ellos los denominados Toll (2 y 4) que se unen a diversos componentes bacterianos [Bhatt 2007].

En el caso de infección por micobacterias las proteínas de superficie o de secreción por parte de éstas son importantes para la adhesión y posterior invasión a células eucariotas debido a que son capaces de unirse a diversos receptores presentes en las células del hospedero (Tabla 1). Un ejemplo claro

de lo anterior es el complejo antígeno 85, constituido por las proteínas 85A, 85B y 85C, con un peso de 30-32 kDa, que participa en la interacción del bacilo con la superficie de los epitelios y presenta actividad de micoliltransferasa, por lo que se encuentra involucrada en la formación de la trealosa dimicolato (TDM) [Boucau 2009] la cual tiene actividad inmunoestimulante pero en menor proporción que usando la micobacteria viable [Hayashi 2009]. La invasión intracelular a través de receptores de fibronectina, manosa, Toll, entre otros, presentes en los macrófagos [Beatty 2000], También se ha estudiado la actividad biológica de LAM y derivados de diversas micobacterias, encontrándose que araLAM es 100 veces más potente que manLAM capaz de inducir la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en macrófagos [Fenton 1996].

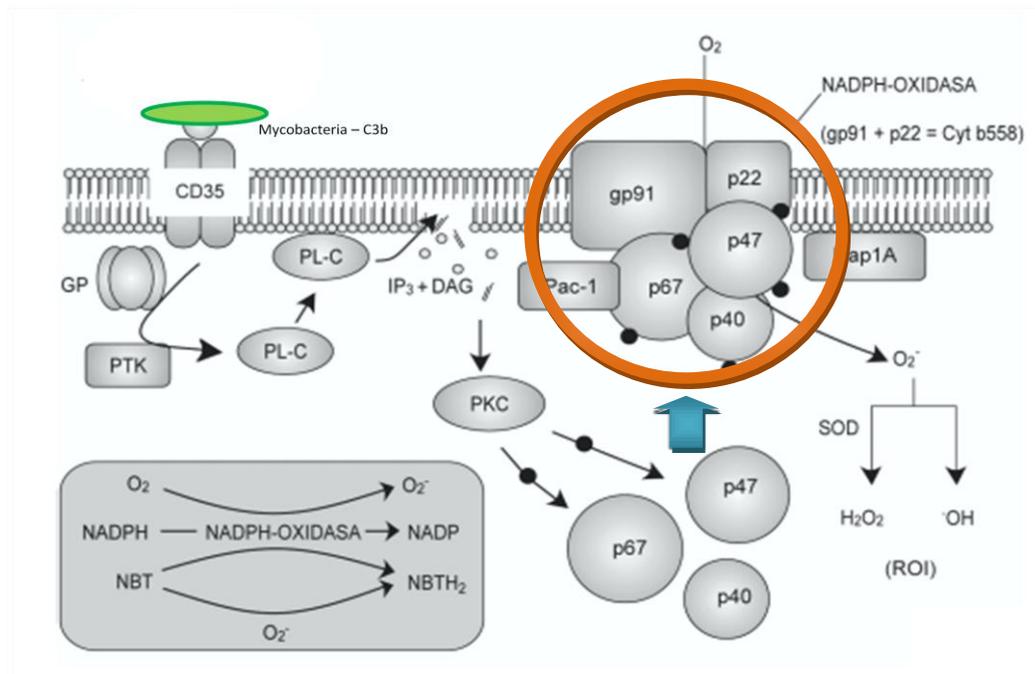
**Tabla 1.** Moléculas micobacterianas y receptores del macrófago implicados en el reconocimiento y fagocitosis.

Receptores en el macrófago	Moléculas micobacterianas
<b>TLR 1/2</b>	LpqH (19kDa)
<b>TLR 2</b>	LAM, PIM, MPT32, ESAT-6
<b>TLR 2/6</b>	Diacil lipopéptidos
<b>TLR 4</b>	LPS
<b>CD14</b>	LPS, LBP
<b>Receptores PAMP</b>	Ácidos micólicos, lipoproteínas, ESAT-6
<b>Receptor de Manosa</b>	LAM, LpqH, PstS-1, MPB83
<b>Receptor de Proteína surfactante A</b>	MPT32
<b>Receptores de Fibronectina</b>	Complejo antígeno 85
<b>Receptores del Complemento</b>	
<b>CR1</b>	C3b unido a carbohidratos y proteínas
<b>CR3</b>	Complejo antígeno 85

\*Tabla construída con información de Dietrich 2009, Bhatt 2007, Wallis 1994 y Díaz-Silvestre 2005.

Inmediato al contacto y reconocimiento entre la célula fagocítica y el microorganismo, se detectan en el fagocito alteraciones bioquímicas que incluyen cambios en el potencial eléctrico de la membrana, producción y liberación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), así como de enzimas lisosomales [Rojas-Espinoza 2003].

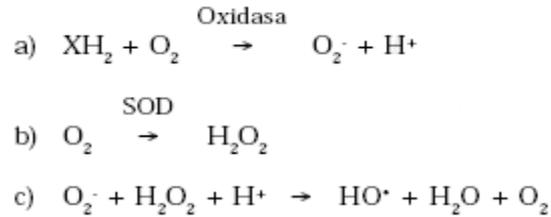
Posterior al reconocimiento del bacilo BCG por el macrófago, se da la endocitosis con cambios oxidativos que induce el incremento en: consumo de oxígeno y glucosa, actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfatadas y la producción de cantidades elevadas de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. A este conjunto de eventos se define como “Estallido respiratorio”. Durante este proceso la enzima nicotinamida adenín dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH oxidasa) se activa selectivamente en la membrana de la vacuola fagocítica y cataliza la reacción:



**Figura 4.** Activación de la NADPH oxidasa. (Rojas-Espinoza 2004)

El componente oxido-reducción (redox) de la NADPH oxidasa es el Flavocitocromo b558 y se localiza en la membrana de gránulos específicos del macrófago (Figura 4). Después de la activación, este citocromo migra hacia la membrana de los fagosomas. El producto primario de la reducción del oxígeno

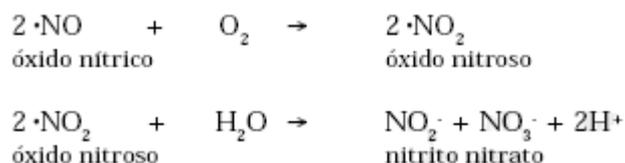
por la NADPH oxidasa es el anión superóxido ( $O_2^-$ ) que se reduce de manera espontánea, o por efecto de la superóxido dismutasa (SOD) y forma el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que genera radicales hidroxilo ( $OH^-$ ).

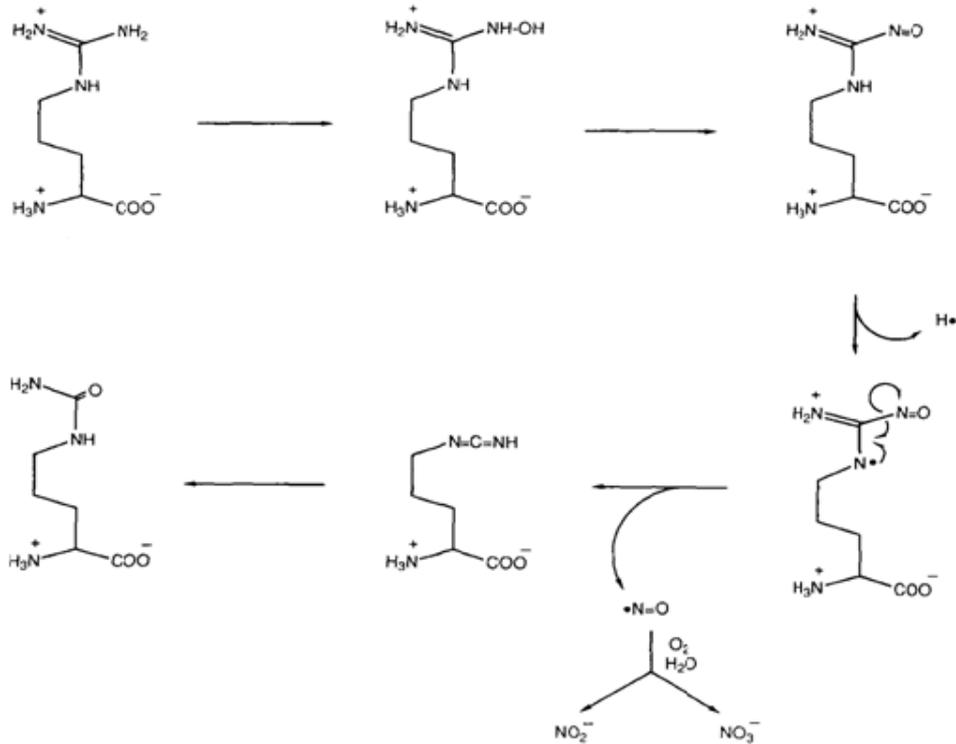


La actividad microbicida del  $H_2O_2$  se incrementa por la mieloperoxidasa (MPO) en presencia de un haluro, aumentando su capacidad para oxidar lípidos membranales, descarboxilar y desaminar proteínas entre otras funciones. El efecto bactericida es mayor a medida que el pH es más ácido (pH 5.0). [Rojas-Espinoza 2003].

Otro mecanismo bactericida de los macrófagos es la producción de óxido nítrico ( $\cdot NO$ ), el cual se genera a partir del metabolismo de L-arginina [Hibbs 1989] y su producción se regula por el interferón gamma ( $IFN-\gamma$ ). El  $\cdot NO$  es un subproducto en la vía de transformación del aminoácido L-arginina a citrulina y un intermediario a los radicales nitrato ( $NO^{2-}$ ) y nitrito ( $NO^{3-}$ ) (Figura 5) [Marletta 1988].

El  $\cdot NO$  inhibe la síntesis de ADN y su actividad respiratoria; por lo que ocasiona la lisis de los microorganismos intracelulares, incluido *M. tuberculosis* [Chan 2001].





**Figura 5.** Mecanismo de reacción para la síntesis de  $\cdot\text{NO}$  (sólo se hace referencia al grupo guanidino de la arginina). Marletta.1988

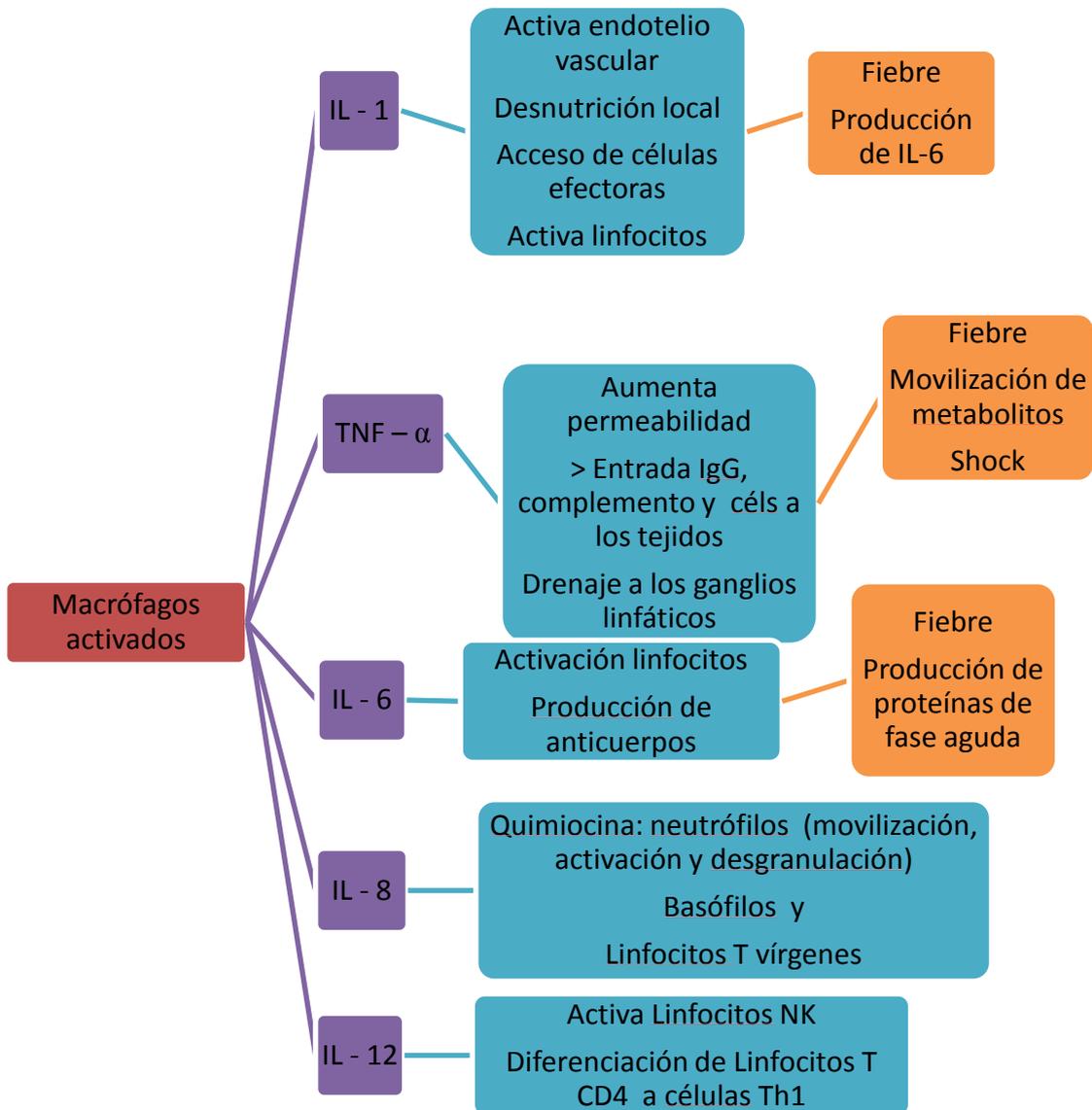
El último mecanismo bactericida lleva a la iodación de la pared celular microbiana y a la producción de aldehídos bactericidas mediante la descarboxilación de aminoácidos o por rompimiento oxidativo de enlaces peptídicos de las proteínas bacterianas [Rojas-Espinoza 2003].

La sobrevivencia y multiplicación de la BCG es esencial en el hospedero para la inducción de una respuesta inmune protectora ya que al ser aplicada la vacuna con bacilos muertos o la administración de antibióticos posterior a la vacunación, la eficacia protectora disminuye de manera importante.

La multiplicación de los bacilos de la vacuna BCG en macrófagos ha sido poco explorada y la respuesta inmune innata es esencial para la eliminación de los patógenos. Un macrófago tiene la capacidad de eliminar microorganismos de forma inmediata, pero en el caso de la vacuna BCG esta debe sobrevivir y multiplicarse para presentar los antígenos a las células T vírgenes e iniciar la respuesta inmune adaptativa efectora.

A la par, en el macrófago se inician señales de transducción que activan al factor de necrosis tumoral beta ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) y la inducción de citocinas y

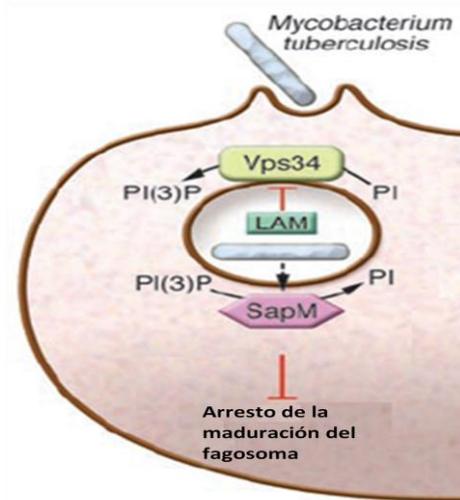
quimiocinas responsables de dirigir la respuesta inmune adaptativa contra el patógeno (Figura 6).



**Figura 6.** Citocinas inflamatorias secretadas por el macrófago (cuadros morados), su función a nivel local (cuadros azules) y sistémico (cuadros naranjas).

### Mecanismos de evasión de la fagocitosis

Durante la fagocitosis, la micobacteria despliega diversos mecanismos para evitar ser lisada, entre éstos está el secuestro del proceso de maduración del fagosoma en una etapa temprana, lo que impide la fusión al lisosoma y por lo tanto el inicio de la acidez del fagolisosoma para activar el estallido respiratorio [Steinberg 2008].



**Figura 7.** Reducción del contenido de PI(3)P en la vacuola fagocítica por la secreción de LAM y SapM por parte de *M. tuberculosis*.

Modificado de Steinberg 2008.

*M. tuberculosis* tiene la capacidad de impedir la fusión fago-lisosoma y para generar un nicho intracelular favorable, la micobacteria despliega diferentes mecanismos y moléculas para su supervivencia, entre ellos secretan LAM, un análogo de fosforo (PI), el cual inhibe la activación de la fosfatidilinositol cinasa de clase III (Vps34), con lo que disminuye la cantidad de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI(3)P) en el interior de la vacuola [Vergne 2003]; por otra parte, secreta una fosfatasa ácida llamada SapM, que convierte a PI(3)P en PI, contribuyendo al arresto fagosomal [Vergne 2005] (Figura 7).

Esta combinación reduce el contenido vacuolar de PI(3)P y así contribuye, por un mecanismo aún no descrito, a la detención de la maduración del fagosoma. [Steinberg 2008, Bhatt 2007].

Otro mecanismo de supervivencia consiste en la inhibición del reclutamiento de la molécula de unión específica antígeno endosomal específica (EEA1) que es necesaria para la fusión fagosoma-lisosoma [Bhatt 2007]. Sin embargo, el fagosoma es capaz de unirse a otras vesículas celulares, lo que le facilita al patógeno el acceso a nutrientes y por tanto, a la multiplicación intracelular [Murray 2009].

Otra forma de eludir la destrucción es por medio de la neutralización de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas por la enzima superóxido dismutasa (SOD) catalasa presente en la membrana externa y

secretada en mayor cantidad durante el crecimiento de las micobacterias [Piddington 2001]. La SOD catalasa es una proteína que requiere de  $\text{Cu}^{2+}$  para catalizar la conversión del superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno [Rojas-Espinoza 2003].

Además de los mecanismos antes descritos, se puede llevar a cabo la apoptosis mediada por receptores como FAS (CD95 ó Apo1) y TNFR1 (CD120a ó p55) cuyos ligandos son FAS- Ligando (FAS-L) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), respectivamente, y la autofagia mediada por INF- $\gamma$  [Gutierrez 2004, Lee 2009].

### ***Mycobacterium bovis* BCG**

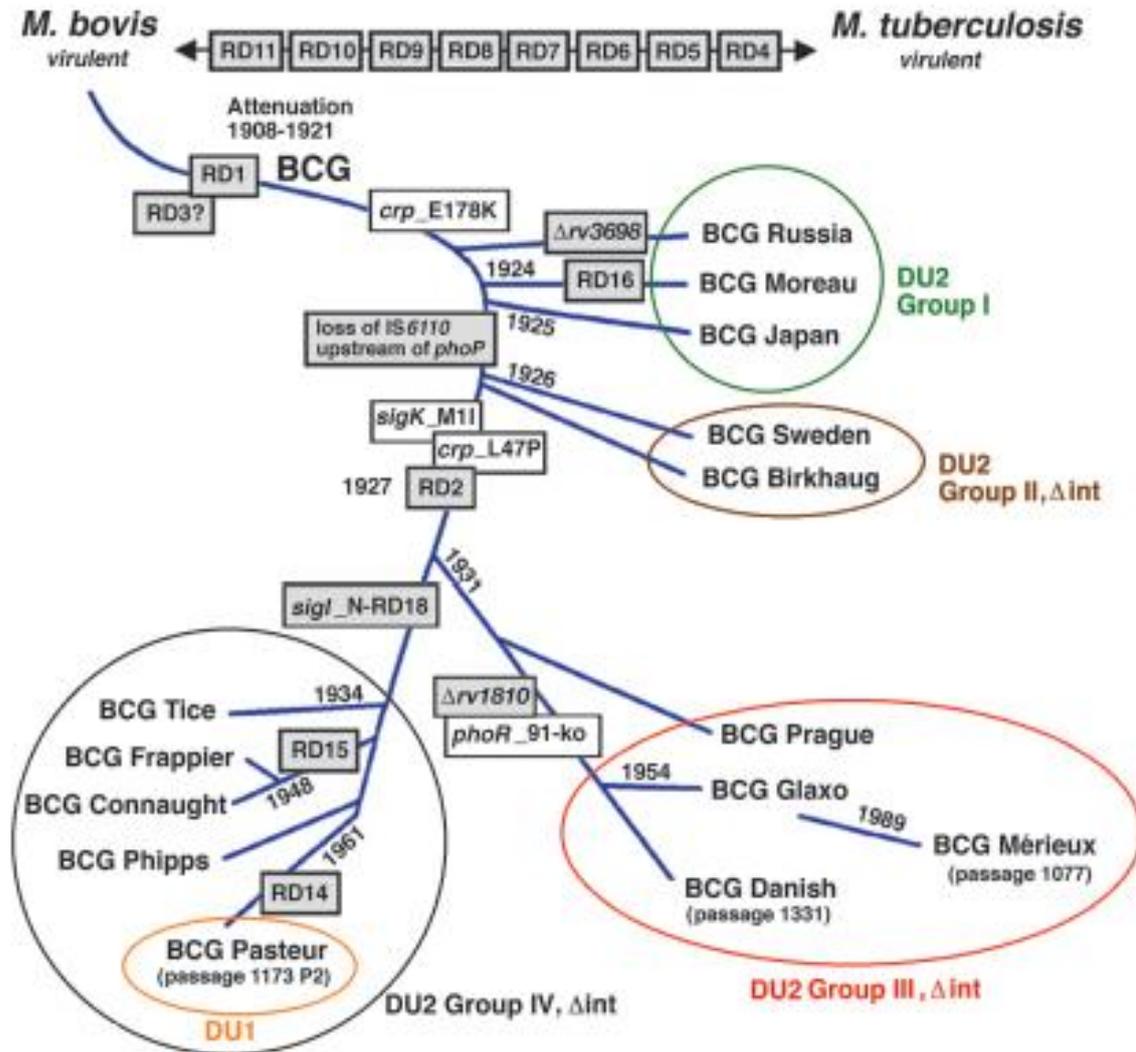
La única vacuna existente para controlar la TB es el bacilo de Calmette y Guerin (*Mycobacterium bovis* BCG). En 1908, Albert Calmette y Camille Guerin, investigadores franceses del Instituto Pasteur, obtuvieron un aislado de *Mycobacterium bovis* a partir de una vaca con mastitis; después de 230 subcultivos durante 13 años en medio de papa, glicerol y sales biliares, lograron la atenuación de esta cepa [Liu 2009]. Estudios posteriores, en diversos modelos animales, evidenciaron una clara disminución de virulencia de la cepa, observando un decremento en la tasa de mortalidad por la tuberculosis generada. Este acontecimiento fue de gran impacto, por lo que en 1921 se aplicó por primera vez a través de la vía oral como vacuna en el humano, para después en 1924 ser distribuida a diferentes países. Posterior a la primera aplicación, la vacuna se distribuyó a diferentes países y algunos de ellos la mantuvieron en medio de cultivo con su composición original (papa, glicerol y sales biliares) pero otros decidieron implementar su propio medio [Oetttinger 1999]. Lo anterior y los múltiples subcultivos que realizaron (entre 1921-1961) para mantenerla dieron lugar a las diferentes propiedades genéticas y fenotípicas que ahora existen, surgiendo así las subcepas BCG [Liu 2009].

Los métodos moleculares, específicamente el microarreglo ha sido de gran utilidad para identificar regiones de diferencia (RD) y regiones duplicadas (DU) en cada subcepa BCG al compararlas genómicamente con *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Con la identificación de estas regiones y la reseña

historica, se contruyó el árbol genealógico de las subcepas BCG (Figura 8) [Behr 2002, Brosh 2007].

Los dos primeros grupos son llamados subcepas “tempranas”, en las que las características de la “auténtica Pasteur” se conservan en mayor proporción por la baja inserción y mutación en el genoma; mientras que los grupos III y IV son subcepas “tardías”. La característica de las subcepas “tardías” es un polimorfismo en el gen *mma3* (involucrado de la biosíntesis de un tipo de ácido micólico) ocurrido entre 1927-1931, por lo que se observa una pérdida en la producción del ácido metoxi-micólico en subcepas posteriores a este periodo [Hayashi 2009].

En la actualidad, sólo dos subcepas BCG han sido secuenciadas: BCG Pasteur 1173P2 y BCG Tokio 172. En ambos casos, el cromosoma circular que presentan tiene más de 4 370 000 pb que codifica para alrededor de 4 000 genes y al compararlo con *M. bovis* se observa que el genoma de esta última es cerca de 30 kb menor. Al compararse entre sí los genomas de ambas subcepas, hay 18 regiones de diferencia con un tamaño mayor a 20 pb [Seki 2009].



**Figura 8.** Genealogía refinada de las vacunas BCG. El esquema muestra la posición de los marcadores genéticos identificados en el trabajo de Brosh y col. en el 2007, marcadores RD, algunas pérdidas específicas y la distribución en cuatro grupos.

Otra diferencia encontrada entre las subcepas BCG es la expresión de proteínas. Al comparar los proteomas de BCG Danesa y BCG Phipps se encontró que esta última expresa proteínas implicadas en respuesta a estrés oxidativo y otras inductoras de respuesta inmune celular, mientras que la BCG Danesa sólo expresa en mayor cantidad una proteína para el plegamiento de proteínas bajo condiciones de estrés [Rodríguez-Álvarez 2009].

La aplicación de la vacuna *M. bovis* BCG en las primeras décadas en países desarrollados (1940-1950), reportaron un nivel de protección entre 70 y 80%; un 50% de disminución de riesgo para tuberculosis pulmonar; disminución de las formas graves de infección hasta en un 80% y un período de inmunidad posterior a la vacunación entre 10 y 15 años. No obstante,

posteriores estudios detectaron diferencias en la eficacia protectora que abarcaron desde 0 y hasta el 80% de protección, incluso hubo casos en que la eficacia fue nula [Brewer 2000]. Esta amplia variación en la protección se atribuye entre otros factores a la heterogeneidad bioquímica y molecular de las diferentes subcepas de BCG antes descrita, entre otros factores. En México sabemos que en más de 10 años de vacunación con una cobertura mayor al 90% con diversas subcepas de vacunas BCG, la tasa de incidencia de tuberculosis anual permanece constante lo que se traduce en un 50% de eficacia [WHO 2009, Solución TB 2010].

Diversos modelos animales y en líneas celulares de mamífero han evaluado la protección conferida con las subcepas BCG; en el modelo murino de infección pulmonar, al comparar 10 de las subcepas BCG, se obtuvo que la mayor protección obtenida fue con la subcepa Phipps, mientras que la menor protección se obtuvo con la subcepa Tice posterior al reto con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [Castillo-Rodal 2006].

El resurgimiento de la tuberculosis sobre todo en individuos inmunocomprometidos además de la rápida distribución de cepas multidrogoresistentes evidencia la necesidad del entendimiento en la variación y en los límites de eficacia de la vacuna *M. bovis* BCG con énfasis en el conocimiento de la respuesta inmune innata para elaborar nuevas estrategias de vacuna contra la tuberculosis. Por esta razón decidimos estudiar la sobrevivencia y multiplicidad de 6 diferentes subcepas de *M. bovis* BCG en macrófagos. Subcepas “tempranas”: Moreau y Japón; subcepas “tardías”: Danesa, Tice, Phipps y México.

## JUSTIFICACIÓN

- La única medida de protección contra la tuberculosis es la vacunación con la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* BCG. Hoy en día existe evidencia de que las distintas subcepas BCG difieren en su genómica, proteómica y la capacidad protectora contra la infección. En los reportes de protección sólo se evalúa a la respuesta inmune adquirida, que para activarse depende de que el bacilo sobreviva en células como el macrófago. El estudio de la sobrevivencia y multiplicidad de distintas subcepas BGC en macrófagos humanos proporcionará información para explicar algunas de las diferencias observadas en protección a nivel del sistema inmune innato.

## **HIPÓTESIS**

- En macrófagos de la línea celular THP-I, la sobrevivencia y multiplicidad de diversas subcepas BCG será diferente.

## OBJETIVO

- Evaluar la sobrevivencia y multiplicidad de seis diferentes subcepas *Mycobacterium bovis* BCG en macrófagos humanos

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar y comparar la fase media logarítmica del crecimiento entre las subcepas BCG.
- Asociar las unidades formadoras de colonias y la cuantificación de ATP por bioluminiscencia de las subcepas BCG.
- Determinar y comparar la sobrevivencia y multiplicidad de las subcepas BCG en el macrófagos THP-1.
- Determinar y comparar la producción de nitritos en macrófagos infectados con las subcepa BCG para evaluar si se llevó a cabo el Estallido Respiratorio.

## **METODOLOGÍA**

### **Crecimiento bacteriano**

De las subcepas BCG Moreau, Japón, Danesa, Tice, Phipps y México, se hicieron cultivos en placa (Middlebrook 7H10 + OADC) y medio líquido (Middlebrook 7H9 + ADC) para elaborar cultivos primarios a partir de los cuales se obtuvieron las alícuotas para construir las curvas de crecimiento bacteriano de todas las subcepas. Una vez determinada la fase media logarítmica para cada subcepa, se inoculó nuevamente en medio líquido y se cosecharon las distintas BCG en PBS+Tween 20. Las alícuotas se ajustaron a una D.O. de 0.8  $\lambda=600$  nm y se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Se determinó el número de bacterias en las alícuotas por dos métodos: conteo de UFCs en placa y cuantificación de ATP por ensayo de bioluminiscencia (ATP Kit SL, BioThema). Posteriormente, se ajustaron las subcepas a  $1 \times 10^6$  bacterias/mL.

### **Infección de Macrófagos**

La línea monocítica celular humana THP-I (ATCC TIB-202) se proliferó en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco). Para la maduración y activación se emplearon miristato de forbol éster (PMA) (Sigma) (100nM) y lipopolisacárido (LPS) (*E. coli* 026:B6, Sigma) (100ng/mL) por 72 y 4 hrs, respectivamente.

La infección de macrófagos se realizó con un índice de 1:10 (un macrófago por cada 10 bacterias). Para determinar las bacterias no fagocitadas, se colectaron los sobrenadantes de cada pozo 4 hrs post-infección y se centrifugó el sobrenadante, se obtuvieron las bacterias que fueron cuantificadas por ensayo de ATP.

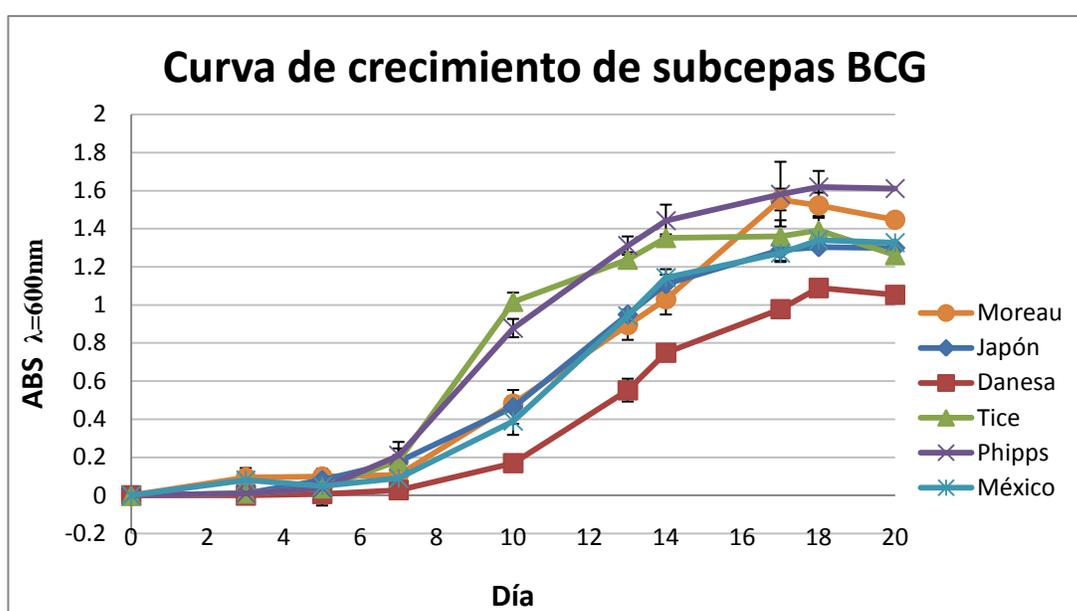
A las 72 hrs post-infección, se colectaron los sobrenadantes de las infecciones con los cuales se determinó la producción de nitritos por fluorescencia (Measure-iTTM

High-Sensitivity Nitrite Assay Kit, Molecular Probes) y, a cada pozo, se agregó solución de lisis por 30 min para, posteriormente, coleccionar los sobrenadantes de cada pozo con PBS. Con este último sobrenadante obtenido se cuantificaron las bacterias intracelulares por ensayo de ATP.

## RESULTADOS

### 1. Curva de crecimiento de las seis subcepas *Mycobacterium bovis* BCG

En el Gráfico 1 se muestra la curva de crecimiento realizada en 3 cultivos independientes; en esta gráfica se determinó que la fase media logarítmica se encuentra a una DO entre 0.5 y 0.8 a una longitud de onda de 600 nm la cual se alcanza entre el 9<sup>o</sup> y 13<sup>o</sup> día (Tabla 2).

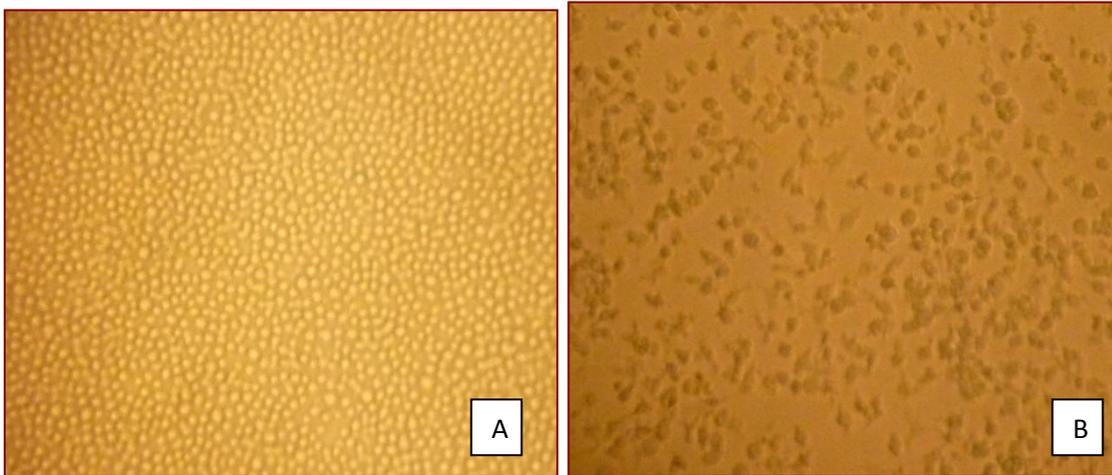


**Gráfico 1.** Curva de crecimiento de distintas subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG.  
**Tabla 2.** Determinación de la fase media logarítmica de crecimiento para las subcepas BCG.

Subcepas <i>M bovis</i> BCG	Fase media logarítmica (días)
Moreau	11
Japón	11
Danesa	13
Tice	9
Phipps	10
México	11

## 2. Proliferación y maduración de la línea celular THP-1

Después de la activación de las células THP-1, se observaron cambios estructurales como crecimiento y proyecciones, además de vacuolización (Fotografía 1)

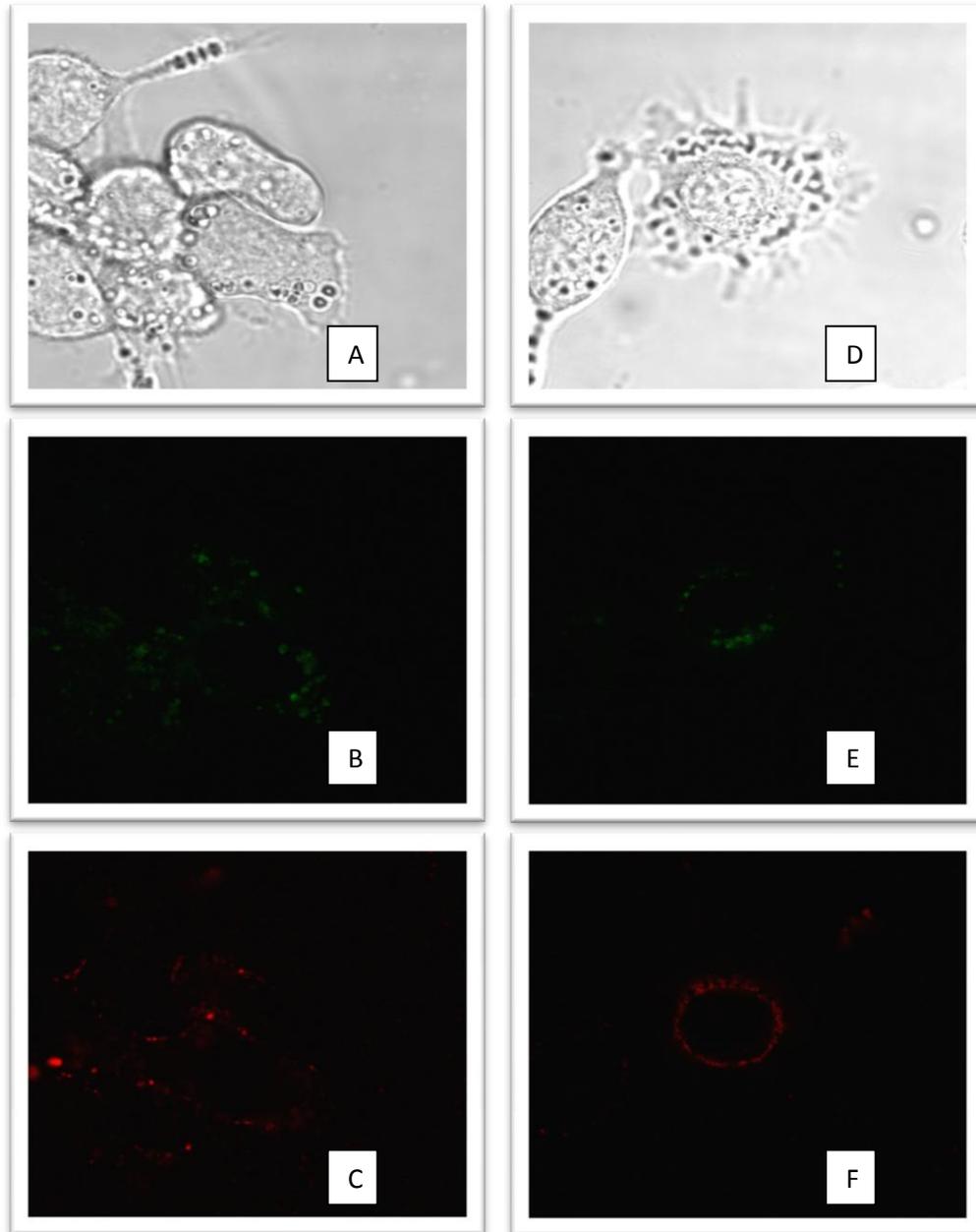


**Fotografía 1.** Cultivo celular con monocitos inmaduros de la línea celular THP-1 (A) y macrófagos activados (B). Microscopio Invertido (Leica DMIL). 20X.

## 3. Infección

Para evaluar la fagocitosis se tiñeron las suspensiones bacterianas con yoduro de propidio (IP) y diacetato de fluoresceína (DAF) antes de la infección, al cabo de los tiempos establecidos, con cada cubreobjetos se hizo una preparación para observarse con microscopía confocal (Fotografía 2).

A partir de los 30 min se observaron bacterias en el interior de los macrófagos al evaluar todas las subcepas. Esta observación sólo fue cualitativa.



**Fotografía 2.** Cultivo celular con macrófagos infectados con *M. bovis* BCG. Fagocitosis de BCG Tice (A,B,C) y BCG Danesa (D,E,F) a 30 min post-infección. A y D en campo claro, B y E con láser 488nm (para DAF), C y F con láser 561nm (para IP) en microscopio confocal espectral (Leica TCS SP5). 63X.

#### 4. Determinación de la multiplicidad bacteriana.

La primera etapa consistió en evaluar si los resultados experimentales obtenidos de conteo de UFCs correspondían con el número de bacterias estimado a partir de la cantidad de ATP contenido en las alícuotas de la cosecha de BCG. Al

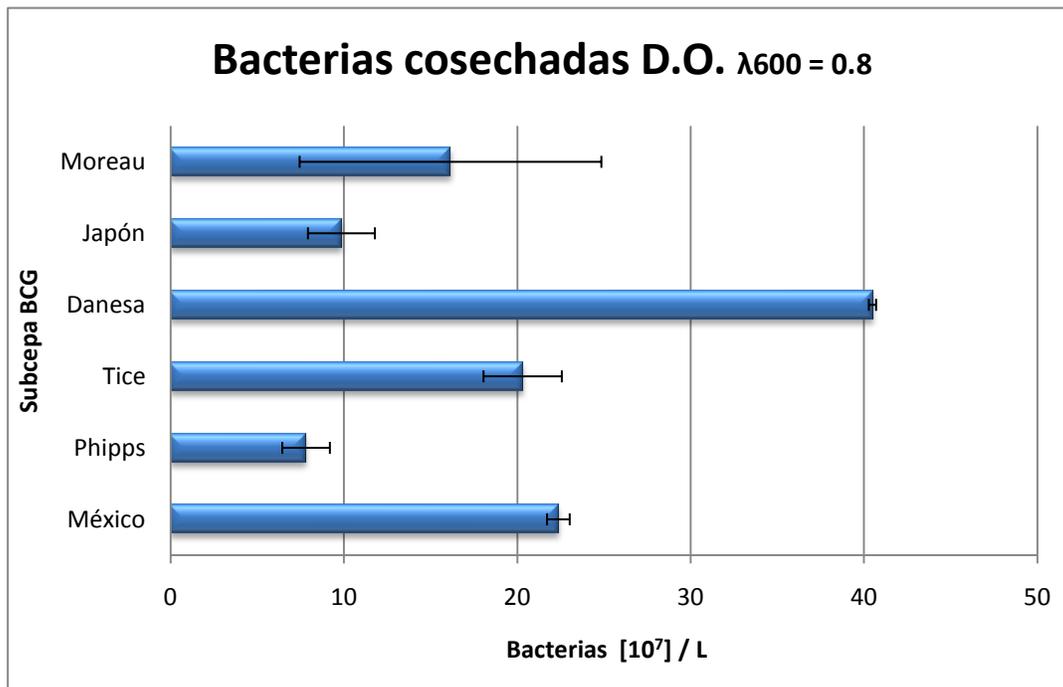
comparar los resultados entre las 6 subcepas de BCG estudiadas no presentaron diferencias ya que los resultados sólo difieren en la mantisa no así para la exponencial ( $10^8$ ) que resultó ser el mismo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Determinación de bacterias por ensayo del contenido de ATP y de Unidades Formadoras de Colonias por conteo en placa.

Subcepa M bovis BCG	Con ensayo de ATP	Conteo de UFCs
Moreau	1.61	1.0
Japón	0.98	1.4
Danese	4.04	6.8
Tice	2.03	4.6
Phipps	0.78	-----*
México	2.23	3.0

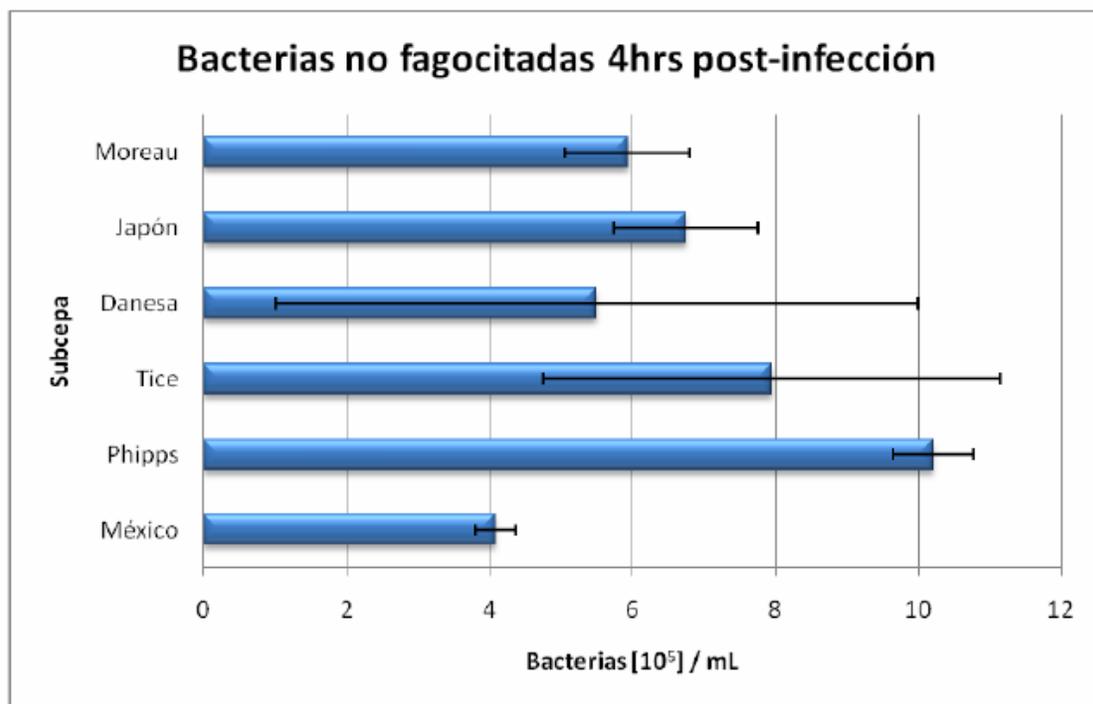
Las subcepas BCG fueron ajustadas D.O de 0.8 a una longitud de onda de 600nm. Todos los resultados son expresados a  $10^8$  / L. \* No hubo crecimiento en placa de medio 7H10 + OADC.

La subcepa Danese presentó la mayor cantidad de ATP, mientras que la subcepa Phipps presentó el menor contenido de ATP con escaso cultivo en placa (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Determinación del volumen bacteriano por método de cuantificación de ATP.

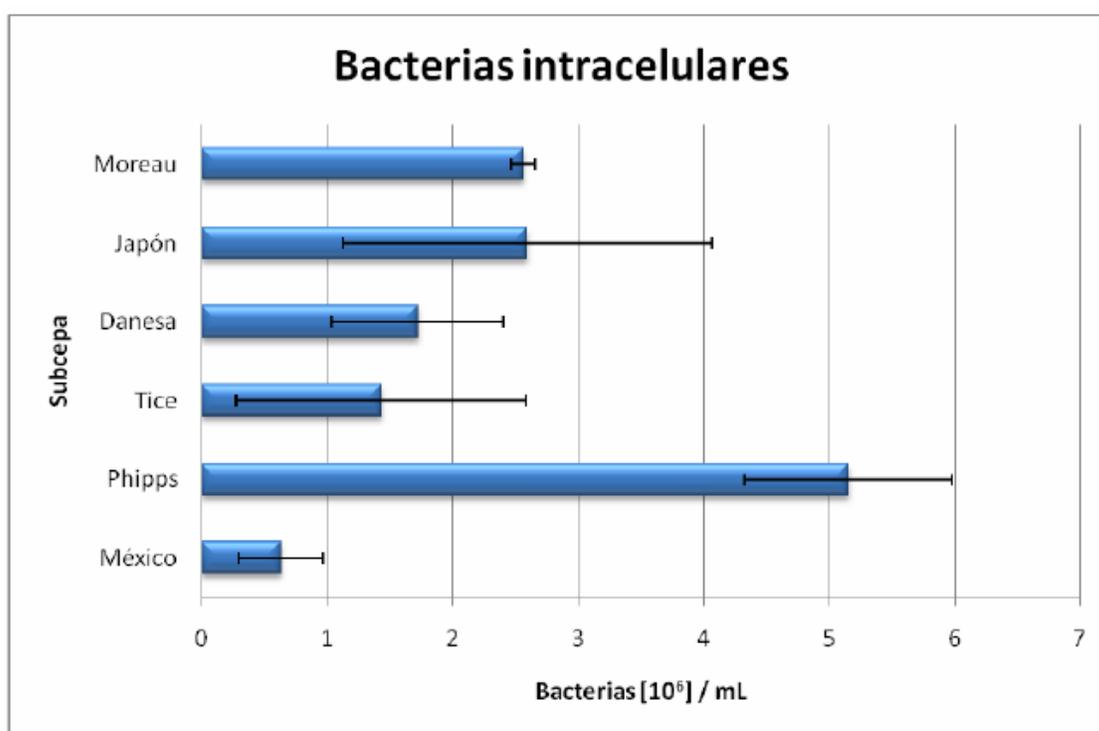
En la segunda fase, para la determinación de sobrevivencia y multiplicidad, bacteriana sólo se empleó la cuantificación de ATP para calcular el número de bacterias viables. Primero se determinaron las bacterias no fagocitadas, es decir, aquellas que estaban en el sobrenadante 4 h post-infección (Gráfico 3). A partir de este resultado se obtuvo el número de bacterias fagocitadas (Tabla 4), y por último, 72 h después de la infección, se evaluaron las bacterias en el interior de los macrófagos al lisar estos últimos (Gráfico 4).



**Gráfico 3.** Bacterias no fagocitadas 4 h después de la infección. Determinación a partir del contenido de ATP.

**Tabla 4.** Cálculo de las bacterias sin fagocitar obtenidas de los sobrenadantes 4h post-infección.

Subcepa BCG	Bacterias iniciales	No fagocitadas
Moreau	$1 \times 10^6$	$5.93 \times 10^4$
Japón	$1 \times 10^6$	$6.74 \times 10^4$
Danesa	$1 \times 10^6$	$5.5 \times 10^5$
Tice	$1 \times 10^6$	$7.95 \times 10^4$
Phipps	$1 \times 10^6$	$1.02 \times 10^4$
México	$1 \times 10^6$	$4.08 \times 10^4$



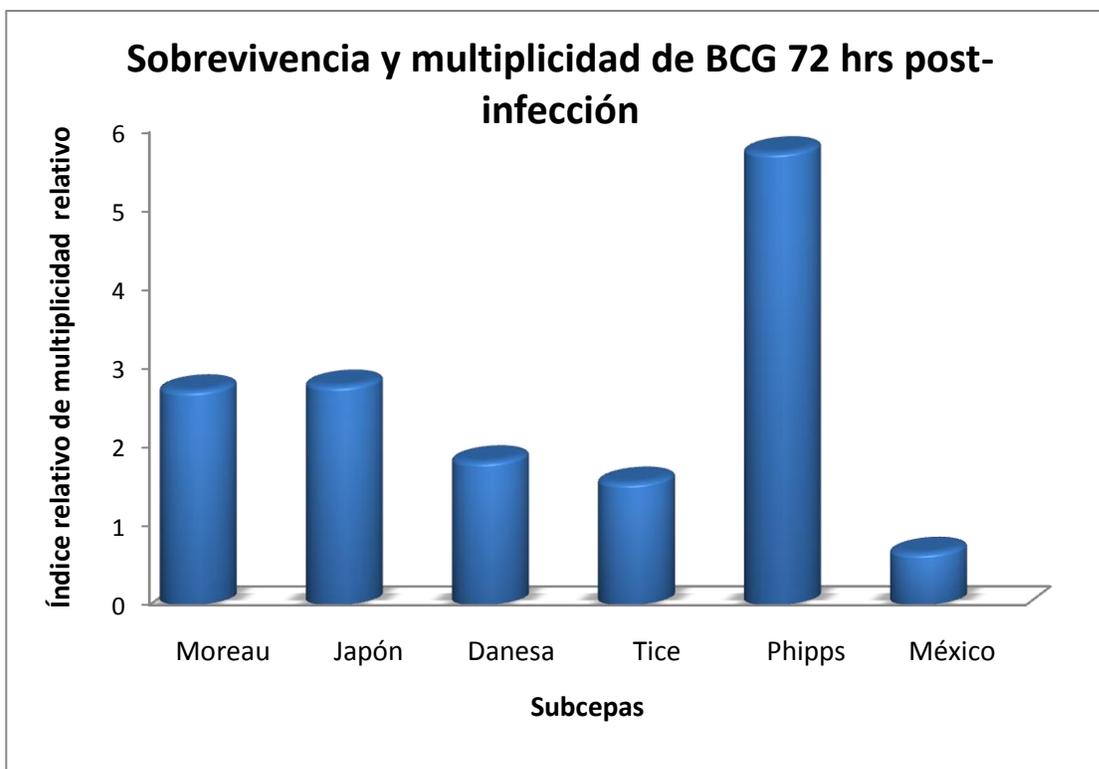
**Gráfico 4.** Cuantificación de bacterias intracelulares después de 72 h de la infección. Cálculo a partir de la concentración de ATP.

Con estos resultados se contruyó la Tabla 5 para calcular el índice de multiplicidad bacteriana para cada subcepa BCG. Así se obtuvo que la subcepa Phipps fué la de mayor multiplicidad en el interior del macrófago, mientras que la subcepa México presentó menor multiplicación (Gráfico 5).

**Tabla 5.** Índice de multiplicidad bacteriano para cada subcepa BCG

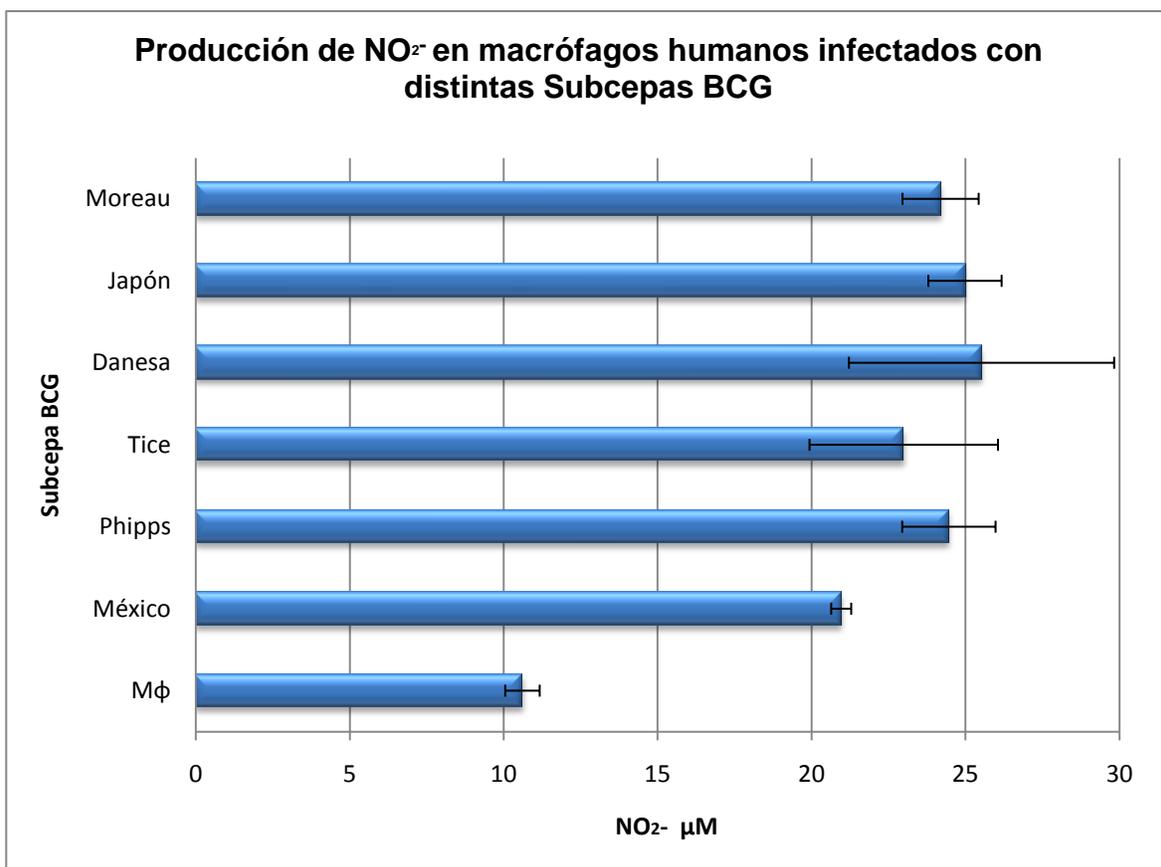
Subcepa BCG	No fagocitadas	Bacterias intracelulares	Índice de Multiplicidad Relativo	Sobrevivencia
Moreau	$5.93 \times 10^4$	$2.56 \times 10^6$	2.72	Sí
Japón	$6.74 \times 10^4$	$2.60 \times 10^6$	2.78	Sí
Danesa	$5.50 \times 10^4$	$1.72 \times 10^6$	1.82	Sí
Tice	$7.95 \times 10^4$	$1.43 \times 10^6$	1.55	Sí
Phipps	$1.02 \times 10^5$	$5.16 \times 10^6$	5.74	Sí
México	$4.08 \times 10^4$	$6.3 \times 10^5$	0.66	No

Calculado a partir de la diferencia entre bacterias fagocitadas a las 4hrs y las bacterias intracelulares 72h después de la infección.

**Gráfico 5.** Índice relativo de multiplicidad y sobrevivencia bacteriana para cada subcepa *M bovis* BCG.

## 5. Cuantificación de nitritos

Al determinar la concentración de nitritos en los sobrenadantes 72 h post-infección con las distintas subcepas BCG, se encontraron diferencias significativas con  $\alpha=0.05$ . Los macrófagos infectados con la subcepa México presentaron una producción menor de nitritos que lo obtenido con el estímulo proporcionado con la subcepa Danesa (Gráfico 6).



**Gráfico 6.** Producción de nitritos en macrófagos humanos infectados con distintas subcepas de *M bovis* BCG, 72h post-infección. La determinación se hizo por fluorescencia.

## DISCUSIÓN

Algunos estudios de investigación realizados tanto in vitro como in vivo han evidenciado que la respuesta protectora de la vacuna *M. bovis* BCG es variable entre las diferentes subcepas que se han utilizado como vacuna [Castillo-Rodal 2006]. La finalidad de la aplicación de la vacuna BCG es obtener una respuesta inmune TH1, es decir una respuesta inmune adaptativa protectora, por lo que la mayoría de las investigaciones realizadas a la fecha se han basado en las diferencias presentes en la respuesta inmune adaptativa. Es sabido que la respuesta inmune innata es muy importante en la defensa del organismo eliminando en poco tiempo a los microorganismos extraños al cuerpo y existen pocos estudios sobre la respuesta inmune innata de la vacuna *M. bovis* BCG. Nuestro objetivo fue analizar la sobrevivencia y multiplicidad de la BCG en macrófagos así como la producción de NO de los mismos a dos tiempos establecidos posterior a la infección. La evaluación que se realizó en la multiplicación de las diferentes subcepas muestra desigualdades en el crecimiento de cada una, ya que el tiempo que tardan en alcanzar la fase media logarítmica varía desde los 9 a los 13 días, situación que aún no se ha estudiado.

Por otra parte, la cepa que presentó menor índice de fagocitosis fue la BCG Phipps seguida de la Tice mientras que la BCG México fue la que mayor índice de fagocitosis presentó. Sabemos que la fagocitosis se inicia con la unión de antígenos a receptores como los Toll 2 y 4, manosa, receptores del complemento (CR1, CR3 y CR4) y algunos autores mencionan que la fagocitosis es cepa dependiente y que la diferencia estriba en el receptor implicado, probablemente debido a la cascada de señalización intracelular que se active [Stokes 2004]. Existen autores que demuestran que los componentes de la pared celular son importantes para la fagocitosis ya que especies no patógenas de micobacterias fueron fagocitadas más eficientemente que las patógenas sugiriendo que la pared posee antígenos que facilitan o retardan la entrada de los mismos y que al mismo tiempo la pared de las micobacterias patógenas es un factor de virulencia importante que ayuda a la sobrevivencia y multiplicidad de las BCG en los

macrófagos [Stokes 2004]. También se ha señalado que la modulación del grado de acetilación del principal lipoglicano, la lipoarabinomanana (LAM), por enzimas micobacterianas representa un factor adicional a la regulación de la respuesta inmune [Doz 2007].

El ATP es un constituyente obligado de todos los organismos vivos y su papel central lo hace necesario para todas las células debiendo mantener una concentración intracelular constante la cual es similar a todos los seres vivos. Cualquier interferencia con el metabolismo energético produce una rápida caída en las concentraciones de ATP produciendo la muerte celular en segundos. El ATP intracelular es una buena herramienta que estima el volumen celular total de las células vivas en la muestra. La lectura de la concentración del ATP se realiza por luminiscencia, siendo un método rápido, viable y estandarizado para determinar viabilidad de vacunas BCG [Ho 2008]. Los valores de ATP entre las diferentes subcepas BCG muestran una ligera variación en las mantisas con respecto al resultado obtenido entre ambos métodos, conservándose el valor exponencial ( $10^8$ ), por lo que se empleó únicamente la determinación de ATP para evaluar viabilidad. Los resultados mostraron una relación directamente proporcional entre los UFC y la cantidad de ATP (con excepción de la BCG Moreau), lo que apoya el uso de este parámetro para cuantificar a las BCG viables [Askgaard 1995, Ho 2008, Jensen 2008].

El proceso de fagocitosis se evaluó a las 4 h posterior a la infección, considerado un tiempo suficiente para la finalización del proceso por diversos autores [Theus 2004, Vega-Manriquez 2007]. En las pruebas cualitativas de fagocitosis no hay diferencias entre los ensayos de infección con las distintas subcepas, se realizaron diferentes lecturas (30 min – 4 h) y se observaron bacterias intracelulares desde los 30 min posteriores a la infección.

Existen diferentes publicaciones de la fagocitosis del macrófago y el género *Mycobacterium*, algunos autores señalan que la capacidad fagocítica del macrófago depende en parte de algunos componentes de la pared celular de las micobacterias (GPL, PIM, LAM, ManLAM entre otros) interviniendo activamente en la interacción de la micobacteria con el macrófago. Se ha demostrado que

manLAM (predominantemente lipoglicano) juega un papel importante en la inmunopatogénesis y virulencia de la tuberculosis además de observar una reducción en la fagocitosis por su baja asociación con el receptor de manosa del macrófago cuando manLAM está menos expuesto en la superficie [Torrelles 2008]. Pensamos que las diferencias presentes en el número de bacterias no fagocitadas se explican por las variaciones en los componentes de la pared celular de las diferentes subcepas [Ueneshi 2009]. Los ácidos micólicos son reconocidos receptores tipo PAMP (PRR) [Dietrich 2009], incluyendo a los receptores de manosa, que se sabe, son la vía de entrada principal de micobacterias.

Los datos obtenidos de la multiplicación micobacteriana intracelular de las subcepas BCG mostró que la capacidad fagocítica del macrófago es independiente de la vida intracelular del bacilo, ya que el número de bacilos fagocitados de la subcepa Phipps fue menor pero la multiplicidad se incrementó cuatro veces más mientras que la subcepa BCG México, que fue la que presentó mayor índice de fagocitosis no fue capaz de sobrevivir y multiplicarse demostrando que esta subcepa es eliminada en poco tiempo.

La evaluación de un mecanismo bactericida intracelular temprano y efectivo es fundamental, ya que este lleva al control del patógeno y por lo tanto al control en el desarrollo de la infección. Una molécula importante es la producción de  $\cdot\text{NO}$  que sabemos que actúa directamente sobre el ADN y la actividad respiratoria del patógeno [Chan 2001, Rojas-Espinoza 2003]. Existen diferencias en la producción de nitritos de macrófagos de ratón cuando estos se infectan con distintas subcepas BCG [Hayashi 2009], las subcepas “tempranas” inducen mayor producción de nitritos que las subcepas “tardías”. En nuestros resultados observamos que las subcepas Moreau y Japón (“tempranas”), Danesa y Phipps (“tardías”) presentaron mayor concentración en la producción de nitritos que las subcepas Tice y México (“tardías”). Estos resultados nos llevan a realizar la siguiente observación: que de las subcepas estudiadas, tres de ellas (Japón y Moreau “tempranas” y Phipps “tardía”) se multiplicaron con eficiencia por lo que se requirió por parte de los macrófagos una mayor producción de  $\cdot\text{NO}$  para su eliminación entre otros factores. Para la subcepa México, su eliminación no puede

atribuirse solamente a la producción de  $\cdot\text{NO}$ , sino a otros mecanismos utilizados por el macrófago o la pobre capacidad de la bacteria para resistir el ambiente fagocítico. De tal suerte que la poca producción de  $\cdot\text{NO}$  inducida por la infección por la subcepa México, podría darle ventaja para sobrevivir en un periodo más largo de tiempo, por lo que es necesario realizar más evaluaciones.

Las diferencias existentes en la eficacia protectora de las subcepas *M. bovis* BCG ha sido demostrada por diferentes autores; si bien nuestra investigación nos señala que también existen diferencias en las primeras etapas de la infección en macrófagos *in vitro*, es necesario realizar otras investigaciones como el estudio de las vías de entrada al macrófago y las vías de señalización que se producen para evaluar de una manera conjunta todos estos mecanismos y seleccionar la mejor subcepa para mejorar la vacuna *M. bovis* BCG.

## **CONCLUSIONES**

- El tiempo para alcanzar la fase media logarítmica entre las subcepas BCG empleadas es distinto
- Existen variaciones en la sobrevivencia y multiplicidad entre las seis subcepas BCG estudiadas en macrófagos, presentando la subcepa Phipps una mayor multiplicidad.
- La activación del Estallido Respiratorio, evaluado por la producción de nitritos por macrófagos infectados con las subcepa BCG Japón, Danesa y Phipps es mayor que con la infección por BCG Moreau, Tice y México.

## REFERENCIAS

1. **Askgaard, D.S., Gottschau, A., et al.** (1995). "Firefly luciferase assay of Adenosine triphosphate as a tool of quantitation of the viability of BCG vaccines". Biologicals 23:55-60.
2. **Beatty W. L., Russell D. G.** (2000). "Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages". Infect Immun 68:6997–7002
3. **Behr, M. A.** (2002). "BCG--different strains, different vaccines?". Lancet Infect Dis 2(2):86-92.
4. **Bhatt, K.** (2007). "Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*". J Clin Immunol 27(4):347-462.
5. **Boucau J., Sanki, A. K., et al.** (2009). "A coupled assay measuring *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85C enzymatic activity". Anal Biochem 385:120-127.
6. **Brosh, R., Gordon, S. V., et al.** (2007). "Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy". PNAS 104 (12):5596-5601.
7. **Castillo-Rodal, A. I., Castañón-Arreola M., et al.** (2006). "*Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis". Infect Immun 74(3):1718-24.
8. **Chan, E. D., Chan, J., et al** (2001). "What is the role of Nitric Oxide in murine and human defense against tuberculosis?". Am J Respir Cell Mol Biol 25:606-612.
9. **Díaz-Silvestre, H., Espinosa-Cueto, P., et al.** (2005). "The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-I monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria". Microb Pathog 39(3):97-107.
10. **Dietrich, J., Doherty, T. M.** (2009). "Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development". APMIS 117:440-457.
11. **Doz. E., Rose, S., et al.** (2007). "Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-

- independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan". J Biol Chem **282**(36):26014-26025.
12. **Fenton M. J., and M. W. Vermeulen.** (1996). "Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes". Infect Immun. **64**: 683-690.
  13. **Gutierrez, M. G., Master, S. S., et al.** (2004). "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages". Cell **119**:753-766.
  14. **Hayashi, D., Takii, T., et al.** (2009). "Comparable studies of immunoestimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains". FEMS Immunol Med Microbiol **56**:116-128.
  15. **Hibbs, J. B. Jr, Taintor, R. R., et al.** (1989). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule". Biochem Biophys Res Commun **157**:87-94.
  16. **Ho, M. M., Markey, K., et al.** (2008). "Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine". Vaccine **26**:4754-4757.
  17. **Jensen, S. E., Hubrechts, P., et al.** (2008). "Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilized BCG Danish 1331 vaccine". Biologicals **36**(5): 308-314.
  18. **Lagranderie, M. R., Balazuc A. M., et al.** (1996). "Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains". Infect Immun **64**(1):1-9.
  19. **Lalor, M. K., Smith, S. G., et al.** (2010). "Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants". Vaccine **28**(6):1635-1641.
  20. **Liu, J., Tran, V., et al.** (2009). "BCG vaccines. Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy". Human vaccines **5**(2):70-78.

21. **Marletta, M. A., Yoon, P. S., et al.** (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate; nitric oxide is an intermediate". Biochemistry **21**:8706-8711.
22. **Oettinger, T., Jorgensen, M., et al.** (1999). "Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree". Tubercle Lung Dis **79**:243–250.
23. **Oliviera, M. M., Charlab, R., et al.** (2001). "*Mycobacterium bovis* BCG but not *Mycobacterium leprae* induces TNF- $\alpha$  secretion in human monocytic THP-1 cells". Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(7):973-978.
24. **P.R. Murray, E. J. Baron, J.H., et al.**. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D. C.
25. **Pfyffer, E. G., Brown-Elliot, A. B., et al.** (2003). " *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures," p. 535-552. In P.R. Murray, E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R. H. Tenover(ed), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D. C.
26. **Piddington, D. L., Fang, F. C., et al.** (2001). "Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst". Infect Immun **69**(8):4980–4987.
27. **Riley, L.W.** (2006). "Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis". J Clin Invest **116**: 1475-1478.
28. **Rodriguez-Alvarez, M., Mendoza-Hernández, G., et al.** (2009). "Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level". Tuberculosis **89**(2):126-135.
29. **Rojas-Espinoza, O.** (2003). "Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera parte". Bioquímica **29**(2):55-67.
30. **Seki, M., Honda, I., et al.** (2009). "Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) Tokyo 172: A comparative study of BCG vaccine substrains". Vaccine **27**:1710-1716.

31. **Solución TB, Alianza Comunitaria.** Boletín Informativo, Número 12. Febrero 2010.
32. **Steinberg, B. E., Grinstein, S.** (2008). "Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants". J Clin Invest **118**:2002–2011.
33. **Stokes, R. W., Norris-Jones, R., et al.** (2004). "The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages". Infect Immun **72**(10):5676-5686.
34. **Theus, S. A., Cave, M. D., et al.** (2004). "Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates". Infect Immun **72**(2):1169-73.
35. **Torrelles, J. B., Knaup, R., et al.** (2008). "Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan". J Biol Chem **283**(46):31417-31428.
36. **Trivedi, O. A., Gokhale, R. S., et al.** (2004). "Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria". Nature **428**: 441-445.
37. **Ueneshi, Y., Taki, T. et al.** (2009). "Separation and molecular characterization of mycolic acid from the cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 (SMP-105) and BCG substrains by normal-phase high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry". J Microbiol Methods **77**(3):320-322.
38. **Vega-Manriquez, X., López-Vidal Y. et al.** (2007). "Apoptosis-inducing factor participation in bovine macrophage *Mycobacterium bovis*-induced caspase-independent cell death". Infect Immun **75**(3):1223-1228.
39. **Vergne, I., Chua, J., et al** (2003). "Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca<sup>2+</sup> / calmodulin – PI3K hVPS34 cascade". J Exp Med **198**: 653-659.

40. **Vergne, I., Chua J., et al.** (2005). "Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*". Proc Natl Acad Sci **102**: 4033-4038.
41. **Wallis, R. S., Ellner, J. J.** (1994). "Cytokines and tuberculosis". J Leukoc Biol **55**(5):676-681.
42. **World Health Organization.** (2009). Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report, WHO/HTM/TB/2009.411

## ANEXO

HEPES 1M

-12 g de HEPES en 40 mL de dH<sub>2</sub>O. Ajustar pH 7.4 y llevar al aforo 50 mL

Solución stock de 2-Mercaptoetanol

Dilución 1:1000 en medio RPMI-1640

Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) 1L

-2 g de NaHCO<sub>3</sub>

-10.4g del polvo RPMI-1640

Disolver en aproximadamente 750 mL de dH<sub>2</sub>O

-9 mL de glucosa al 50%

-10 mL de piruvato de sodio 100mM

-10 mL de HEPES 1M

-4 mL de 2-Mercaptoetanol 1:1000

Llevar al aforo y filtrar por membrana 0.22µm. Conservar a 4°C

Medio RPMI-5

-Medio RPMI con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado a 60°C por 30 minutos

Medio RPMI-10

- Medio RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado a 60°C por 30 minutos

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

-8.0 g de NaCl

-0.2 g de KCl

-1.15 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

-0.2 g de  $\text{KHPO}_4$

Ajustar pH 7.4 y llevar a 100mL con  $\text{dH}_2\text{O}$

Solución salina isotónica (SSI)

-0.9g de NaCl en 1 L de  $\text{dH}_2\text{O}$

Dubos Medium Albumin

-2.0 g de albúmina (fracción V) en 15 mL de SSI

-3.0 g de glucosa en 10 mL de SSI

Mezclar y llevar a volúmen final de 40mL

Medio Dubos

-1.3 g Dubos Broth Base

-10 mL de glicerol

-20 mL de Dubos Medium Albumin

-170 mL de  $\text{dH}_2\text{O}$

Diacetato de Fluoresceína (DAF)

-5 mg de DAF en 1 mL de acetona fría. Solución stock.

-25  $\mu\text{L}$  de la solución stock en 2 mL de PBS. Solución de trabajo. Almacenar a  $-20^\circ\text{C}$ .

Yoduro de propidio (IP)

-1mg de IP en 1mL de  $\text{dH}_2\text{O}$

#### Solución Auramina-Rodamina

- 1.5g de Auramina
- 0.75g de Rodamina
- 10mL de Fenol
- 75mL de Glicerol
- dH<sub>2</sub>O

Mezclar y filtrar por papel Wattman #1. Mantener protegido de la luz a 4°C.

#### Solución de lisis

- 0.8766g de NaCl
- 0.0372g de EDTA
- 0.6057g de Tris
- 500µL de Tritón X-100
- 500µL de SDS

Llevar al aforo en matraz de 100mL.

#### Medio de montaje

- Solución estéril de glicerol al 50%

#### Medio Middlebrook 7H10 Agar + Middlebrook OADC Enrichment

- Pesar 1.9 g del polvo 7H10 y disolver en 900 mL de H<sub>2</sub>O que contengan 5 mL de glicerol. Calentar con agitación constante y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 lb / 15 min).
- Agregar asépticamente 100 mL del medio de enriquecimiento OADC cuando la disolución se encuentre en 50-55°C. Vaciar en cajas Petri y esperar a solidificación. Evitar condensación. Almacenar a 4°C.

#### Medio Middlebrook 7H9 + Middlebrook ADC Enrichment

- Pesar 4.7 g del polvo 7H9 y disolver en 900 mL de H<sub>2</sub>O que contengan 5 mL de glicerol. Calentar con agitación constante y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 lb / 8 min).
- Adicionar asépticamente 100 mL del medio de enriquecimiento ADC cuando la disolución se encuentre a 45°C. Almacenar a 4°C.

#### **Tinciones**

Cada alícuota de las subcepas BCG se centrifugó a 3000 rpm/ 10 min/ TA para resuspenderse en una mezcla 1:1 con la solución de trabajo de diacetato de

fluoresceína (DAF) y 9:1 con la solución de yoduro de propidio (IP). Incubar a 37°C/30 min.

En la placa de 24 pozos, se colocó en cada uno un cubreobjetos redondo de 12 mm estéril y se siguió la misma metodología que para la infección usando las suspensiones bacterianas teñidas. 30, 60, 120 min. post-infección, se retiró el sobrenadante de cada pozo y se realizaron dos lavados con PBS 1x. Se retiró el exceso de líquido del cubreobjetos y se colocó invertido en un portaobjetos con 10 µL de medio de montaje (procurando no hacer burbujas), sellar la muestra. Observar en microscopio confocal Leica TCS SP5.

## **1. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR THP-I**

### 1.1 Descongelamiento de la línea celular THP-I

- Descongelar vial con 1mL ( $1 \times 10^6$  células/mL aprox) con baño a 37°C.
- Mezclar el contenido del vial con 9mL RPMI-1640 a 37°C
- Centrifugar a 1000rpm/5min/TA.
- Desechar sobrenadante. Resuspender botón en 9 ml de medio. Repetir el procedimiento.
- Resuspender el botón del último lavado en 5 ml de medio RPMI-1640 + 10%SFB + 2-mercaptoetanol 0.05 mM + Sol. Antimicótica (Penicilina 1 000U, Estreptomicina 1 mg, Anfotericina B 2.5 µg) 1x. Traspasar a botellas de 50 ml con 5 mL del mismo medio.
- Incubar a 37°C/ 5%CO<sub>2</sub>/ 4días

### 1.2 Proliferación de la línea celular THP-I

- Adicionar medio RPMI-1640 + 10% SFB + 2-mercaptoetanol 0.05mM + Sol. Antimicótica 1x cada 2-3 días. Mantener a  $5 \times 10^5$  céls/mL.

### 1.3 Viabilidad

- Resuspender con pipetas de transferencia.
- Tomar una alícuota de 40  $\mu$ L + 10  $\mu$ L de sol. Azul Tripano al 4%.
- Mezclar y tomar 10  $\mu$ L para cada celda de cámara de Neubauer.
- Contar células viables y no viables con objetivo 10X.
- Observar morfología con objetivo 40X.

## 2. CULTIVOS BACTERIANOS

### 2.1 Precultivos Subcepas BCG:

- Siembra en medio 7H10 + OADC. Incubar a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> / 3 semanas.
- Siembra de una colonia en 15 mL de medio 7H9 + ADC. Incubar a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> / hasta D.O. = 0,8 a  $\lambda$ =600nm.

### 2.2 Curvas de crecimiento Subcepas BCG:

- 1mL del precultivo en 99 mL de medio 7H9 + ADC. Incubar a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> con agitación constante.
- Medir D.O. a  $\lambda$ =600nm cada 24 horas. Usar como blanco medio 7H10 + OADC.
- Graficar y obtener el tiempo requerido para alcanzar la fase media logarítmica de crecimiento.
  - Hacer por triplicado.

### 2.3 Cosecha de Subcepas BCG:

- Centrifugar cada cultivo a 3000 rpm/ 15min/ 4°C.

- Desechar el sobrenadante y resuspender en PBS + 0,05% tween 20. Repetir el procedimiento.
- Resuspender el botón en PBS + 0,05% tween 20.
- Ajustar D.O.= 0,8  $\lambda=600\text{nm}$ . Hacer alícuotas de 1 mL.
- Conservar a -70°C.

### 3. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD BACTERIANA POR CUANTIFICACIÓN DE ATP (ATP Kit SL de Bio Thermo Luminescent Assays) [Askgaard 1995, Jensen 2008, Ho 2008] **CONTRA CUENTAS TOTALES DE UFC**

#### 3.1 Curva estándar para la cuantificación de ATP

Una vez que los reactivos alcanzan TA, se realizan diluciones seriadas de acuerdo a la siguiente tabla:

Dilución	Volúmen de buffer TE ( $\mu\text{L}$ )	Origen y volumen de solución de ATP ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final (pmol/ $\mu\text{L}$ )
A	1188	12 de stock de ATP	0.1
B	600	600 de A	0.05
C	600	600 de B	0.025
D	600	600 de C	0.0125
E	600	600 de D	0.00625
F	600	600 de E	0.003125
G	600	----	0.0

En una placa de 96 pozos, adicionar 160  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones (realizar tres ensayos independientes). Agregar a cada pozo 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de ATP e incubar la reacción por 5min/ TA, en oscuridad. Leer luminiscencia en espectrofotómetro Magellan a 560nm.

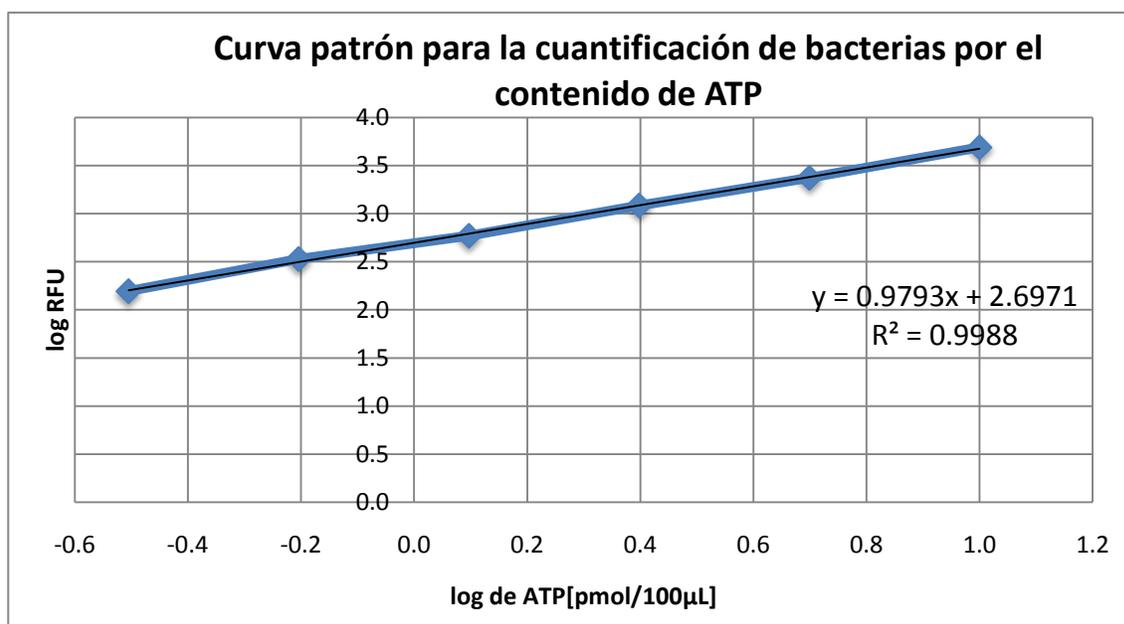


Gráfico 4. Curva patrón para la cuantificación de bacterias contenidas en la muestra por la determinación de ATP por bioluminiscencia.

### 3.2 Cuantificación de ATP en alícuotas de Subcepas BCG

Descongelar las alícuotas y homogenizar. Eliminar sobrenadantes a 3200 rpm/ 5min/ TA y resuspender el paquete celular obtenido en 1 mL de medio Dubos suplementado. Incubar a 37°C/ 5%CO<sub>2</sub>/ 22-26 h con agitación constante. 30 min antes de terminar el tiempo de incubación, se alícuota con 500  $\mu\text{L}$  de buffer TE (tres diluciones por Subcepa BCG y cada dilución por triplicado). Incubar estas alícuotas en un termoblock a 96-98°C por 10 min.

De las alícuotas de Subcepas BCG, realizar diluciones 1:2 y 1:5 con medio Dubos suplementado. De estas diluciones y el original, se toman 100  $\mu\text{L}$  y se adicionan en las alícuotas incubadas de solución amortiguadora TE. Se incuban a la misma temperatura por 6 min y hasta que alcancen TA.

En placa blanca de 96 pozos de fondo plano, se colocan 160  $\mu$ L de los extractos obtenidos y de los controles: positivo, medio Dubos suplementado en buffer TE y 5  $\mu$ L del estándar de ATP; negativo, medio Dubos suplementado en buffer TE. Añadir 40  $\mu$ L del reactivo de ATP e incubar por 5min/ TA en oscuridad. Leer luminiscencia a 560nm en espectrofotómetro Magellan.

Por otra parte, de la misma alícuota descongelada, se toman 100  $\mu$ L de muestra que se diluyen en un volumen final de 1 mL de PBS. Se hacen diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$ . De cada una de las diluciones se siembran 100  $\mu$ L en placas de medio Middlebrook 7H10 + OADC y se incuban a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 3 semanas.

#### **4. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS THP-I:**

- Centrifugar a 1000rpm/5min. Resuspender en medio RPMI-1640 + 10%SFB + 0.05mM 2-mercaptoetanol 0.05 mM + PMA 100 nM.

En placas de 24 pozos:

##### **4.1 Maduración**

- 1 mL de suspensión celular anterior a  $4 \times 10^5$  céls/mL a cada pozo. Con viabilidad  $\geq 95\%$
- Incubar a 37°C/ 5%CO<sub>2</sub>/ 72h
- Retirar sobrenadante y hacer cuidadosamente 2 lavados con 500  $\mu$ L medio RPMI-1640.

##### **4.2 Activación**

- Adicionar medio RPMI-1640 + 10% SFB + 0.05 mM 2-mercaptoetanol + 100 ng/mL LPS
- Incubar a 37°C/ 5%CO<sub>2</sub>/ 4 h
- Retirar sobrenadante y hacer cuidadosamente 2 lavados con 500  $\mu$ L medio RPMI-1640.

- Adicionar medio RPMI-1640 + 10% SFB + 2-mercaptoetanol 0.05 mM

## **5. INFECCIÓN**

### 5.1 Subcepas BCG:

- Centrifugar a 3000 rpm/15 min los viales con las cepas. Retirar el sobrenadante y ajustar la suspensión a  $1 \times 10^6$  bacterias/mL con medio RPMI-1640.
- Incubar 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 1 h

### 5.2 Macrófagos:

- Retirar medio de cada pozo

### 5.3 Infección:

- Adicionar a cada pozo 1 mL de la suspensión bacteriana. Incubar 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 4 h.

### 5.4 Fagocitosis

- Después del tiempo de incubación (4 hrs), retirar sobrenadante de cada pozo y recolectar en tubos eppendorf. Centrifugar a 3200 rpm/10min/TA. Separar el sobrenadante (Sob1) en otro tubo y almacenarlo a -71°C, reservar el paquete celular obtenido.
- Durante el tiempo de centrifugado, realizar dos lavados con 250 µL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1x estéril a cada pozo y recolectarlos en el tubo que contiene el paquete (Vol1) para determinar las bacterias no fagocitadas.
- Adicionar 1mL de medio RPMI-5 fresco a cada pozo. Incubar 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 72 h.
- Para cuantificar las bacterias fagocitadas, posterior a los puntos ya mencionados, se colocaron en cada pozo 500 µL de la solución de lisis y se incubó la placa por 30 min/ 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>. Después de homogenizar

cada pozo, el contenido se colocó junto con el volumen de dos lavados con 500  $\mu$ L de PBS 1x por pozo. Centrifugación a 3200 rpm/10min/TA.

- Los tiempos post-infección a evaluar fueron: 0 y, 4 horas, 3 días.

## **6. DETERMINACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD DE BCG POR CUANTIFICACIÓN DE ATP POR BIOLUMINISCENCIA**

Una vez terminada la incubación, se retiró el medio de cada pozo, se centrifugó el volumen bajo las condiciones antes descritas y el sobrenadante obtenido (Sob2) se almacenó a  $-71^{\circ}\text{C}$ .

Se adicionaron a cada pozo 500  $\mu$ L de la solución de lisis y se incubó la placa a  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2/30 \text{ min}$ .

Posteriormente, se mezcló el volumen contenido en cada pozo y se traspasó a tubos eppendorf (Vol2). Se realizaron dos lavados con 500  $\mu$ L de PBS 1x estéril en cada pozo y se colocó el líquido en el tubo Vol2. Se centrifugó a 3200 rpm/10 min/TA; el paquete celular obtenido se almacenó a  $-71^{\circ}\text{C}$  para determinar las bacterias intracelulares por cuantificación de ATP por el método antes descrito.

**7. CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS** (Measure-iT Nitrite Assay Kit de Molecular Probes) [Hayashi 2009] **PARA DETERMINAR PRESENCIA DE NO (ESTALLIDO RESPIRATORIO).**

7.1 Curva estándar para la cuantificación de nitritos

50  $\mu$ L del componente C se adicionaron a 4.95 mL de dH<sub>2</sub>O para preparar la solución stock. De esta última, se hicieron diluciones en el medio RPMI-5 de acuerdo a la siguiente tabla:

Concentración del estándar de nitritos [ $\mu$ M]	Volúmen de la solución stock de nitritos ( $\mu$ L)	Volúmen de medio RPMI-5 ( $\mu$ L)
0	0	1000
2.75	25	975
5.5	50	950
11	100	900
22	200	800
33	300	700
44	400	600
55	500	600
66	600	400

\*Realizar dos lecturas en tres ensayos independientes.

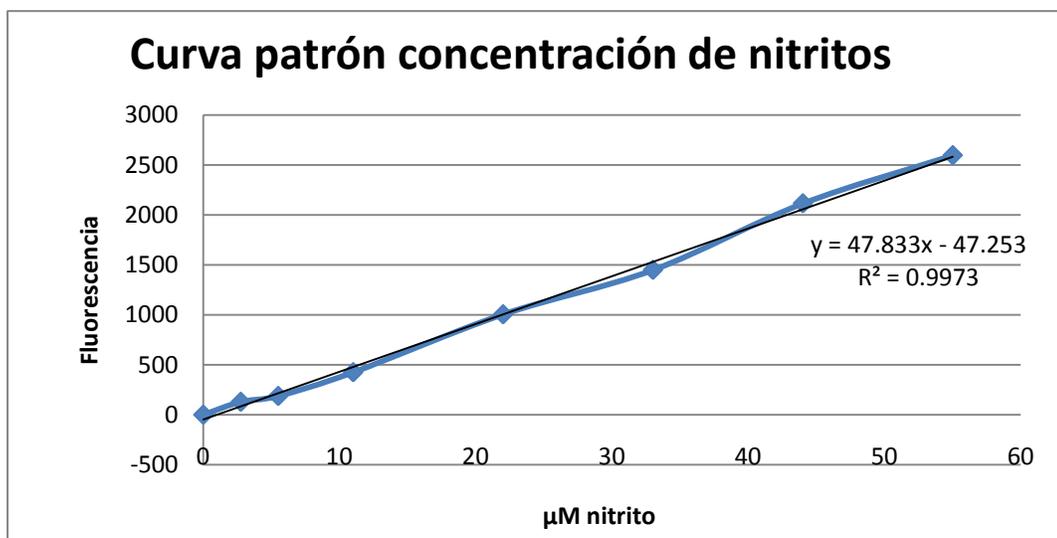


Gráfico 2. Curva patrón para la cuantificación de nitritos por fluorescencia

## 7.2 Ensayo para la cuantificación de nitritos

Para preparar la solución de trabajo, en 9.9 mL de dH<sub>2</sub>O se diluyeron 100 μL del componente A. De esta solución, se colocaron 100 μL a cada pozo en una placa de 96 y se adicionaron 5 μL de la muestra (Sob1 y Sob2) ó 10 μL de la dilución de la curva estándar. Se incubó por 10 min/ TA y se agregaron a cada pozo 5 μL del componente B del kit. Como control positivo, en lugar de la muestra se adicionaron 5 μL de una solución de NaNO<sub>2</sub> (200 μM/100 μL), y como negativo, sólo el medio. Se lee la fluorescencia, con una excitación a 360 nm y Emisión a 430 nm, en el lector Magellan.