



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**IDENTIFICACIÓN DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA NATURAL A
BACTERIAS INTRACELULARES EN BOVINOS *Bos taurus indicus***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA
JOSUÉ ISAIS LÓPEZ**

**Asesores:
MVZ Alejandro Benítez Guzmán
MVZ José Ángel Gutiérrez Pabello**

Ciudad Universitaria, CDMX 2021



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.

DEDICATORIA:

A mi familia, por el apoyo y cariño incondicional.

A mis asesores, por todas las enseñanzas que fueron más allá de lo académico.

A Omar A., quien seguramente está jugando básquet con Bowie.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del proyecto PAPIIT IG 210918 "Identificación de biomarcadores de resistencia natural a patógenos bacterianos de vida intracelular en el ganado bovino". Especial agradecimiento por la beca proporcionada para la culminación del proyecto.

A mi familia, por el cariño y apoyo en todos los proyectos que he emprendido en mi vida. Espero poder retribuirles lo que han hecho por mí algún día.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez y al Dr. Alejandro Benítez por la confianza para involucrarme en sus grupos de trabajo y por todo lo aprendido dentro y fuera del ámbito académico.

A todo el equipo del Laboratorio de Investigación en Brucelosis y Tuberculosis y del Laboratorio de Inmunofisiología y Proteómica, por todo el tiempo que pudimos compartir y por brindarme tan linda amistad. Perdón que no les nombre, pero ustedes saben quiénes son. <3

Al personal del CEIEGT por todas las facilidades otorgadas e invaluable ayuda y enseñanzas, especialmente a Dra. Leticia Galindo, Dra. Elke Von Son y Dr. Miguel Alonso.

A Dra. Beatriz Arellano y a M en C Adolfo Ortiz por influir de manera indirecta pero valiosísima en la realización de este trabajo.

Agradecimiento infinito a todas las personas no mencionadas pero que de una u otra forma fueron parte de la experiencia universitaria y la vida en general. Este trabajo es el fruto de varias horas de trabajo en equipo con todas las personas que, directa o indirectamente han influido en mi forma de entender la ciencia e intentar comprender el mundo en que vivimos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	- 2 -
RESISTENCIA NATURAL	- 2 -
PRIMERAS OBSERVACIONES	- 3 -
FACTORES GENÉTICOS RELACIONADOS A LA RESISTENCIA NATURAL.....	- 4 -
FACTORES INMUNOLÓGICOS RELACIONADOS A LA RESISTENCIA NATURAL	-
6 -	
MACRÓFAGOS.....	- 7 -
RESISTENCIA NATURAL EN BOVINOS <i>Bos taurus taurus</i> ASOCIADA A	
MACRÓFAGOS.....	- 9 -
RESISTENCIA NATURAL EN BOVINOS <i>Bos taurus indicus</i>	- 11 -
JUSTIFICACIÓN	- 13 -
HIPÓTESIS	- 13 -
OBJETIVO GENERAL	- 14 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	- 14 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 15 -
ANIMALES	- 15 -
GENERACIÓN DE BIOBANCO CELULAR.....	- 15 -
OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE	
PERIFÉRICA	- 17 -
COSECHA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS	- 18 -
FENOTIPIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS.....	- 18 -
ELABORACIÓN DE INÓCULO DE <i>Brucella abortus</i> 2308.....	- 19 -
CUANTIFICACIÓN DE INÓCULO DE <i>Brucella abortus</i> 2308	- 20 -
ENSAYO BACTERICIDA.....	- 20 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 22 -
RESULTADOS.....	- 23 -

BIOBANCO CELULAR	- 23 -
OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE PBMC	- 24 -
INÓCULO DE <i>Brucella abortus</i> 2308.....	- 25 -
ENSAYOS BACTERICIDAS	- 26 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 28 -
VALIDACIÓN DE ENSAYO BACTERICIDA.....	- 29 -
DISCUSIÓN	- 31 -
CONCLUSIONES	- 36 -
ANEXOS	- 37 -
ANEXO 1: ENSAYO BACTERICIDA CONFIRMATORIO.....	- 37 -
REFERENCIAS:.....	- 38 -

RESUMEN

ISAIS LÓPEZ JOSUÉ. Identificación del fenotipo de resistencia natural a bacterias intracelulares en bovinos *Bos taurus indicus*.

La capacidad de resistir de forma innata la infección por patógenos intracelulares ha sido estudiada en varios modelos, incluyendo bovinos, y se sabe que la capacidad bactericida de los macrófagos puede ser un buen marcador que defina la presencia de este fenotipo. También, se ha reportado que los bovinos *Bos taurus indicus* resisten mejor a la brucelosis y tuberculosis que los bovinos *Bos taurus taurus*, reflejándose en lesiones menos severas y un mejor control de la enfermedad.

Pese a esto, se desconoce si las subespecies cebuinas son más resistentes a patógenos bacterianos que las razas de bovinos de origen europeo, así como el papel de los macrófagos derivados de sangre periférica en este fenómeno, considerando que estas células del sistema inmune han mostrado ser un buen marcador para ello.

En este trabajo se determinó el fenotipo de resistencia natural en bovinos de la raza Brahman mediante un ensayo bactericida con macrófagos derivados de sangre periférica. De un total de 20 animales, se identificaron 8 (40%) resistentes a *Brucella abortus* 2308, datos mayores a los reportados en bovinos europeos (18-20%). Adicionalmente, se realizaron dos ensayos (1 R y 1 S) con *Mycobacterium bovis* BCG danesa para corroborar el fenotipo obtenido.

Los resultados sugieren que el macrófago es un buen marcador fenotípico (independientemente de la bacteria utilizada y su patogenicidad) y evidencian una tendencia de mayor resistencia a patógenos en bovinos *Bos taurus indicus*; sin embargo, para concluir esto hacen falta ensayos a mayor escala, en los que se consideren más factores y variables.

INTRODUCCIÓN

RESISTENCIA NATURAL

La interacción patógeno-hospedador ha sido ampliamente abordada dentro del estudio de las enfermedades infecciosas. Un aspecto que se ha revisado desde inicios del siglo XX es la resistencia a patógenos que un hospedador puede tener de forma inherente desde el nacimiento, fenómeno que ha sido denominado como resistencia innata o resistencia natural.

La resistencia natural fue definida por Hutt (1) como la capacidad inherente de un animal de enfrentar de forma efectiva la infección por patógenos sin la necesidad de tener un contacto previo con estos, ya sea por inmunización o reinfección, siendo esta capacidad determinada por el genoma y heredable a su descendencia.

Esta resistencia derivará en una falta de susceptibilidad al proceso de enfermedad, impidiendo el asentamiento y colonización del agente causal de enfermedad, debido a incompatibilidades estructurales o funcionales entre éste y el hospedador (2). Dichas incompatibilidades podrían agruparse en los siguientes rubros (3):

- Incapacidad del patógeno de traspasar barreras inespecíficas
- Ausencia de receptores para unión y penetración de membranas celulares
- Fracaso en supervivencia dentro de la célula hospedadora
- Inhabilidad de replicación dentro del hospedador
- Eliminación eficaz del patógeno, principalmente por células fagocíticas

PRIMERAS OBSERVACIONES

El fenómeno de resistencia natural a bacterias y parásitos ha sido estudiado en animales domésticos; ejemplo de esto son las primeras observaciones en especies en las cuales por lo general se realiza un manejo genético para preservar características productivas en los semovientes.

En el caso de la producción avícola, Roberts y Card (4) reportaron la existencia de resistencia a la pulorosis aviar (causada por *Salmonella Pullorum*) en parvadas de diferentes estirpes. En el estudio realizaron pruebas de aglutinación y cultivo bacteriano a partir de heces y órganos; los resultados mostraron que estirpes como la White Plymouth Rock y White Leghorn controlaban mejor al patógeno, habiendo menor mortalidad, esto en comparación con estirpes como la Rhode Island, que mostró un alto porcentaje de aves muertas. Asimismo, pudieron confirmar que las parvadas en las cuales se hacían cruza endogámicas o en las que los progenitores no cambiaban, la característica de resistencia se incrementaba, dando evidencia de la heredabilidad de esta resistencia innata.

En la especie porcina, el estudio de la resistencia natural a *Brucella suis* comenzó con un trabajo en el que se inoculó *B. suis* por vía oral a una piara en edad reproductiva. Se demostró que dos cerdas carecieron de seroconversión para *B. suis*, reflejándose como resultados negativos en la prueba de aglutinación, además de no ser portadoras del microorganismo, habilidad que la progenie mostró tener en camadas seleccionadas para que sus progenitores fueran animales resistentes, por lo que se especuló acerca de la heredabilidad de esta característica (5).

Haemonchus contortus es el nematodo gastroentérico más importante de los ovinos en varias regiones del mundo. Su control se basa en la aplicación de antihelmínticos, sin embargo el uso indiscriminado de estos y la consecuente

resistencia generada, ha llevado a buscar otras vías para el control del helminto, como el control genético mediante el uso de pie de cría resistente a las infecciones parasitarias (6). En un estudio realizado en India, se trabajó con un rebaño de ovejas infestadas vía oral con 1000 larvas en la fase infectante (L3) durante 10 días. Después de la inoculación se realizó un conteo de los huevos por gramo de heces mediante la prueba McMaster. Los resultados permitieron segregar a los animales en dos grupos, el grupo de “responsivos” (conteo bajo de huevos) y “no responsivos” (conteo alto de huevos). Se realizaron exámenes hematológicos a los individuos más y menos responsivos y encontraron diferencias significativas en el porcentaje de hemoglobina y conteo de eosinófilos, siendo mayor en individuos responsivos, lo que sugirió un mejor control de la infección por parte de estos individuos, los cuales podrían ser un pie de cría ideal con cierta resistencia que podrían heredar a su progenie (7).

Este fenómeno también ha sido estudiado utilizando animales de experimentación como ratones o conejos, aunado a los bovinos, en los que la resistencia natural a bacterias y parásitos ha sido reportada y estudiada, siendo esta investigación principalmente enfocada a enfermedades de importancia económica y en salud pública.

La presencia del fenómeno de resistencia natural se ha relacionado a diferentes factores, incluyendo los genéticos e inmunológicos.

FACTORES GENÉTICOS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA NATURAL

Los avances en el estudio de la resistencia natural a nivel genético se han hecho principalmente en modelos murinos, aunque también han sido identificados en otras especies, como los bovinos. Se han reportado diferentes genes y loci que han sido propuestos como potenciales biomarcadores de regulación de este fenotipo.

Los primeros trabajos en este campo de estudio fueron aquellos que identificaron el locus *bcg*, el cual fue descrito en dos formas alélicas, la que determina resistencia (*Bcg^R*) y la que determina susceptibilidad (*Bcg^S*) a micobacterias no patógenas, como *Mycobacterium bovis* cepa BCG, *M. lapraemurium* y *M. intracellulare* (8).

Se comprobó que la expresión de estos genes también determinaba resistencia a otros patógenos intracelulares, como *Leishmania donovani* (*Lsh*) y *Salmonella Typhimurium* (*Ity*). Dentro de este locus se logró identificar a *Nramp1* (*Natural Resistance Associated Membrane Protein-1*), que codifica para una proteína de membrana específica de macrófagos. Fue mediante ensayos de disrupción de genes, que se estableció que *Ity/Lsh/Bcg* y *Nramp 1* es el mismo locus, identificado dentro del cromosoma 1 del modelo murino (9). Posteriormente, se supo que estos genes son parte de otra familia de genes codificantes para proteínas de membrana.

La superfamilia de genes acarreadores de solutos SLC (*Solute Carrier Family*), codifica para un grupo de proteínas de membrana encargadas del transporte pasivo de iones y de proteínas necesarias para la célula. Dentro de esta familia se encuentra el locus *SLC11*, que consiste de dos genes (*SLC11A1* y *SLC11A2*) involucrados en el secuestro y procesamiento del hierro, necesario para la formación del fagolisosoma, sin embargo, la identificación de estos genes y polimorfismos en los mismos, así como su relación con la resistencia natural a patógenos, sigue siendo inconclusa (5).

Otro gen que se ha relacionado con la resistencia innata a patógenos intracelulares es el *Ipr1* (*Intracellular Pathogen Resistance*). Este gen fue identificado dentro del locus denominado *sst-1* (*super-susceptibility to tuberculosis*), localizado en el cromosoma 1 del ratón. Pan y colaboradores (10) demostraron que en cepas resistentes de ratones, el gen *Ipr1* se encontraba sobre expresado, lo que derivó en un eficiente control de bacterias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes* por parte de los macrófagos. Se comprobó que el producto de la expresión de *Ipr1* está

involucrado con la resistencia en animales, controlando aspectos de inmunidad innata, muerte celular y patogénesis.

FACTORES INMUNOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA NATURAL

Se han hecho estudios en bovinos para identificar células del sistema inmune implicadas en el fenotipo de resistencia a patógenos. Ejemplo de estos son los realizados por Price y colaboradores (11), en los que se confirmó la presencia de fenotipos diferentes en un grupo de vaquillas y vacas gestantes mediante un desafío *in vivo*. Los diferentes grupos de animales fueron inoculados por vía conjuntival con 10^7 UFC de *Brucella abortus* 2308, y posteriormente se clasificaron en dos grupos, restrictivos y permisivos. Los restrictivos (resistentes) lograban de cierta forma controlar la infección y con ello llevar a término la gestación, de igual manera presentaban un bajo número de anticuerpos y no se logró el aislamiento de la bacteria de diversos órganos. Por el contrario, el grupo de animales permisivos (susceptibles) desarrolló infección sistémica y por lo tanto abortaron, encontrando también un título alto de anticuerpos circulantes y la bacteria fue aislada de leche, útero, placenta y de órganos de los fetos abortados.

Posteriormente hicieron ensayos de infección *in vitro*, utilizando macrófagos provenientes de glándula mamaria y de sangre periférica de ambos grupos, a los que desafiaron con un inóculo de *Brucella abortus* 2308 opsonizada. Demostraron que los macrófagos mamaros y los provenientes de sangre periférica difieren significativamente en la capacidad de contener a la bacteria *in vitro*, siendo más efectivos los macrófagos provenientes de la glándula mamaria, sin embargo, los ensayos con ambas células mostraron una fuerte correlación con el desafío *in vivo* (75% y 82%, respectivamente) y el fenotipo obtenido con el ensayo, por lo que se especuló que los macrófagos estaban asociados con el fenotipo de resistencia a la brucelosis bovina (11).

A partir de estos resultados, diversos grupos de estudio indagaron el papel de los macrófagos en la resistencia natural, uno de estos fue el de Qureshi y colaboradores (12), quienes propusieron un ensayo bactericida (descrito en el apartado Material y Métodos) utilizando células mononucleares de sangre periférica diferenciadas a macrófagos de vaquillas F1 (*Bos taurus* x *Bos indicus*), siendo infectados con 4 bacterias diferentes. Encontraron diferencias estadísticamente significativas en el control de *Brucella abortus* 2308, *Mycobacterium bovis* BCG y *Salmonella* Dublín, postulando así que su ensayo es capaz de identificar animales resistentes y susceptibles y proponiendo puntos de corte establecidos mediante análisis de desviación estándar, siendo 70%, 65% y 100% de sobrevivencia intracelular de las bacterias inoculadas, respectivamente.

MACRÓFAGOS

Los macrófagos derivados de monocitos son una población celular de leucocitos presentes y conservados en todos los vertebrados, representando del 4 al 10% de las células nucleadas de sangre. Son las células con mayor plasticidad del sistema hematopoyético, por lo que están presentes prácticamente en todos los tejidos, estando en constante cambio de sus capacidades funcionales en respuesta a alteraciones en la estructura o función de tejidos, variaciones ambientales y señales tanto del sistema inmune innato como del adaptativo (13,14).

Los macrófagos derivan de células mononucleares presentes en sangre periférica (PBMC), que migran a los tejidos en respuesta a señales proinflamatorias. Las PBMC se desarrollan de un progenitor de origen mieloide en órganos linfoides primarios, incluyendo el hígado fetal y principalmente la médula ósea, mediante un proceso derivado de la hematopoyesis llamado mielopoyesis (13).

Las células troncales hematopoyéticas (HPC) dan origen a los progenitores mieloides comunes o progenitores multipotentes (MPC) que posteriormente se transformarán a progenitores granulo-monocíticos (GMP), los cuales derivan en las células precursoras o progenitoras mieloides, que representan cerca del 90% de las células presentes en médula ósea. Estas células a su vez dan origen a las unidades formadoras de colonias granulocíticas (CFU-G) y monocíticas (CFU-M), que madurarán a monoblastos, promonocitos y monocitos, los cuales incrementan su actividad proliferativa en médula ósea en respuesta a estímulos principalmente inflamatorios, ocasionando una monocitosis transitoria. Estos monocitos eventualmente llegan a los tejidos blanco, donde se diferencian a macrófagos. **Figura 1.**

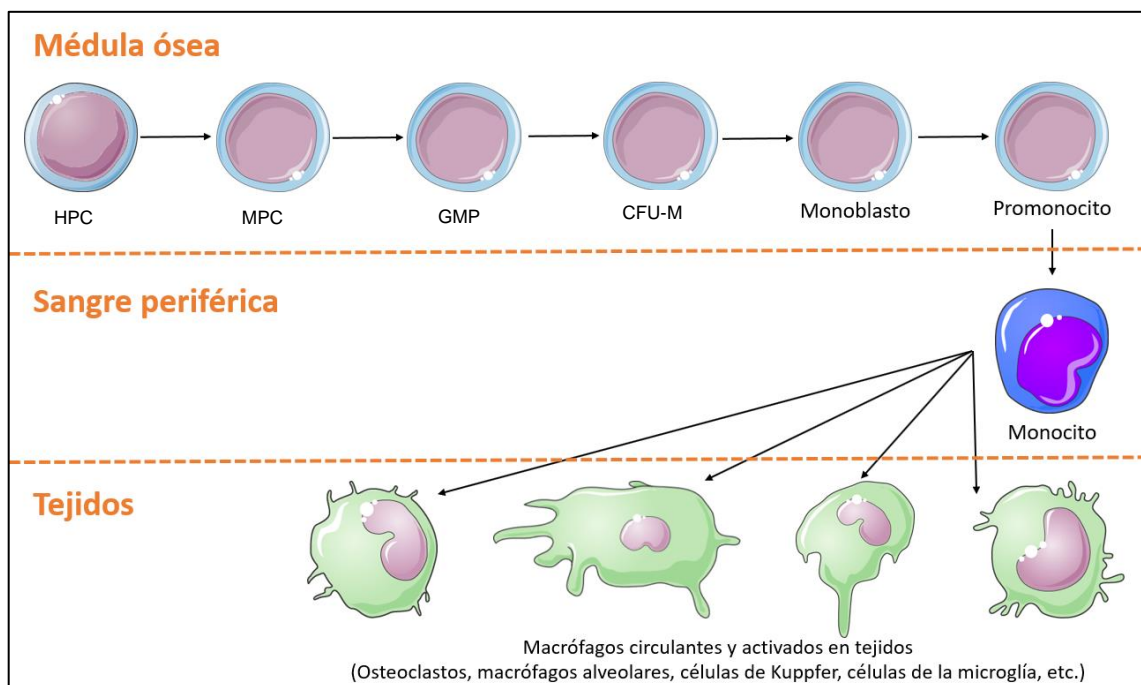


Figura 1. Proceso de mielopoyesis (Adaptado de Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. En: Nature Reviews Immunology. 2008. Pp: 958–69.)

Este proceso está mediado por varios genes y factores de transcripción, que ocasionan la expresión de diferentes marcadores de superficie en estas células, siendo el CD14 el principal implicado (y en menor medida CD16), encontrándose fuertemente expresado en monocitos y la mayoría de macrófagos en tejidos, pero con poca o nula expresión en monoblastos y promonocitos, por lo que la

identificación de células CD14+ sirve como método de identificación de estos subtipos celulares (15).

RESISTENCIA NATURAL EN BOVINOS *Bos taurus taurus* ASOCIADA A MACRÓFAGOS

Se ha propuesto que los macrófagos pueden ser un buen marcador del fenotipo de resistencia y susceptibilidad en el modelo bovino, lo cual se sustenta en diversos estudios en los que se evalúa la replicación intracelular y fagocitosis de bacterias patógenas y apatógenas.

En un trabajo de Gutiérrez-Pabello y Adams (16), realizaron ensayos bactericidas como el propuesto por Qureshi (12) utilizando *Mycobacterium bovis* Cepa El paso, la cual fue aislada de lesiones tuberculosas de un bovino reactor a la prueba de tuberculina. Se usaron macrófagos de bovinos *Bos taurus taurus* previamente fenotipificados como resistentes y susceptibles con un desafío *in vivo* con *B. abortus*. El fenotipo de los macrófagos de estos bovinos se correlacionó con el estudio *in vivo*, encontrando diferencia significativa entre individuos resistentes y susceptibles, con lo que se comprobó que el ensayo propuesto también muestra la diferencia en el control intracelular bacteriano cuando se usa una cepa virulenta como modelo.

De igual forma, se ha logrado demostrar la relación entre la capacidad bactericida del macrófago bovino y la producción de óxido nítrico por estas células. Esquivel-Solís y colaboradores (17) obtuvieron monocitos derivados de sangre periférica de 24 bovinos de la raza Holstein-Friesian; estos monocitos fueron posteriormente diferenciados a macrófagos, con los cuales se realizó un ensayo bactericida infectándolos con *Mycobacterium bovis* BCG Danesa y las cepas patógenas (de *M. bovis*) 9926 y 129QP, con lo que se obtuvo el fenotipo de resistencia de estos macrófagos, descubriendo un total de 3 individuos resistentes (12.5%). Adicionalmente se midió la producción de óxido nítrico en

macrófagos de ambos fenotipos mediante la reacción de Griess; este ensayo mostró una diferencia significativa en la producción de nitritos por las células ante el estímulo de LPS y/o la micobacteria, siendo mayor en los individuos previamente fenotipificados como resistentes que en los susceptibles.

De igual forma se hizo la correlación entre el fenotipo de resistencia y la capacidad de los macrófagos en realizar apoptosis, muerte celular que ha sido relacionada con un efectivo control de patógenos. Mediante la tinción de yoduro de propidio se observó una tendencia de mayor presencia de células con cromatina condensada (característico en células apoptóticas) en macrófagos de individuos resistentes que en los macrófagos fenotipificados como susceptibles.

El efecto de la activación clásica y alterna de los macrófagos bovinos también ha sido evaluado. En un estudio llevado a cabo por Castillo-Velázquez y colaboradores (18) se relacionó el fenotipo de resistencia en bovinos *Bos taurus taurus* (obtenido mediante ensayos bactericidas), y los diferentes perfiles de citocinas producidos en una activación clásica y alterna de macrófagos, en donde se demostró que la activación por vía clásica de los macrófagos de animales resistentes, produjo una mayor cantidad de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 (cuantificada mediante la expresión de genes en una PCR en tiempo real), aunado a la producción de óxido nítrico (medido por la reacción de Griess) ante un estímulo con IFN- γ y/o lipopolisacárido (LPS) bacteriano.

Esta evidencia comprueba que el ensayo bactericida originalmente propuesto por Qureshi, es una buena herramienta para fenotipificar individuos como resistentes y susceptibles, independientemente de las bacterias y cepas utilizadas, sean estas patógenas o apatógenas, correlacionando el fenotipo de resistencia con la respuesta de estas células ante determinados estímulos.

RESISTENCIA NATURAL EN BOVINOS *Bos taurus indicus*

Otro aspecto que se ha revisado sobre la resistencia a enfermedades infecciosas, son las diferencias que hay en el control de enfermedades entre diferentes razas y subespecies en animales productivos, y los bovinos no son la excepción, ya que se han observado diferencias en el control de enfermedades entre bovinos europeos (*Bos taurus taurus*) y bovinos cebús (*Bos taurus indicus*).

La subespecie bovina *Bos taurus indicus* es originaria de Asia. El uso de estos bovinos en la ganadería es recurrido debido a características físicas y productivas atractivas para los productores, como la alta tolerancia al calor y condiciones adversas que presentan algunas regiones geográficas, así como la poca permisividad a la infestación por parásitos externos e internos, por lo que son ampliamente utilizados en programas reproductivos, realizando cruzamientos selectivos con bovinos de la subespecie *Bos taurus taurus* (19).

En un estudio de Bock y Kingston (20) se evaluó la resistencia innata de bovinos *B. taurus indicus* de la raza Brahman y de cruza F1 con la raza Charoláis (*B. taurus taurus*) a diferentes especies de *Babesia* spp., protozooario transmitido por la garrapata *Boophilus microplus*. Los grupos fueron puestos en praderas infestadas y se evaluó la cantidad de garrapatas en los bovinos, así como la presencia de anticuerpos y signos clínicos de babesiosis. Ambos grupos presentaron seroconversión para *Babesia* spp. a los 35 días, presentándose títulos de anticuerpos mayores en los bovinos F1, aunado a que el 75% de este grupo presentó una anemia severa en comparación con el 36% de los bovinos Brahman. Se presentaron signos clínicos severos en cerca del 20% de las cruza y muerte de dos individuos, siendo 10 veces menos los casos de enfermedad grave en los bovinos cebú y sin presentarse mortalidad.

Así mismo, Bakheit y Latif (21) comprobaron mediante un desafío *in vivo* que los bovinos Holstein son notablemente más susceptibles a la infección por el parásito intracelular *Theileria annulata* en comparación con bovinos cebú de la raza Kenana.

Recientemente, Mittal y colaboradores (22) estudiaron la posibilidad de una predisposición racial entre subespecies bovinas, a abortos ocasionados por *Brucella abortus*. El trabajo fue realizado en India en una producción lechera con ganado Frieswal (resultante de la cruce de bovinos Holstein Friesian con cebús de la raza Sahiwal) y bovinos Sahiwal puros. Mediante pruebas serológicas, moleculares y aislamiento del agente, constataron que, de la totalidad de abortos en el hato, la mayoría de estos (45%) eran provenientes de bovinos Frieswal, presentándose en menor medida en las razas cebuinas puras, lo que podría indicar cierta predisposición a la brucelosis bovina determinada por el genotipo del ganado europeo.

Adicionalmente, Vordermeier y colaboradores (23) realizaron un estudio epidemiológico en Etiopía en el que encontraron diferencias en el control de la tuberculosis bovina entre ganado Holstein y Cebú (principalmente de la raza Arsi) mantenidos en condiciones de pastoreo, esto mediante la comparación de resultados de la prueba intradérmica, examen *post-mortem* y bacteriología. La prevalencia de la enfermedad fue menor en razas cebuinas que en ganado Holstein; además, la severidad de las lesiones encontradas en la necropsia fue menor en ganado cebú y sus cruces, en comparación con el Holstein, aunado a los valores menores obtenidos en la prueba intradérmica y el examen bacteriológico.

La evidencia presentada sugiere que los bovinos de la subespecie *Bos taurus indicus* son menos permisivos a patógenos, lo que da pie a especular qué es lo que está definiendo esta resistencia en comparación a los bovinos de origen europeo (*Bos taurus taurus*). Pese a la investigación realizada, aún se desconoce si las subespecies cebuinas son más resistentes a patógenos bacterianos que las razas de bovinos de origen europeo, así como el papel preciso de los macrófagos derivados de sangre periférica en este fenómeno, considerando que estas células del sistema inmune han mostrado ser un buen marcador sobre el fenotipo de resistencia a patógenos intracelulares.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la resistencia natural a patógenos de interés veterinario comenzó en los inicios del siglo XX, pero con el auge de los antibióticos y antiparasitarios esta característica deseable se fue olvidando. Sin embargo, el uso indiscriminado de dichos productos ocasionó el surgimiento de bacterias y parásitos resistentes a fármacos, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de control de microorganismos que merman la producción animal.

El uso de razas cebuinas con fines zootécnicos está ampliamente distribuido en algunas regiones tropicales, y es sabido que estos animales suelen ser menos permisivos a la colonización de agentes patógenos bacterianos y parasitarios, así como a la consecuente enfermedad. Por lo tanto, es necesario el estudio de los mecanismos que podrían regular esta resistencia, para que, mediante cruzamientos selectivos, se pueda obtener animales con parámetros productivos aceptables y que sean menos propensos a enfermarse, lo que derivaría en menores mermas a los productores.

Por lo tanto, la identificación de individuos con mayor resistencia a patógenos bacterianos de vida intracelular permitirá iniciar diferentes acercamientos científicos para incrementar la resistencia natural de los hatos, lo que podría repercutir en una menor incidencia de enfermedades de importancia económica y para la salud pública.

HIPÓTESIS

El fenotipo de resistencia natural a patógenos intracelulares está presente con mayor frecuencia en bovinos *Bos taurus indicus* que en bovinos *Bos taurus taurus*, el cual puede ser evidenciado mediante la capacidad bactericida de los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el fenotipo de resistencia natural a patógenos bacterianos de vida intracelular en bovinos *Bos taurus indicus* mediante ensayos bactericidas con *Brucella abortus* 2308 para asociarlo con los perfiles fenotípicos observados en la subespecie *Bos taurus taurus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Generar un biobanco celular mediante la extracción y congelación de células mononucleares de sangre periférica de donadores *Bos taurus indicus* para la realización de ensayos bactericidas
- Realizar ensayos bactericidas con macrófagos de bovinos *Bos taurus indicus* infectados con *Brucella abortus* 2308 para identificar fenotipos de resistencia natural a bacterias intracelulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

Para el presente estudio se trabajó con un hato de bovinos *Bos taurus indicus* perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este hato es cerrado y libre de enfermedades de campaña nacional, como brucelosis y tuberculosis. Se seleccionaron 30 bovinos hembras con las siguientes características: raza Brahman blanco puro, mayores a 2 años de edad, que no estuvieran gestantes y se encontraran clínicamente sanas.

Todos los procedimientos fueron previamente aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA), con el número de protocolo 615.

GENERACIÓN DE BIOBANCO CELULAR

Se generó un biobanco de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) extraídos mediante una modificación del protocolo de Campbell y Adams (24). Se colectó asépticamente sangre periférica mediante punción de la vena yugular, utilizando jeringas de 60 ml con 3.5 ml de anticoagulante ácido cítrico dextrosa (ACD) [75 mM citrato trisódico, 41.6 mM ácido cítrico, 135 mM glucosa, pH 5.0] por cada 30 ml de sangre. La muestra se procesó dentro de las primeras 4 horas después de su obtención.

La jeringa con sangre completa se desinfectó con etanol al 70% y se desechó la sangre presente en la punta de la jeringa. Posteriormente, la sangre completa se transfirió a tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 800 \times g por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) para obtener la capa flogística. Esta capa se recuperó en otro tubo y se aforó a 30 ml con PBS-Citrato (PBS-C) [1.5 mM cloruro

de sodio, 9.1 mM fosfato de sodio monobásico, 1.25 fosfato de sodio dibásico, 12.5 mM ácido cítrico trisódico, pH 7.4]. Esta suspensión se depositó cuidadosamente sobre 15 ml (relación 2:1) de una solución de polisucrosa y diatrizoato de sodio con densidad específica de 1.077 g/ml llamada Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), evitando que ambas fases se mezclen. Este tubo se centrifugó a 400 ×g durante 30 minutos a TA. Con una pipeta de transferencia se recuperó la interfase de células mononucleares y se realizaron 3 lavados con 35 ml de PBS-C, centrifugando a 350 ×g por 15 minutos a TA.

Antes del último lavado se reservaron 50 µl para realizar la evaluación de viabilidad y conteo celular (CC) en una cámara de Neubauer, haciendo una dilución 1:3 con PBS-C y 1:1 azul tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) (dilución final 1:4). Se cargaron 10 µl en ambos cuadrantes de la cámara y se realizó el CC. El número total de células obtenidas se calculó de la siguiente forma:

$$CT = CC / CCC * 10000 * FD * ml$$

CT = Células totales

CC = Conteo Celular

CCC = Cuadrantes Contados de Cámara (8)

10000 = Capacidad total de la cámara de Neubauer

FD = Factor de Dilución (4)

ml = ml totales de suspensión celular (35)

El número total de células obtenidas se resuspendió a una concentración de 2×10^7 /ml de medio de congelación, el cual constaba de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, New York) y 10 % dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), esterilizado por filtración en membrana de 20 µm. Una vez resuspendidas las células en este medio se depositó 1 ml en viales de criogenización.

Para realizar la criogenización, los viales se colocaron a temperatura de congelación (-12 a -20°C) durante 20 minutos. Tras este periodo, se expusieron

a vapores de nitrógeno (-80°C), procurando que no tocaran el nitrógeno líquido durante 20 minutos, para posteriormente colocarlos en varillas de aluminio y en el nitrógeno líquido (-195°C) hasta su utilización.

OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Los viales obtenidos del biobanco se descongelaron en baño maría a 37°C durante 90 segundos o hasta observar que quedara una mínima parte congelada. Tras esto los viales se desinfectaron con etanol al 70% y el contenido se transfirió con micropipeta a un tubo de centrifuga de 15 ml con 8 ml de medio "Roswell Park Memorial Institute" 1640 complementado (cRPMI 1640) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), dejándolo caer lentamente por las paredes del tubo, el cual se centrifugó a 122 xg durante 10 min para retirar el medio de congelación. Se realizaron 3 lavados al botón celular obtenido, resuspendiéndolo en 8 ml de cRPMI 1640 y se centrifugó en las mismas condiciones antes descritas.

Después del último lavado, el botón celular se resuspendió en 2 ml de medio cRPMI 1640 y se dispusieron 700 µl por pozo en una placa para cultivo celular de poliestireno de 24 pozos con fondo plano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri No. Cat. 3526). Se dejó la placa incubando a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda durante 2 horas, para permitir la adherencia de las células al fondo del pozo. Tras este periodo, el sobrenadante se pasó a otro pozo de la placa y se reemplazó con cRPMI 1640 suplementado con 12% de suero autólogo de los bovinos, para su incubación final en las mismas condiciones de temperatura, humedad y CO₂. Los monocitos obtenidos por adherencia fueron mantenidos en las mismas condiciones antes descritas, realizando cambios de medio cada 3 días hasta su diferenciación a macrófagos, la cual se dio tras 12 días de incubación.

COSECHA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS

Al observarse que los monocitos se diferenciaron a macrófagos se despegaron de la placa de cultivo celular, para lo cual se les retiró el medio que contenían y se les adicionó 1 ml de EDTA 2mM en PBS 1x (EDTA 2mM, 1.5 mM cloruro de sodio, 9.1 mM fosfato de sodio monobásico, 1.25 fosfato de sodio dibásico, pH 7.4), dejando incubar a 37°C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda durante 25 minutos. Tras este periodo de incubación las células se despegaron con pipeteo gentil y el contenido se transfirió a un tubo de 15 ml, reservando 50 µl para realizar conteo de viabilidad celular para después centrifugar a 500 ×g en temperatura de refrigeración durante 10 minutos. Durante el periodo de centrifugación se realizó el conteo de viabilidad celular en una cámara de Neubauer (hemocitómetro). Se retiró el sobrenadante del tubo y el botón celular se resuspendió en cRPMI 1640 con suero autólogo al 12% necesario para que la suspensión celular quedara a una concentración de 1000 células/µl. Posteriormente, los macrófagos fueron sembrados en placas de Terasaki estériles (Nunclon Surface™, NUNC) a una concentración de 1x10⁴ macrófagos por pozo y se incubaron durante no más de 24 hrs a 37°C, 5% de CO₂ y en una atmósfera húmeda, hasta su utilización en el ensayo bactericida.

FENOTIPIFICACIÓN DE MACRÓFAGOS

Para corroborar que las células fueron diferenciadas a macrófagos se midió la expresión del marcador de superficie CD14 mediante citometría de flujo. Para esto, un lote representativo de las células fueron descongeladas, cultivadas y cosechadas acorde al protocolo antes descrito y se resuspendieron a una concentración de 1x10⁵ células/ml en buffer (EDTA 2mM en PBS 1x y 10% de albúmina sérica bovina). Posteriormente se agregó el anticuerpo contra CD14 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) acorde al protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) y se procesaron en un citómetro BD FACS Aria Ilu, perteneciente al Laboratorio de Citometría de Flujo del Centro de Instrumentos del Hospital de Especialidades “Siglo XXI”. Los datos obtenidos

en el citómetro fueron analizados con ayuda del software FlowJo (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey).

ELABORACIÓN DE INÓCULO DE *Brucella abortus* 2308

Para realizar la infección de los macrófagos se realizó un inóculo de *Brucella abortus* 2308, cepa amablemente donada por la Dra. Beatriz Arellano Reynoso. Todo el proceso de elaboración y cuantificación de los inóculos, así como los ensayos bactericidas, fueron realizados en la Unidad de Bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

La cepa se creció en agar tripticasa soya (TSA) (MCD Lab, Tlalnepantla, Edo. de México) durante 72 hrs. Tras este tiempo se tomaron 5 colonias con un asa microbiológica y se sembraron en 10 ml de caldo Luria Bertani (LB) (DIBICO, Cuautitlán, Edo de México) y se incubó en agitación a una temperatura de 37°C durante 24 hrs. Posteriormente se tomó 1 ml de este caldo con crecimiento bacteriano, se inoculó en 9 ml de caldo LB y se incubó en agitación a 37°C por 4 hrs. Una vez transcurrido este periodo, se tomó 1 ml del caldo y se sembró en 49 ml de caldo LB, incubando en agitación a 37°C durante 18 hrs.

Una vez que se tuvo este crecimiento bacteriano, el caldo se transfirió a tubos de centrífuga de 50 ml y se centrifugó a 1852 $\times g$ durante 25 minutos a 4°C. Tras esto, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 25 ml de PBS 1x [1.5 mM cloruro de sodio, 9.1 mM fosfato de sodio monobásico, 1.25 mM fosfato de sodio dibásico, pH 7.4] para hacer lavados, repitiendo el proceso en dos ocasiones.

Tras el último lavado la pastilla celular se resuspendió y homogenizó en 20 ml de cRPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), tras lo cual se dispuso en alícuotas de 1 ml en tubos de 1.5 ml estériles y estos se mantuvieron a -72°C hasta su utilización.

CUANTIFICACIÓN DE INÓCULO DE *Brucella abortus* 2308

El vial de *B. abortus* se descongeló a temperatura ambiente y se realizaron diluciones décuples seriadas del mismo. Posteriormente, se sembraron 100 µl de las diluciones seleccionadas (10^{-6}) en toda la superficie de placas de agar TSA, las cuales se incubaron a 37°C durante 48 hrs. Las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas se contaron y se obtuvo el número total de UFC por mililitro de la siguiente forma:

$$\text{UFC/ml} = \text{UFC} * \text{FD} * 10$$

UFC = Unidades Formadoras de Colonias

FD = Factor de dilución

10 = multiplicación para obtener las UFC en el mililitro del inóculo original

La cuantificación se realizó por triplicado a 3 inóculos diferentes, para obtener un promedio de UFC/ml del lote total de inóculos generados.

ENSAYO BACTERICIDA

El ensayo bactericida se realizó acorde al propuesto por Qureshi y colaboradores (12) con las siguientes modificaciones:

Se trabajó a la par en dos placas de Terasaki, cada una contenía tres pozos con macrófagos a una concentración de 1×10^4 por pozo. En una placa se evaluó la fagocitosis de las células (T0) y en la otra la supervivencia intracelular de las bacterias a las 12 hrs (T1). Como control positivo se utilizó un inóculo bacteriano a una concentración de 1×10^6 , diluyendo el inóculo original en medio cRPMI.

Se les retiró el medio a los pozos con macrófagos, reemplazándolo por medio con bacterias a una multiplicidad de infección (MOI) 5:1 (5 bacterias por célula). Para evaluar la viabilidad del inóculo, en ambas placas se colocó un pozo con la

misma cantidad de bacterias en medio cRPMI y sin células. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C, 5% CO₂ en una atmósfera húmeda.

Tras este periodo de incubación se eliminaron las bacterias extracelulares que no fueron fagocitadas, para lo cual se retiró el medio a los macrófagos y se reemplazó con gentamicina a 40µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) en PBS 1x, disponiendo 10 µl del antibiótico por pozo y se incubó durante 60 minutos en las condiciones descritas anteriormente. Al pozo que contenía sólo bacterias de la placa T0 también se le agregaron 10 µl gentamicina, para que funcionara como control de eficacia del antibiótico (Control de gentamicina).

Durante este periodo de incubación se realizaron diluciones décuples seriadas del inóculo utilizado para corroborar que se ocupó la MOI adecuada (Control de inóculo), por lo cual se prepararon tubos de 1.5 ml con 450 µl de PBS 1x, en los cuales se hicieron las diluciones correspondientes. Se seleccionaron las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ y de éstas se tomaron 100 µl, los cuales fueron sembrados en placas de agar TSA con un diseminador bacteriano y se incubaron a 37°C durante 48 hrs, tras lo cual se contaron las UFC obtenidas y se calcularon las UFC/ml de la forma descrita anteriormente.

Una vez transcurrido el periodo de incubación con la gentamicina, se retiró el antibiótico y fueron realizados 3 lavados con medio cRPMI; a partir de este momento se trabajó con las placas por separado como se describe a continuación:

Las células de la placa T0 fueron lisadas con Tritón 100x al 1% (Bio-Rad, Hercules, California) en PBS 1x, retirando previamente el medio que tenían y se incubó a temperatura ambiente 5 min. El lisado celular se recuperó en tubos de 1.5 ml con 450 µl de PBS 1x, se hicieron 4 lavados de los pozos utilizando PBS 1x y se recuperaron en el mismo tubo. Se realizaron dos diluciones décuples seriadas de este tubo, de las cuales se tomaron 100 µl que fueron sembradas en placas de agar TSA con un diseminador bacteriano y se incubaron a 37°C durante 48 hrs. Tras esta incubación se contaron las UFC obtenidas y se calcularon las UFC/ml.

Tras los lavados con medio RPMI, a cada pozo con células de la placa T1 se le agregaron 10 µl de medio RPMI con suero autólogo al 12%. Al pozo que únicamente contenía bacterias, se le agregaron 10 µl de medio cRPMI para evitar que se secase (Control de crecimiento) y se dejó incubando a 37°C, con 5% CO₂ en una atmósfera húmeda durante 12 horas, tiempo correspondiente al de un ciclo y medio del tiempo de duplicación de la bacteria. Una vez terminada la incubación, las células fueron lisadas, diluidas y sembradas de la misma forma que en la placa T0.

El contenido de los pozos del control de gentamicina y control de inóculo de ambas placas también fue recuperado, diluido y sembrado de la misma forma, eligiendo para ello la dilución 10⁻¹ y 10⁻⁴, 10⁻⁵, respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada ensayo se hizo por triplicado de pozos con el mismo tratamiento, y dos veces de forma independiente, utilizando células e inóculos diferentes. El porcentaje de supervivencia intracelular del T1 fue obtenido con las UFC/ml obtenidas en esta placa en proporción con las obtenidas en el T0. Los resultados son expresados como la media del porcentaje de supervivencia intracelular obtenida en ambos ensayos +/- la desviación estándar de los datos. El punto de corte establecido para definir el fenotipo de resistencia es 70% para *Brucella abortus*.

Para el análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Mann-Whitney; un valor de $P \leq 0.5$ se consideró como significativo.

El análisis estadístico, así como las gráficas presentadas fueron realizadas con el programa *GraphPad Prism* versión 8.4.1 (GraphPad Software, LLC).

RESULTADOS

BIOBANCO CELULAR

Se realizó el sangrado, extracción de células mononucleares de sangre periférica y congelación de las mismas de un total de 30 bovinos de la raza Brahman blanco, hembras no gestantes de 2 a 15 años de edad. El promedio de PBMC extraídos por animal fue de 1.36×10^8 por jeringa de 60 ml de sangre completa. Los resultados de este muestreo se compilan en la **Tabla 1**.

NO. IDENTIFICACIÓN	AÑO DE NACIMIENTO	PBMC OBTENIDOS
864-2	2012	163,000,000
980-4	2014	170,400,000
796-1	2011	170,000,000
972-4	2014	36,160,000
792-1	2011	213,100,000
954-4	2014	164,000,000
964-4	2014	164,000,000
975-4	2014	185,000,000
871-2	2012	84,400,000
895-3	2013	141,600,000
952-4	2014	118,400,000
976-4	2014	104,800,000
787-1	2011	95,200,000
824-3	2013	16,150,000
666-9	2009	105,750,000
87-7	2007	198,000,000
78-8	2009	130,900,000
814-3	2003	78,050,000
764-8	2009	191,100,000

808-2	2002	204,750,000
880-2	2012	121,000,000
42-6	2006	148,275,000
49-7	2007	75,600,000
367-6	2016	116,900,000
349-6	2016	85,000,000
171-8	2009	190,775,000
251-8	2009	112,000,000
63-6	2006	179,500,000
48-6	2006	221,750,000
799-1	2011	122,000,000

Tabla 1. Cantidad de PBMC totales extraídos y congelados a partir de sangre periférica de bovinos *Bos taurus indicus*

OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE PBMC

Tras la descongelación de las diferentes muestras del biobanco celular, se logró la adherencia y diferenciación a macrófagos de un total de 20 de las 30 muestras, las cuales muestran una membrana bien definida que da una forma circular, citoplasma granular y son refringentes al observarse en microscopio (**Figura 2A**). Para confirmar este resultado, se realizó una citometría de flujo, con la cual se determinó que el 99.4% de las células incubadas durante 12 días presentaron la expresión del marcador de superficie CD14 (**Figura 2B**). Las células con viabilidad y concentraciones adecuadas fueron utilizadas para los ensayos bactericidas.

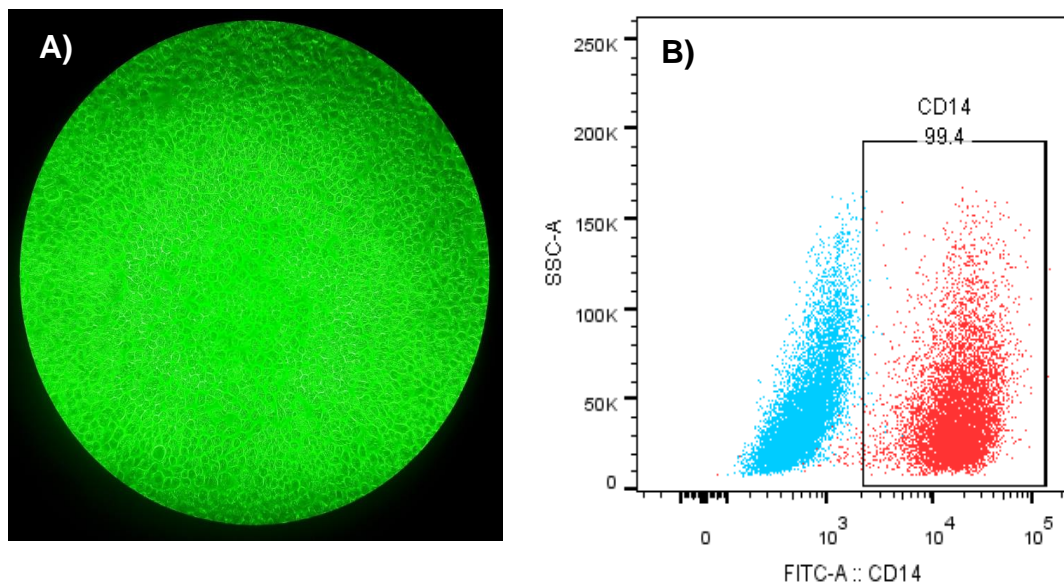


Figura 2. Monocitos derivados de células mononucleares de sangre periférica de bovino. A) Fotografía representativa de células adheridas en placa de cultivo celular observadas en microscopio invertido a 40X. B) Citometría de flujo de la expresión del marcador CD14. Se muestra un *dot plot* de granularidad y emisión de autofluorescencia, así como la derivada de la unión del conjugado FITC-CD14. En azul, cercano al eje de las abscisas se muestra la autofluorescencia de las células; del lado derecho, en color rojo, las células con fluorescencia emitida tras la conjugación con el anticuerpo anti-CD14. Experimento representativo de 2 réplicas independientes.

INÓCULO DE *Brucella abortus* 2308

La cuantificación de tres lotes de *Brucella abortus* 2308 fue muy similar, en promedio los inóculos mostraron una viabilidad de 1×10^9 (Tabla 2).

FECHA	UFC/ml
05/06/2018	806,600,000
17/07/2018	1185,000,000
02/02/2019	1036,000,000
PROMEDIO	1009,200,000

Tabla 2. Concentración (expresada en UFC/ml) de los diferentes lotes de inóculos de *Brucella abortus* 2308 utilizados. Datos representativos de 3 repeticiones independientes, cada una hecha por triplicado.

ENSAYOS BACTERICIDAS

Tras la descongelación de los diferentes lotes de PBMC de los bovinos, pudimos observar que no todas las muestras fueron viables para llevarlas hasta su diferenciación y cosecha para el ensayo, logrando un total de 20 ensayos realizados (**Tabla 3**).

NO. IDENTIFICACIÓN	% SOBREVIVENCIA INTRACELULAR	FENOTIPO
764-8	26,47	Resistente
367-6	44,89	Resistente
796-1	46,55	Resistente
964-4	47,01	Resistente
799-1	63,93	Resistente
880-2	64,66	Resistente
349-6	66,79	Resistente
954-4	67,66	Resistente
864-2	73,63	Susceptible
792-1	76,36	Susceptible
952-4	85,19	Susceptible
666-9	87,50	Susceptible
975-4	88,41	Susceptible
48-6	97,10	Susceptible
171-8	107,66	Susceptible
808-2	130,79	Susceptible
824-3	135,38	Susceptible
87-7	155,40	Susceptible
251-8	156,52	Susceptible
980-4	162,08	Susceptible

Tabla 3. Porcentaje de sobrevivencia de *Brucella abortus* 2308 en macrófagos bovinos para su fenotipificación (Representado como el promedio de los 3 resultados intraensayo y de las 2 repeticiones independientes).

Los resultados de los ensayos mostraron que 40% (8) de los individuos controlaron de mejor manera a la bacteria intracelular, siendo menor al 70% el porcentaje de UFC recuperadas en comparación a la cantidad con la que fueron desafiados. Por otro lado, 60% (12) no tuvieron un eficiente control de la bacteria, siendo mayor al 70% las UFC recuperadas, inclusive la mitad de estos tuvo un porcentaje de sobrevivencia mayor al 100%, lo que indicaría que todas las bacterias con las que se hizo la infección pudieron replicarse al menos una vez, por lo que se clasificaron como susceptibles (**Figura 3**).

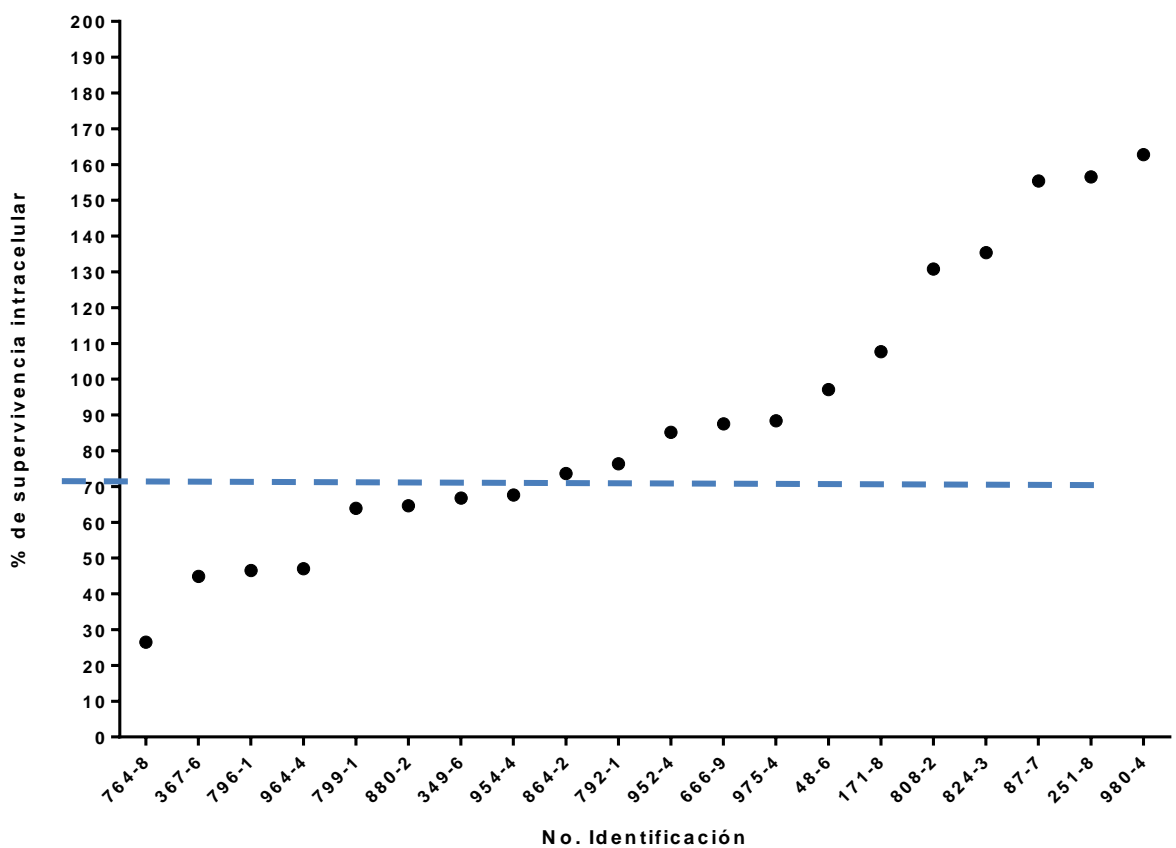


Figura 3. Fenotipificación de macrófagos bovinos expresada en porcentaje de supervivencia intracelular de *Brucella abortus* 2308. La línea punteada indica el punto de corte establecido en 70%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos permitieron clasificar a los individuos en dos grupos, el de resistentes, con una media de crecimiento intracelular de la bacteria de 53.49%, y el de susceptibles, que tuvo una media de 113.06%, siendo la diferencia entre estas medias estadísticamente significativa con un valor $P < 0.0001$ (Tabla 4, Figura 4).

FENOTIPO	MEDIA DEL GRUPO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	NÚMERO DE INDIVIDUOS
Resistente	53.49	14.66	8
Susceptible	113.06	33.29	12

Tabla 4. Media y desviación estándar de los grupos resistentes y susceptibles obtenidos mediante ensayos bactericidas de los bovinos fenotipificados

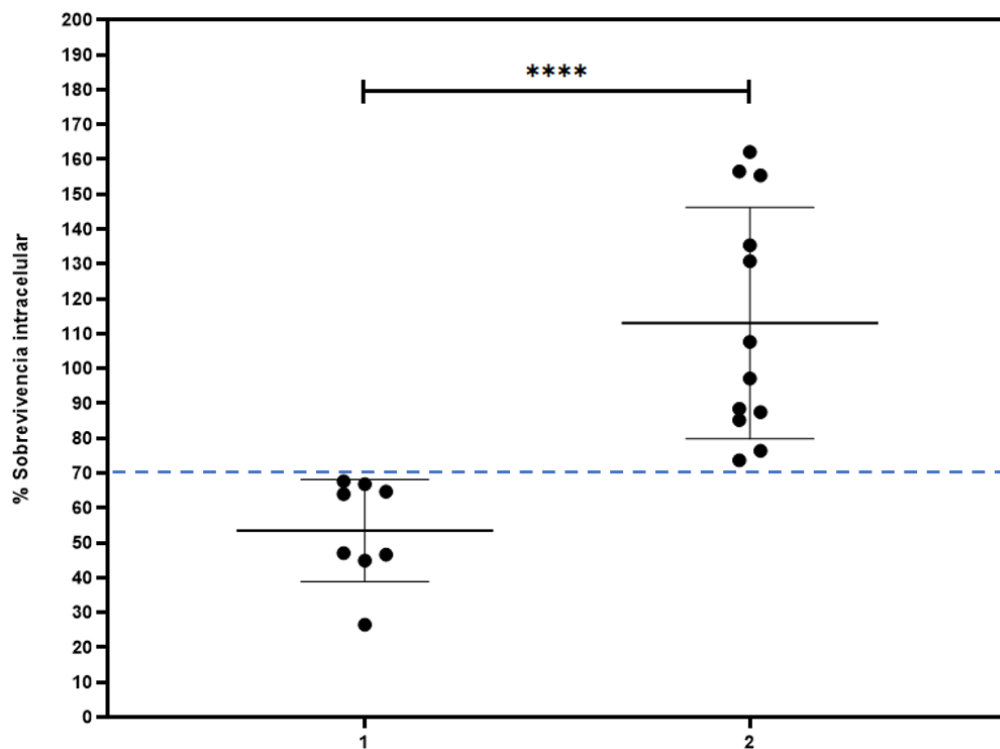


Figura 4. Distribución de los fenotipos y grupos resultantes obtenidos por la infección de macrófagos bovinos con *Brucella abortus* 2308. La línea punteada

indica el punto de corte establecido en 70%. $P < 0.0001$. (1: Resistentes; 2: Susceptibles)

VALIDACIÓN DE ENSAYO BACTERICIDA

Una vez realizados los ensayos bactericidas, utilizamos otra bacteria intracelular para corroborar la eficacia del ensayo en la fenotipificación de macrófagos, independientemente de la bacteria utilizada como modelo. En este caso se optó por trabajar con *Mycobacterium bovis* BCG subcepa danesa, utilizando un animal previamente identificado como resistente y otro como susceptible mediante el ensayo con *B. abortus*. (**Anexo 1**).

Los resultados reflejan que, a pesar de la variación en el porcentaje de sobrevivencia, el fenotipo obtenido con *B. abortus* se mantiene utilizando *M. bovis* como modelo, lo cual sugiere que el ensayo propuesto podría ser una herramienta útil para definir el fenotipo de los macrófagos de diferentes individuos al ser expuestos a diferentes bacterias intracelulares, independientemente de su patogenicidad. (**Tabla 5, Figura 5**)

NO. IDENTIFICACIÓN	SOBREVIVENCIA INTRACELULAR CON <i>B. abortus</i> 2308	SOBREVIVENCIA INTRACELULAR CON <i>M. bovis</i> BCG danesa	FENOTIPO OBTENIDO
796 - 1	46.55%	44.53%	Resistente
980 - 4	162.08%	90.90%	Susceptible

Tabla 5. Comparación del porcentaje de sobrevivencia de *B. abortus* y *M. bovis* en macrófagos bovinos.

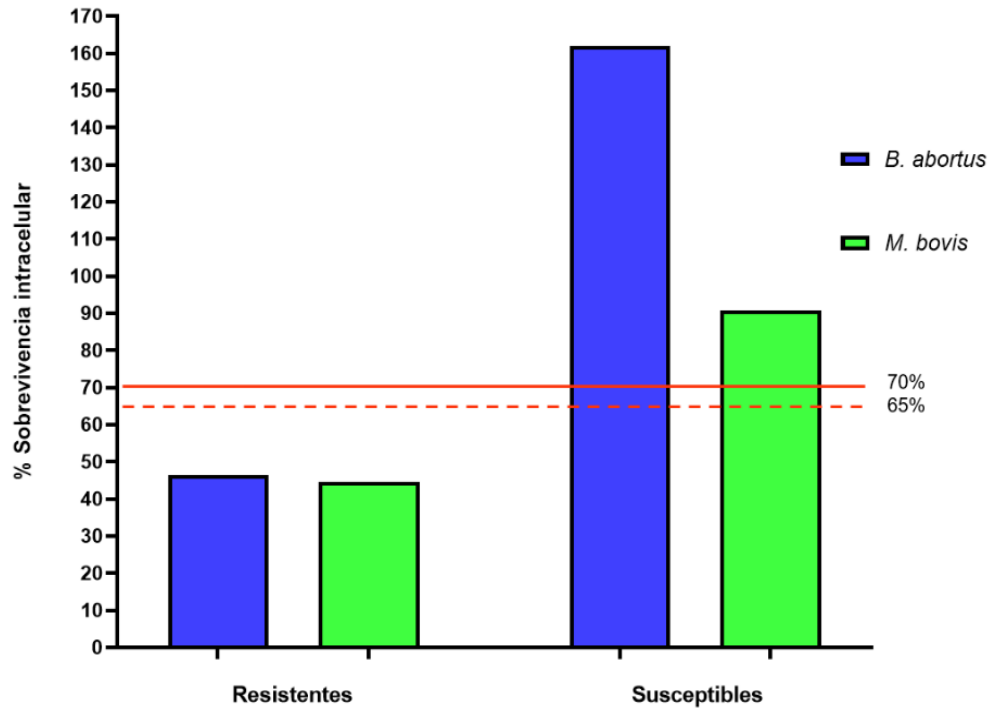


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia de *B. abortus* y *M. bovis* en macrófagos de bovinos fenotipificados como resistentes y susceptibles. Línea sólida: Punto de corte establecido para *B. abortus*; línea punteada: Punto de corte establecido para *M. bovis*.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó un ensayo bactericida con macrófagos derivados de PBMC de bovinos donadores de la subespecie bovina *Bos taurus indicus*. Mediante este ensayo se detectó un total de 8 (40%) animales resistentes, porcentaje mayor al reportado por autores en diversos trabajos (12,16–18) en bovinos *Bos taurus taurus*, en los que se obtiene un porcentaje que oscila entre el 9 y 20% de animales resistentes utilizando el mismo ensayo. Los resultados son concordantes con los obtenidos por Qureshi y colaboradores (12), quienes obtuvieron una menor cantidad de animales resistentes en comparación con los susceptibles, siendo los resistentes los que tenían una menor dispersión en los datos, tendiendo a agruparse hacia la media del grupo o fenotipo (**Figura 5**).

Se observa una tendencia de mayor resistencia a patógenos intracelulares en subespecies cebuinas, mas no se puede asegurar que la resistencia en estos animales está totalmente determinada por la acción fagocítica y bactericida de los macrófagos, puesto que en este tipo de ensayos *in vitro*, aunque se controla la mayor parte de variables posibles, no considera otros factores que pueden influir en la respuesta a patógenos, como las variables ambientales y la respuesta de los individuos a las mismas. Por tanto, no se puede asegurar que el fenotipo obtenido se vaya a comportar igual en un organismo complejo, como un bovino.

Numerosos autores han estudiado diferentes aspectos que podrían estar definiendo el fenotipo de resistencia en macrófagos de bovinos *Bos taurus taurus* e *indicus*. Martínez y colaboradores (25) evaluaron la presencia de polimorfismos en la región 3' UTR del gen *Slc11a1* en bovinos F1 fenotipificados como resistentes y susceptibles *in vivo* e *in vitro* con *Brucella abortus*. Encontraron diferencias en la presencia de estos polimorfismos en las diferentes cruzas que no pudieron ser correlacionadas con el fenotipo *in vivo* evaluado mediante la presencia de anticuerpos. La falta de asociación en la presencia de

polimorfismos en *Nramp1* y el fenotipo de resistencia en bovinos también ha sido reportada (26).

De igual manera, ha sido evaluada la respuesta inmune de bovinos *Bos taurus indicus* ante bacterias y parásitos, buscando asociaciones con el fenotipo de resistencia. Baranwal y Sonwane (27) no encontraron diferencias en la expresión de genes codificantes del Receptor Tipo Toll-2 (TLR-2) (receptor involucrado en el reconocimiento y procesamiento de especies de *Brucella*), comparándola en macrófagos de cebús Tharparkar y cruza de bovinos de origen europeo (Holstein-Friesian x Jersey x Pardo Suizo x Hariana).

El papel de los macrófagos en esta aparente mayor resistencia a enfermedades en los bovinos cebú también ha sido estudiado. Macedo y colaboradores (28) obtuvieron monocitos derivados de células mononucleares de sangre periférica de toros donadores de las razas Nelore (*B. taurus indicus*) y Holstein (*B. taurus taurus*), los cuales diferenciaron a macrófagos e infectaron *in vitro* con un inóculo de *B. abortus*. Encontraron una diferencia estadísticamente significativa en el control de la bacteria por parte de los macrófagos de los bovinos cebú comparado con los de bovinos europeos a las 24 y 48 hrs. Mediante PCR en tiempo real, también comprobaron que los macrófagos de bovinos cebú expresaron niveles mayores de iNOS, TNF- α e IL-12, mientras que los macrófagos de bovinos de origen europeo mostraron una transcripción mayor de genes para IL-4 e IL-10. Interesantemente, no encontraron diferencias en la expresión de *Nramp1*.

Alcaraz-López y colaboradores (29) evaluaron la respuesta a un desafío intranodal con *Mycobacterium bovis* BCG en bovinos Holstein-Friesian y Brahman (vacunados y sin vacunar). En general, los bovinos cebú tuvieron un mejor control de la bacteria, logrando disminuir más el número de UFC/órgano que los Holstein-Friesian. Encontraron un mayor número de bovinos Cebú (5 veces más) que pudieron eliminar el inóculo de *Mycobacterium bovis* BCG comparados con los Holstein, independientemente de la vacunación. Este estudio aportó evidencias de que los bovinos cebú podrían tener un mejor control

de ciertas bacterias intracelulares, en comparación con los bovinos de origen europeo.

Kumar y colaboradores (30) compararon la respuesta humoral y celular en bovinos cebús de la raza Sahiwal contra bovinos Karan Fries (F1 de Holstein-Friesian y Tharparkar) tras un desafío con la cepa vacunal S19 de *Brucella abortus*. No observaron diferencias en la producción de anticuerpos y la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, principalmente IL-6 y TNF- α , fue ligeramente mayor en los bovinos F1. Estos resultados fueron similares a los reportados por Vordermeier (31), quien comparó la producción de citocinas de macrófagos de bovinos Sahiwal y Holstein-Friesian ante la infección *in vitro* con cepas patógenas de *Mycobacterium bovis* y *M. tuberculosis*, encontrando diferencia significativa en la producción de IL-6.

Esto da evidencia de que los bovinos cebú son capaces de responder de forma más eficiente a bacterias intracelulares, montando un perfil proinflamatorio más controlado que los bovinos de origen europeo, lo que sugiere un mejor control de la bacteria, caso contrario a los bovinos europeos, que muestran un perfil de citocinas antiinflamatorias y de reparación, lo que promovería la diseminación del agente mediante mecanismos aún no elucidados.

Dado que no se ha encontrado evidencia concluyente de la eficacia de algunos genes que definan el fenotipo de resistencia en bovinos, cabe la posibilidad de explorar la funcionalidad de nuevos biomarcadores propuestos para este fin. En un trabajo reciente realizado por Alcaraz-López y colaboradores (32), se identificaron genes con expresión diferencial mediante microarreglos de ADN en macrófagos de bovinos previamente fenotipificados como resistentes y susceptibles a *Mycobacterium bovis*. Mediante análisis de curvas ROC propusieron 6 genes como potenciales biomarcadores (IL1RN, HSPA2, VNN, GATM, ARHGEF11 y NAAA), los cuales están involucrados en procesos muy variados, como el metabolismo de lípidos, respuesta a estrés, regulación de la respuesta inflamatoria aguda, entre otros.

Otro aspecto por abordar y que podría estar definiendo la presunta mayor resistencia a patógenos intracelulares en razas cebuinas es la cantidad de células fagocíticas presentes en individuos sanos, aunado a la capacidad bactericida de estas.

Van Wyk y colaboradores (33) realizaron un estudio longitudinal midiendo los parámetros hematológicos de bovinos de la raza Short-Horn, encontrando que los valores de eosinófilos y monocitos fueron considerablemente mayores a los de bovinos de razas europeas. Por otro parte, Macedo y colaboradores (34) evidenciaron mediante citometría de flujo que los bovinos de varias razas cebuinas presentaban una mayor cantidad de leucocitos asociados a la inmunidad innata, principalmente monocitos, esto en comparación con varias razas de ganado europeo.

En el presente trabajo, no se observó alguna tendencia de asociación entre el número de células obtenidas tras el protocolo de extracción de PBMC y el fenotipo obtenido con el ensayo bactericida, lo cual también pudo haberse afectado por las condiciones de manejo de las muestras.

Además, se desarrolló un protocolo de congelación para células mononucleares de sangre periférica. La criopreservación celular se basa en la reducción gradual de temperatura para promover la congelación paulatina del líquido intracelular, evitando así la formación de cristales que puedan llegar a dañar las muestras. Realizado bajo las condiciones y parámetros adecuados, temperaturas menores de -130°C disminuyen significativamente la actividad metabólica de las células, lo que promueve que puedan ser conservadas durante periodos largos sin grandes efectos en el metabolismo y viabilidad, facilitando la generación de biobancos (35,36).

En este trabajo obtuvimos un rendimiento bajo en el biobanco celular generado, desde el momento de la descongelación y hasta su diferenciación a macrófagos, lo que limitó el número de ensayos realizados a 20 individuos (66% de los animales muestreados). Estas deficiencias pueden deberse a diferentes motivos,

como la calidad de los criopreservantes, los materiales empleados, métodos de congelación y la temperatura alcanzada en el proceso y almacenaje (37).

Se ha reportado que condiciones inadecuadas durante el proceso de criogenización ocasionan estrés físico y químico en las células, lo que deriva en una disminución de su viabilidad, así como en alteraciones en sus fenotipos y respuesta a antígenos, debido principalmente a la formación de cristales de hielo tanto dentro como fuera de la célula, cambios osmóticos y toxicidad por criopreservantes (36,38). También se ha visto que tras su descongelación, células como espermatozoides y algunas de origen hematopoyético muestran producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que se ha relacionado con apoptosis por estrés oxidativo, aunque también se ha reportado muerte por necrosis y necroptosis (38–40).

Germann y colaboradores (36) hablan acerca de la falta de información acerca de la influencia de variaciones en la temperatura durante el almacenaje, manipulación y transporte de muestras biológicas criogenizadas, sobre todo aquellas en tanques de nitrógeno líquido sin un sistema protector ante cambios de temperatura, caso similar al sucedido en este trabajo, que requirió del almacenaje y transporte de una gran cantidad de muestras bajo condiciones de altas temperaturas ambientales como las presentes en el trópico mexicano, las cuales rápidamente pueden llegar a influir en la integridad de las muestras obtenidas.

Es por esto que se requiere evaluar diferentes métodos de congelación adaptados a las condiciones del trópico, cuidando la mayor cantidad de variables posibles, sobre todo aquellas involucradas en las fluctuaciones de temperaturas y conservación de la cadena fría de los reactivos utilizados y/o el uso de criopreservantes que minimicen la formación de cristales de hielo, como la D-galactosa (41) o de inhibidores de la apoptosis, como la trehalosa y catalasa (40).

Como se puede observar, la resistencia natural es un fenómeno complejo que comprende aspectos de la inmunidad innata y adquirida, así como de la interacción de diversos genes involucrados directa o indirectamente para la

presentación de este fenotipo, por lo que resulta necesario realizar más estudios en bovinos cebú acerca de la tendencia de mayor resistencia a patógenos intracelulares en estos.

Para lograrlo se podrían realizar estudios similares con poblaciones más grandes (lo cual fue una limitante del proyecto), evaluar las diferencias en el perfil hematológico de la subespecie y asociarlo a la presencia del fenotipo de resistencia natural, así como valorar la efectividad de potenciales biomarcadores de resistencia en bovinos *Bos taurus indicus* en animales con ambos fenotipos.

El conocimiento de los mecanismos reguladores de resistencia no busca eliminar los métodos primordiales de control de enfermedades, como un buen programa de bioseguridad y medicina preventiva, sino agregar herramientas para alcanzar un máximo control de patógenos de interés para la medicina veterinaria y humana (5).

CONCLUSIONES

- El macrófago es un buen marcador fenotípico que permite identificar bovinos *Bos taurus indicus* resistentes a patógenos intracelulares.
- El fenotipo de resistencia se conserva en el individuo independientemente de la patogenicidad de la bacteria utilizada como modelo.
- Se necesita conocer el comportamiento e influencia de nuevos biomarcadores de resistencia en los bovinos cebú.

ANEXO

ANEXO 1: ENSAYO BACTERICIDA CONFIRMATORIO

Para corroborar que el ensayo bactericida es capaz de distinguir entre animales resistentes y susceptibles, independientemente de la bacteria utilizada, se realizó un segundo ensayo, utilizando *Mycobacterium bovis* BCG subcepa Danesa como modelo, la cual fue previamente cuantificada y alicuotada en el LIBT. Se optó por realizar los ensayos con los macrófagos obtenidos de dos animales, uno fenotipificado como resistente y otro como susceptible, siguiendo la metodología descrita en el apartado Material y Métodos, con las siguientes variables:

VARIABLE	<i>B. abortus</i> 2308	<i>M. bovis</i> BCG Danesa
MOI	5:1	10:1
Incubación fagocitosis	30 minutos	4 horas
Retiro de bacterias extracelulares	Gentamicina a 40 µg/ml	5 lavados con cRPMI por pozo
Incubación sobrevida	12 horas	24 horas
Agar utilizado	TSA	7H11
Incubación de placas	48 horas	15-21 días
Punto de corte	70%	65%

REFERENCIAS:

1. Hutt H. Genetic resistance to disease in domestic animals. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates; 1958. 198 p.
2. Skamene E. Genetic Regulation of Host Resistance to Bacterial Infection. *Rev Infect Dis.* 1983;5(October):823–32.
3. Adams LG, Templeton JW. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *OIE Rev Sci Tech.* 1998;17(1):200–19.
4. Roberts E, Card LE. The Inheritance of Resistance to Bacillary White Diarrhea. *Poult Sci.* 1926;6(1):18–23.
5. Garry Adams L, J. Schutta C. Natural Resistance Against Brucellosis: A Review. *Open Vet Sci J.* 2014;4(1):61–71.
6. Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *Biomed Res Int.* 2013;2013(1):1–11.
7. Hooda V, Yadav CL, Chaudhri SS, Rajpurohit BS. Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *J Helminthol.* 1999;73(2):137–42.
8. Goto Y, Buschman E SE. Regulation of host resistance to *Mycobacterium intracellulare* in vivo and in vitro by the Bcg gene. *Immunogenetics.* 1989;30(3):218–21.
9. Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, et al. The ity/lsh/bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the nramp1 gene. *J Exp Med.* 1995;182(3):655–66.
10. Pan H, Yan BS, Rojas M, Shebzukhov Y V., Zhou H, Kobzik L, et al. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature.* 2005;434(7034):767–72.
11. Price RE, Templeton JW, Iii RS, Adams LG. Ability of Mononuclear Phagocytes from Cattle Naturally Resistant or Susceptible to Brucellosis To Control In Vitro Intracellular Survival of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 1990;58(4):879–86.
12. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella*

- abortus*. Vet Immunol Immunopathol. 1996;50(1–2):55–65.
13. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008;8(12):958–69.
 14. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature. 2013;496(7446):445–55.
 15. Hussen J, Schuberth HJ. Heterogeneity of bovine peripheral blood monocytes. Front Immunol. 2017;8(2017):1–9.
 16. Gutiérrez-pabello JA, Adams LG. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares Survival of *Mycobacterium bovis* in macrophages from cattle naturally resistant and susceptible to intracellular pathogens. Vet. Mex. 2003;34(3):277–81.
 17. Esquivel-Solís H, Vallecillo AJ, Benítez-Guzmán A, Adams LG, López-Vidal Y, Gutiérrez-Pabello JA. Nitric Oxide Not Apoptosis Mediates Differential Killing of *Mycobacterium bovis* in Bovine Macrophages. PLoS One. 2013;8(5):1–10.
 18. U. Castillo-Velázquez, R. Gomez-Flores, R. Tamez-Guerra, P. Tamez-Guerra CR-P. Differential responses of macrophages from bovines naturally resistant or susceptible to *Mycobacterium bovis* after classical and alternative activation. Vet Immunol Immunopathol. 2013;154(2013):8–16.
 19. Hansen PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. Anim Reprod Sci. 2004;82–83:349–60.
 20. Bock RE, Kingston TG, De Vos AJ. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 1999;77(7):461–4.
 21. Bakheit MA, Latif AA. The innate resistance of Kenana cattle to tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Sudan. Ann N Y Acad Sci. 2002;969(1):159–63.
 22. Mittal M, Sharma V, Nehra K, Chakravarti S, Kundu K, Bansal VK, et al. Abortions in an organized dairy farm from North India reveal the possibility of breed susceptibility to Bovine Brucellosis. 2018; 5 (2019) 1–5.
 23. Vordermeier M, Ameni G, Berg S, Bishop R, Robertson BD, Aseffa A, et al. The influence of cattle breed on susceptibility to bovine tuberculosis in Ethiopia. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2012;35(3):227–32.

24. Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;34(3–4):291–305.
25. Martinez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobón J, Gallego J, et al. Bovine SLC11A1 3' UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *J Anim Breed Genet.* 2008;125(4):271–9.
26. Kumar N, Mitra A, Ganguly I, Singh R, Deb SM, Srivastava SK, et al. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)13 microsatellite allele at 3'UTR of NRAMP1 gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* x *Bos taurus*) cattle. *Vet Microbiol.* 2005;111(1–2):139–43.
27. Baranwal A, Sonwane A, Chauhan A, Panigrahi M, Sharma AK. Quantification and comparison of TLR2 activity in monocyte-derived macrophages of zebu and crossbred cattle. *Iran J Vet Res.* 2018;19(4):283–9.
28. Macedo AA, Costa EA, Silva APC, Paixão TA, Santos RL. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*). *Vet Immunol Immunopathol.* 2013 Feb 15;151(3–4):294–302.
29. Alcaraz-López OA, Flores-Villalva S, Cortéz-Hernández O, Viguera-Meneses G, Carrisoza-Urbina J, Benítez-Guzmán A, et al. Association of immune responses of Zebu and Holstein-Friesian cattle and resistance to mycobacteria in a BCG challenge model. *Transbound Emerg Dis.* 2020;00(May):1–6.
30. Kumar DR, Sivalingam J, Mishra SK, Kumar A, Vineeth MR, Chaudhuri P, et al. Differential expression of cytokines in PBMC of *Bos indicus* and *Bos taurus* x *Bos indicus* cattle due to *Brucella abortus* S19 antigen. *Anim Biotechnol.* 2020;31(2):148–54.
31. Vordermeier M, Ameni G, Glass EJ. Cytokine responses of Holstein and Sahiwal zebu derived monocytes after mycobacterial infection. *Trop Anim Health Prod.* 2012;44(3):651–5.
32. Alcaraz-López OA, Villarreal-Morales Y, Rangel-Escareño C, Gutiérrez-Pabello JA. Assessment of candidate biomarkers to detect resistance to

- Mycobacterium bovis* in Holstein-Friesian cattle. Res Vet Sci. 2020;132(May):416–25.
33. van Wyk IC, Goddard A, de BM, Coetzer JAW, Booth C, Hanotte O, et al. Hematological profile of East African short-horn zebu calves from birth to 51 weeks of age. Comp Clin Path. 2013;22(5):1029–36.
 34. Macêdo AA, Marciano APV, Rocha LM, Alves-Júnior JRF, Faria AMC, Bittar JFF, et al. Comparative phenotypic profile of subpopulations of peripheral blood leukocytes in European (*Bos taurus taurus*) and Zebu cattle (*Bos taurus indicus*). Genet Mol Res. 2013;12(4):6838–49.
 35. Nazarpour R, Zabihi E, Alijanpour E, Abedian Z, Mehdizadeh H, Rahimi F. Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. Int J Mol Cell Med. 2012;1(2):88–93.
 36. Germann A, Oh YJ, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. Cryobiology . 2013;67(2):193–200.
 37. Miyamoto Y, Ikeuchi M, Noguchi H, Hayashi S. Long-term Cryopreservation of Human and other Mammalian Cells at –80 °C for 8 Years. Cell Med. 2018;10:215517901773314.
 38. Savitskaya MA, Onishchenko GE. Apoptosis in cryopreserved eukaryotic cells. Biochem. 2016;81(5):445–52.
 39. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Mol Reprod Dev. 2001;59(4):451–8.
 40. Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. Prevention of apoptosis as a possible mechanism behind improved cryoprotection of hematopoietic cells by catalase and trehalose. Transplantation. 2005;80(9):1251–60.
 41. Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, Leclre M, Tam RY, Capicciotti CJ, et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. Glycobiology. 2012;22(1):123–33.