

27
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION "IN VITRO" DE LA ACTIVIDAD DE LAS CELULAS FAGOCITICAS DEL APENDICE DEL CONEJO CONTRA: Staphylococcus aureus y Candida albicans

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ROMAN HERNANDEZ MEZA



ASESORES: MVZ: MIGUEL ANGEL MARTINEZ CASTILLO
DR.: JESUS CASASOLA FLORES
MVZ: JAIME ALONSO NAVARRO HERNANDEZ



MEXICO, D.F.

1998

I

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

258961



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

Con todo respeto y admiración dedico este trabajo a mis padres que me ofrecieron su apoyo incondicional durante mis estudios.

A mis hermanos con los que he compartido los mejores momentos de mi vida.

A todos mis amigos de hoy y siempre por estar a mi lado en los buenos y malos momentos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincera gratitud al Dr: Jesús Casasola Flores y demás adscritos al laboratorio de Virología, por proporcionarme todo el material necesario para la elaboración de esta tesis.

Quiero extender mi gratitud al personal del Laboratorio Microbiología Intestinal del Hospital Infantil de México por su colaboración.

Deseo dar gracias a mis asesores por sus finas atenciones.

A mi honorable jurado, por sus valiosas correcciones y aportaciones.

A las Químicas: María de la Luz Ramírez Aguilar, Olga Nava y Catalina Alba por su valiosa ayuda, paciencia y tiempo que me brindaron.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	17
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	26
LITERATURA CITADA.....	30
FIGURAS.....	35
CUADROS.....	46

RESUMEN

Hernández Meza Román. Evaluación "in vitro" de la actividad de las células fagocíticas del apéndice del conejo contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albican* (Bajo la dirección de: MVZ: Miguel Angel Martínez Castillo, Dr: Jesús Casasola Flores y MVZ: Jaime Alonso Navarro Hernández).

La información publicada hasta la fecha no aporta una explicación satisfactoria de la función inmunológica del tejido linfoide del apéndice del conejo; ante esta condición se evaluó la actividad fagocítica de los neutrófilos del apéndice del conejos raza Nueva Zelanda blanca. Las células fueron expuestas ante dos agentes infecciosos conocidos: *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* en una relación de 3:1 (3×10^6 de antígenos por 1×10^6 de células). El tiempo de exposición fue de 90 minutos a una temperatura de 37°C. La actividad fagocítica de las células del apéndice del conejo se comparó contra la de los macrófagos alveolares de rata (cepa Sprague Dawley); éstos últimos también fueron expuestos con los mismos microorganismos y bajo las mismas condiciones experimentales. Los resultados indicaron que los neutrófilos obtenidos del conejo fueron más activos (20.68 %) fagocitando a *Candida albicans*, seguido de los macrófagos de rata sobre *Staphylococcus aureus* (10.03 %), posteriormente los macrófagos de rata sobre *Candida albicans* (5.01 %) y la mínima capacidad fagocítica fue la de los neutrófilos de conejo sobre *Staphylococcus aureus* (0.38 %) respectivamente ($p < 0.01$). En conclusión se observó que la actividad fagocítica de las células del apéndice del conejo es superior contra *Candida albicans* que contra *Staphylococcus aureus* y que las células del apéndice conejo influyen en el control de microorganismo entéricos.

INTRODUCCION

El conejo de laboratorio (*Oryctolagus cuniculus*) es un animal frecuentemente reproducido en los bioterios y comúnmente utilizado en la experimentación (1). A pesar de ser un mamífero, presenta características biológicas particulares compartidas, únicamente con los demás lagomorfos. Algunas de estas características son las siguientes: posee un par accesorio de incisivos que constituye la base taxonómica para diferenciarlo de los roedores; en su estómago prevalece un pH sumamente bajo (1.5 en promedio en adultos); secreta principalmente biliverdina, practica la cecotrofia, etc; sin embargo, aún hay muchos aspectos relativos a su biología que son parcial o totalmente desconocidos (2,3). En su tracto digestivo, el conejo manifiesta también particularidades histofisiológicas importantes: en la porción terminal del íleon presenta un acúmulo de tejido linfoide denominado *Sacculus rotundus*, mismo que otros autores consideran el equivalente a la Bolsa de Fabrico propia de las aves, por lo tanto es considerado el responsable indirecto de las respuestas inmunitarias humorales (1,3). El apéndice cecal es una estructura en forma de fondo de saco (figura 1), ubicado en la parte distal del ciego (4,5,6) que presenta también características interesantes: secreta fluidos alcalinos ricos en iones bicarbonato y su propósito es amortiguar el pH del contenido cecal ya que su tendencia es siempre hacia la acidez, debido a la elevada producción de ácidos grasos volátiles. Esta función amortiguadora se hace evidente al comprobar el agrandamiento del apéndice cuando el alimento posee poca fibra pero alta proporción de carbohidratos fermentables (3). También se ha comprobado que el apéndice es un órgano linfoide pues se ha observado que sufre hipertrofia cuando la fermentación en el ciego es incorrecta y

lenta, lo que permite la proliferación bacteriana y consecuentemente un incremento de toxinas bacterianas en forma local. Aunado a esto, se ha observado que la apendicectomía reduce significativamente la concentración de Vitamina B₁₂ en el contenido cecal, por lo que se infiere que el apéndice también tiene alguna influencia sobre el proceso de fermentación microbiana (3). En las razas medianas de conejos adultos el apéndice mide de 8-12 cm de longitud y de 0.9-1.2 cm de diámetro (7); esta irrigado por ramas de las arterias mesentéricas (8) e innervado por el sistema nervioso autónomo a través del plexo submucoso (9).

Histológicamente su mucosa tiene un epitelio cilíndrico, cuyas células manifiestan núcleos ovoidales, numerosas mitocondrias, un aparato de Golgi bien desarrollado y glándulas de Lieberkühn de forma irregular y longitud variable; carece de microvellosidades, criptas y glándulas de Paneth. La submucosa está formada por una capa gruesa que contiene en su interior vasos sanguíneos, nervios y abundante tejido linfoide. El plano muscular está formado por dos capas: una longitudinal y otra circular pobremente desarrolladas. La serosa está constituida por un epitelio escamoso simple y es sostenida por una capa fina de tejido conectivo; en su conjunto forman una cubierta suave que reduce la fricción con otros órganos (6,10,11,12,13).

Debido que la tesis se restringe esencialmente al estudio del sistema inmunológico del apéndice del conejo, es conveniente describirlo brevemente.

Sistema inmunológico del apéndice del conejo

Placas de Peyer

Son agregados de folículos linfoides localizados en la superficie luminal del epitelio intestinal (aparentemente equivale a la bolsa de Fabricio en aves); juegan un papel muy importante en el control local de microorganismos patógenos; se encuentran distribuidas en todo el intestino grueso, siendo más frecuentes en zonas como son : la unión ileocecólica (denominada en conejos *Sacculus rotundus*), al igual que el ciego (14), apéndice y recto. Las placas de Peyer están formadas por neutrófilos, macrófagos, células M y linfocitos (14,15,16).

Células M

Las células M están situadas en la superficie luminal del epitelio intestinal; fijan microorganismos en la zona apical de su membrana gracias a receptores específicos formados por: glucoproteínas, glucolípidos, fosfolípidos y colesterol. El microorganismo va a sufrir lentamente una endocitosis hasta llegar al citoplasma celular e inmediatamente es rodeado por filamentos de proteína (el sistema túbulocisterna) que lo inmoviliza, hasta la llegada de una vesícula que lo ingiere; después es transportado dentro el citoplasma hasta la parte basal de la membrana celular para ser presentado a los neutrófilos, macrófagos y linfocitos (17,18.19).

Algunas características que poseen las células M para diferenciarlas de los enterocitos son las siguientes: tienen microvellosidades en forma de borde de cepillo, poseen un aparato de Golgi grande que rodea al núcleo; en la superficie de la membrana presenta invaginaciones; en el citoplasma hay muchos filamentos de proteínas y mitocondrias para ser presentados a los fagocitos y linfocitos (17,18,19).

Inmunoglobulina A .

La IgA, tiene un papel fundamental en la defensa del conejo. Tiene forma de "Y" con un peso molecular de 160,000 Daltons; se caracteriza por tener en su región Fc muchos puentes de disulfuro que le da su resistencia a la digestión; puede activar el complemento por la vía alterna, pero su forma más importante de actuar consiste en evitar la adherencia de bacterias, virus y demás microorganismos infecciosos en la superficie intestinal (14,15,20).

Se encuentra en concentraciones elevadas en secreciones nasales, traqueales, vías urogenitales, intestestino grueso, lágrimas, saliva leche, calostro y orina (38).

Después que es sintetizada por las células plasmáticas de la mucosa intestinal, se une a un receptor situado en la superficie de la membrana celular epitelial para formar el complejo IgA; el receptor es una proteína que transporta la IgA a través del interior de la célula epitelial hasta que la vesícula se fusiona a la membrana y expone la IgA al lumen intestinal. Posteriormente los receptores son fraccionados por la enzima proteasa para liberar el complejo IgA secretorio, éste componente le da su resistencia a la digestión. (14,15).

El otro sitio donde es sintetizado el complejo IgA secretorio en los conejos es el hígado (los hepatócitos) y después es transportado a la vesícula biliar. Por éste motivo la bilis es muy rica en IgA. (38).

Stramignoni publicó en 1968 un estudio relativo al desarrollo progresivo del tejido linfoide del apéndice del conejo (21), como fuente de conocimiento que complementa la información hasta ahora disponible, sin embargo a la fecha aún se desconoce mucho del funcionamiento inmunológico específico del tejido (cuadro I).

Puesto que por medio de la fagocitosis se evaluó la actividad de las células fagocíticas del apéndice contra: *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, a continuación se describe el proceso brevemente:

FAGOCITOSIS

La fagocitosis es un proceso inmunológico mediante el cual células específicas eliminan partículas extrañas (microorganismos) por medio de la ingestión (figura 2). Para su estudio se divide en las siguientes etapas:

a) Quimiotaxis: es un movimiento orientado de las células fagocíticas bajo la influencia de sustancias químicas como son: los productos bacterianos, factores liberados por células lesionadas, leucotrienos, el péptido C5a del complemento, factores derivados de las células cebadas y metabolitos del ácido araquidónico (14,15).

b) Adherencia: es la fijación de un microorganismo por receptores específicos de membrana celular. Para que exista una unión, la carga negativa (potencial Z) de las partículas es neutralizada por la proteína positiva C3 del complemento. Otro factor asociado a la adherencia es la fracción Fc de la inmunoglobulina G (14,15).

c) Ingestión: posteriormente la membrana va sufrir un plegamiento local hacia dentro, consecuencia de la contracción de filamentos de miosina y actina. El microorganismo es captado en el citoplasma y es encerrado en una vacuola llamado fagosoma (14,15) .

d) Digestión: los gránulos enzimáticos se fusionan con la membrana del fagosoma para formar el complejo fagolisosoma. A continuación los gránulos se rompen liberando sus enzimas en el interior la vacuola para la digestión de la partícula.

También es de gran importancia el mecanismo bactericida denominado metabolismo oxidativo (cuadro 2), que a continuación se describe: cuando una partícula se fija en la superficie de un neutrófilo, la enzima NADPH oxidasa situada en la superficie celular, cataliza la conversión de fosfato de dehidronicotinamida adenin dinucleótido (NADPH) a fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido (NADP); cuando ésto sucede se forma una molécula de hidrógeno y otra de oxígeno. La molécula de oxígeno se combina con otra igual para formar un anión superóxido O_2^- , este compuesto reacciona con la enzima superóxido dismutasa produciendo un ion hidrógeno que se combina con otro (liberado anteriormente), para formar el peróxido de hidrógeno, mismo que es bactericida; posteriormente éste reacciona con la enzima mieloperoxidasa produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un ion de hipoclorito (OCl^-). Los iones hipocloritos matan a las bacterias oxidando sus proteínas y aumentando la actividad de las enzimas lisosomales. Posteriormente se presenta la reacción del ión superóxido con el peróxido de hidrógeno para generar un radical hidroxilo y oxígeno singuleto; mismos que reaccionan con los lípidos originando hidroxiperóxidos, que son bactericidas (14,15,16).

Otro mecanismo que ayuda a promover el contacto entre las partículas y los neutrófilos es el atrapamiento: si una partícula se aloja en los tejidos, puede ser atrapada entre el neutrófilo y la otra superficie, evitando de esta manera que se escape (14,15).

Características morfológicas de las Células Fagocíticas

Los neutrófilos son células redondas, miden 12 μm de diámetro, tienen un citoplasma con gránulos finos, un núcleo segmentado, algunas mitocondrias, un pequeño aparato de Golgi, no tiene lisosomas ni retículo endoplásmico rugoso (figura 3).

Los neutrófilos se consideran la primera línea de defensa que se mueve con rapidez hacia las sustancias extrañas para destruirlas, pero son incapaces de desarrollar esfuerzos sostenidos. Los gránulos primarios contienen: mieloperoxidasa, lisozimas, proteasas neutras, elastasas, hidrolasas ácidas, B-glucoronidasa y la catepsina B. Los gránulos secundarios contienen: lisozimas, colagenasa y la lactoferrina capaz de unirse al hierro (14,15).

Los monocitos contienen un núcleo en forma de frijol, mitocondrias, un aparato de Golgi, muchos lisosomas y algo de retículo endoplásmico rugoso; al llegar a los tejidos los monocitos se transforman en macrófagos.

Los macrófagos realizan un proceso de fagocitosis muy similar a los neutrófilos; los macrófagos son atraídos por productos microbianos y células lesionadas (en especial por neutrófilos); el metabolismo oxidativo que presentan es menos intenso que el de los neutrófilos; carecen de la enzima mieloperoxidasa, pero tienen una catalasa con función equivalente (Figura 3).

Los macrófagos alveolares tienen un mecanismo oxidativo más activo, carecen de retículo endoplásmico rugoso, tienen gránulos y se fusionan para formar células gigantes. Los macrófagos son capaces de llevar a cabo una actividad fagocítica sostenida ante un microorganismo y contribuyen en la reparación de daño tisular al mover los tejidos lesionados (14,15).

Los eosinófilos son los menos eficientes en la fagocitosis; tienen gránulos de gran tamaño, contienen una proteína básica rica en arginina, una peroxidasa, una lisofosfolipasa y una proteína catiónica. Todas estas enzimas son capaces de matar larvas de helmintos; son activadas por productos de linfocitos T que aumentan su capacidad para destruir parásitos invasores.

Los basófilos representan el 5% de los leucocitos; actúan provocando inflamación aguda en el sitio donde se depositan los microorganismos por acción de la histamina y serotina.

Además de intervenir los macrófagos en la fagocitosis, participan en otras funciones; a continuación se describirán éstas:

Funciones de los macrófagos

- a) Inflamación y fiebre: interleucina-1, prostoglandinas, componentes del complemento y metabolitos de oxígeno.
- b) Destrucción bacteriana: metabolitos de oxígeno y proteasas.
- c) Activación de linfocitos: proteasas y estimulación de fibroblastos.
- d) Destrucción de tumores: proteasas, metabolismo de oxígeno y el factor de necrosis tumoral (TNF).
- e) Cicatrización tisular: proteasas y estimulación fibroblastos.

Características de los microorganismos empleados para el experimento de fagocitosis

Staphylococcus aureus, Es un agente bacteriano en forma esférica, Gram (+), anaerobio, mide de 0.8-1.0 μm de diámetro, sus colonias son voluminosas y su color puede oscilar entre amarillo y dorado debido a la producción de carotenos (22). Es capaz de causar infección en cualquier sitio del organismo, es un habitante normal de la piel y aparato respiratorio (23,24). Se comporta como agente oportunista en individuos inmunodeprimidos. Puede combinarse en infecciones virales como la influenza o ser causa de infecciones traumáticas, quirúrgicas y de la piel e invadir cualquier tejido provocando osteomielitis, septicemia, enterocolitis e intoxicación con alimentos mediante sus enterotoxinas (23,24). La bacteremia forma abscesos en órganos como piel, tejido subcutáneo, riñón y cerebro (22,25).

Candida albicans. Es una levadura Gram (+), mide $2 \times 3 \mu$ a $8.5 \times 14 \mu$; en agar sabouraud incubado a 37°C se desarrollan colonias blancas con olor a levadura. Su pared es gruesa, funciona protegiendo y almacenando nutrientes. Se caracteriza por tener pseudohifas, blastósporas y clamidiosporas terminales (figura 4), éstas últimas crecen al final de las hifas (26,27), y son el rasgo más distintivo para identificar a la *Candida albicans* de las demás especies (cuadro 4). Es un habitante normal de la mucosa intestinal del conejo (cuadro 5). Algunas veces produce enfermedades en individuos inmunodeprimidos, especialmente si hay

trastornos en la inmunidad celular (26,27,28), siendo altamente patógena para el conejo (28). La inyección intravenosa en conejos provoca abscesos diseminados particularmente en riñón pero puede producir endocarditis o tromboflebitis. En otras especies (perros, becerros y potros), es común observar estomatitis y enteritis con placas blanquecinas (27). En vacas y yeguas puede ser causa de mastitis; mientras que en toros sementales se puede observar candidiasis genital (29,30). Se han reportado factores de predisposición como son: los corticosteroides, antibióticos (tetraciclinas), hiperglucemia (diabetes) y tratamiento prolongado con quimioterapia. En niños lactantes produce una infección de la cavidad bucal llamada algodoncillo (27).

Para facilitar la actividad fagocítica en la naturaleza, se suscita un proceso llamado opsonización, el cual consiste en la unión de un microorganismos con una o más opsoninas (IgG o proteínas del complemento como es la C3b), esto hace que las células fagocíticas portadoras con este receptor, respondan mejor a la presencia de microorganismos.

Otro manera de aumentar la actividad fagocítica consiste en la digestión incompleta de microorganismos, los cuales se fijan a la superficie de los macrófagos logrando así una respuesta muy alta para reconocer, aprisionar y destruir sustancias extrañas. Cabe mencionar que el suero de cobayo contiene valores altos de complemento con propiedades líticas muy eficientes por lo que es considerado el segundo mejor después del suero del hombre (14,15).

En estudios hechos con niños, por Chandra, Rosen y Seth (31,32,33), observaron que la desnutrición disminuye actividades inmunológicas como son: la adherencia, la actividad opsónica, el número de proteínas precursoras en la síntesis de enzima lisosomales, el número de anticuerpos, la actividad del complemento, los factores del suero, el mecanismo de división y maduración celular de los fagocitos; aumentando así la susceptibilidad a infecciones por diferentes agentes infecciosos (31,32,33).

JUSTIFICACION

La información publicada hasta la fecha no da una explicación satisfactoria del papel que juega el tejido linfoide del apéndice del conejo; es aquí donde encuentra su justificación el presente estudio, pues tratando de dilucidar en parte el comportamiento inmune del tejido linfoide del apéndice, se expondrá " in vitro" a la acción de dos microorganismos conocidos para evaluar parcialmente su capacidad fagocítica.

OBJETIVO

- 1.- Evaluar la actividad de las células fagocíticas del apéndice del conejo ante: *Candida albicans*.
- 2.- Evaluar la actividad de las células fagocíticas del apéndice del conejo ante el agente no entérico: *Staphylococcus aureus*.

HIPOTESIS

La actividad fagocítica de las células del apéndice del conejo es superior contra *Candida albicans* que contra *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo posee carácter prospectivo, transversal, comparativo y experimental (34,35). Fue realizado en el Laboratorio de Virología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Para obtener las células que participaran en el experimento, se extrajeron neutrófilos del apéndice del conejo y macrófagos alveolares de rata.

Apendicectomía del conejo

Fueron anestesiados 3 conejos de la raza Nueva Zelanda, variedad blanca de 6 ± 0.5 meses de edad, con un peso corporal de 4.0-4.5 kg, usando como anestésico hidrocloreto de ketamina (Imalgen) en una dosis de 22mg/kg via I.V. Cada conejo fue inmovilizado en una tabla quirúrgica en posición decúbito dorsal; la región abdominal fue rasurada y lavada para aplicarle una solución antiséptica de Iodo al 3%.

De acuerdo con la técnica de Alexander (36), fue realizada una incisión a nivel de la cicatriz umbilical, prolongándola 10 cm hacia la región caudal, abarcando los planos de la piel y subcutáneo; al llegar al plano muscular, la línea media fue abierta exponiendo el apéndice; a continuación fue interrumpida la circulación local ligando la arteria mesentérica con catgut 3 ceros; posteriormente fue colocada una pinza de Kelly transversal al sitio donde inicia el apéndice y fue realizado un corte para extraer el órgano, éste fue colocado en un vaso de precipitado con 25ml Solución Salina

Isotónica fría (S.S.I.). Con una gasa fueron humedecidos los bordes del intestino y retiradas las heces. Fueron suturados los bordes del intestino con punto continuo anclado y encima de éste un refuerzo con Cushing usando sutura Catgut 3-0. A continuación fue retirada la pinza para verificar la existencia de fugas y el órgano fue introducido en la cavidad abdominal. Los planos peritoneal y muscular fueron suturados simultáneamente con puntos separados usando Catgut 2-0. El plano subcutáneo fue suturado con puntos continuos usando Catgut 3-0 y finalmente piel con puntos separados usando nylon 2-0.

Técnica de extracción de células del apéndice

El apéndice fue colocado en un vaso de precipitado con 20ml de Solución Salina Isotónica estéril fría al 0.9% (S.S.I.), a continuación fue abierto por el rafé para retirarle las excretas y fue colocado en una caja de petri con 15ml S.S.I. más 2ml de Penicilina-Estreptomicina en una concentración final de 100 UI/ml-5 μ g/ml y Anfotericina-B a una concentración final de 5 μ g/ml. El tejido fraccionado en pequeños trozos fue depositado en un homogenizador para macerarlo; la suspensión celular fue dejada reposar 5 minutos para precipitar los trozos más grandes de tejido y fue colocada en tubos cónicos estériles para centrifugarlos a 3000 r.p.m. durante 10 minutos; el sobrenadante fue eliminado, y al paquete celular le fue agregado 0.8 ml de solución lítica para romper los eritrocitos (cuadro 7) y fue incubado durante 3 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas 2 veces más con S.S.I. Inmediatamente fue determinado el número de células, de la

siguiente manera: 800 μ l de solución de Hank (cuadro 5), 100 μ l de células y 100 μ l de azul tripano; fueron colocados 10 μ l en una cámara de Neubaer y el total de las células de los cuadrantes fue multiplicado por 10,000. Las células fueron sembradas en 3 botellas Roux con 70 ml de medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal de ternero más 1 ml de antibiótico y 1ml de antimicótico (antes mencionados), fueron incubadas por 72 horas a 37°C; cada 24 horas fue revisado al microscopio la existencia de contaminación. Las células fueron "cosechadas" de la siguiente manera: fueron lavadas en tres ocasiones en tubos cónicos a 3000 r.p.m durante 15 minutos con solución Hank y resuspendidas al final con el mismo medio celular. Las células fueron alicuotadas en criotubos a una concentración de 1×10^6 /1ml más 100 μ l de dimetil sulfóxido (conservador celular) y fueron almacenadas en congelación a -80°C.

Con el propósito de contar con un tejido de referencia a través del cual se pudiera comparar la actividad fagocítica de las células del apéndice del conejo, se obtuvieron macrófagos alveolares de ratas, de la cepa Sprague Dawley.

Técnica de extracción de macrófagos alveolares de rata

Fueron sometidas a eutanasia 3 ratas de la cepa Sprague Dawley de 14-16 semanas de edad mediante la inhalación de éter, con peso corporal entre 280-300 g y de sexo macho. El animal fue fijado a una tabla quirúrgica, a cual se procedió a realizar un corte longitudinal en la parte ventral de cuello, en dirección caudal hasta el diafragma retirando músculos y

costillas. La tráquea y los pulmones fueron colocados en una caja de petri con Solución Salina Isotónica estéril al 0.9% de NaCl (S.S.I) respectivamente, y fueron lavados 4 veces para eliminar la sangre, más dos lavados con Penicilina-Estreptomomicina en una concentración final de 100 UI/ml-5 µg/ml y Anfotericina-B en una concentración final de 5 µg/ml. Con seda 3 ceros fue cerrada la luz de la tráquea en la parte distal del pulmón y fue inyectado por vía intratraqueal 20 ml de S.S.I fría, a continuación fueron realizados cortes a los pulmones. La suspensión obtenida fue colocada en tubos cónicos de 50 ml para centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos, posteriormente fue agregado al paquete celular 0.8 ml de solución lítica y fueron lavadas dos veces más con S.S.I.

Técnica de aislamiento de Candida albicans a partir del apéndice

Para verificar la existencia de la Candida albicans en el apéndice del conejo, se aisló este agente con la siguiente técnica:

Después de extraer el apéndice, este fue macerado, obteniéndose un sobrenadante a partir del cual se realizaron las siguientes diluciones: 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000. De cada dilución fueron sembradas 100µl en medio Sabouraud en placa e incubados 48 horas a 37°C. Posteriormente fue realizada una dilución de 1:1000 con los hongos crecidos para elaborar la prueba de Auxónograma y zimograma por medio de un Kit comercial * (cuadro 4), fue incubado 24 horas y al final fue tomada la lectura correspondiente para la identificación de Candida albicans.

* Laboratorio: Biomerieux. * Producto comercial: API-STATH

Prueba de Tubo Germinal

Esta prueba alternativa fue empleada para la identificación de *Candida albicans*; consiste en suspender levaduras en suero de humano (también es usado el suero de vaca) y dejarlas incubar 2 a 4 horas a 37°C. La formación de filamentos de aspecto de haba (tubos germinales) da un resultado positivo (figura 4). Existen otras variedades de *Candida* que puede dar “falsos positivos” como es el caso de la *Candida stellatoidea* (37).

Técnica de fagocitosis

Técnica de cuenta de microorganismos infecciosos

Fueron sembrados *Candida albicans* (ATCC-10231) y *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) en forma independiente en botellas para cultivo celular con 15ml de medio infusión cerebro-corazón líquido (B.H.I) e incubadas durante 24 horas a 37°C (cuadro 7). Posteriormente fueron realizadas las siguientes diluciones: 1:10, 1:100 y 1:1000; determinando la absorbancia de cada dilución (incluyendo un control sin antígenos), fue usado un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nanómetros. Cada dilución fue sembrada por duplicado; la *Candida albicans* fue sembrada con medio sabouraud en placa (cuadro 7) y en caso de *Staphylococcus aureus* medio B.H.I en placa (cuadro 8), y siendo incubados durante 24 horas a 37°C. Posteriormente fue determinado el número de colonias desarrolladas de cada dilución (que es proporcional al

número de bacterias u hongos) y el promedio fue multiplicado por 10,000. La dilución y la absorbancia elegida correspondió a 3×10^6 , ésta también fue usada para los demás experimentos.

Técnica de opsonización

Cada microorganismo fue sometido al proceso de opsonización con la siguiente fórmula: $100 \mu\text{l}$ de microorganismos (3×10^6), $200 \mu\text{l}$ de suero de cobayo y $800 \mu\text{l}$ de solución Hank, incubándolo durante 30 minutos a 37°C y agitando cada 5 minutos.

Cuenta de células

El número de células fue determinado con la siguiente fórmula: $800 \mu\text{l}$ de solución Hank, $100 \mu\text{l}$ de suspensión celular y $100 \mu\text{l}$ de azul tripano al 3% en solución de NaCl al 0.85%. Después de homogeneizar la mezcla fueron depositados $10 \mu\text{l}$ en una cámara de Neubaer; el número de células de cada cuadrante fue contado y el total fue multiplicado por 10,000.

Las células linfoides fueron expuestas con los microorganismos en una relación de 3:1 ($3 \times 10^6/1\text{ml}$ de antígeno por $1 \times 10^6/1\text{ml}$ de células fagocíticas).

Ensayo experimental

Tratamiento Experimento α)

1. (Testigo): 160 μ l de *Staphylococcus aureus* + 160 μ l de solución Hank.
2. 160 μ l de *Saphylococcus aureus*+160 μ l de neutrófilos apéndice o macrófagos alveolares.
3. (Testigo): 160 μ l de neutrófilos o macrófagos +160 μ l de solución Hank.

Tratamiento Experimento β)

1. (Testigo): 160 μ l de *Candida albicans* + 160 μ l de solución Hank.
2. 160 μ l de *Candida albicans* + 160 μ l de neutrófilos o macrófago alveolares.
3. (Testigo): 160 μ l de neutrófilos de apéndice + 160 μ l de solución Hank.

Tratamiento 1: Cuenta con un control con microorganismos diluidos en solución Hanks; fue representado por duplicado.

Tratamiento 2: Cuenta con los microorganismos que se expusieron a las células linfoides para evaluar su actividad fagocítica; fue representado por cuadruplicado.

Tratamiento 3: Cuenta con un control con células diluidas con solución Hank; fue representado por duplicado.

A partir de cada experimento se realizó una dilución 1:1000 y posteriormente a partir de esta fue realizada una dilución 1:10,000, usando para ambas agua bidestilada estéril. De la última dilución fueron sembrados 100 μ l en todos los tratamientos. *Candida albicans* fue sembrada en medio sabouraud y el *Staphylococcus aureus* en medio B.H.I. (tiempo 0').

Con el sobrante del experimento fueron incubados 90 minutos a 37°C (tiempo de fagocitosis), posteriormente se retiró de la incubadora y se le agregó a la *Candida albicans* 10µl de Anfotericina-B en una concentración final de 5µg/ml y en caso de *Staphylococcus aureus* 10 µl de Gentamicina a una concentración final de 5µg/ml y fueron incubados 30 minutos a 37°C. Las células fueron 2 veces lavadas con solución de Hank a 3000 r.p.m durante 15 minutos y posteriormente fueron realizadas las mismas diluciones y sembradas en placas de agar 24 horas a 37°C. Fue determinado el número de colonias crecidas antes y después de la fagocitosis (cuadro 9).

Para tener un mayor margen de seguridad cada experimento fue realizado 3 veces, determinando a su vez el número de colonias crecidas antes y después de la fagocitosis.

RESULTADOS

La prueba de comparación entre proporciones de microorganismos fagocitados por neutrófilos del apéndice del conejo y macrófagos alveolares de rata resultó estadísticamente significativa $\chi_i^2 = 150.68$, ($\alpha = 0.01, 3 \text{ g.l.}$), lo cual indicó diferencias en la actividad fagocítica de las distintas células sobre los microorganismos a los que se expusieron (cuadro 10).

De un total de 772 bacterias de *Staphylococcus aureus* fueron fagocitados 3 por los neutrófilos del apéndice del conejo, mientras que de un total de 353 hongos de *Candida albicans* fueron fagocitados 73 por los neutrófilos del apéndice del conejo (Cuadro 10).

De un total de 3350 bacterias de *Staphylococcus aureus* fueron fagocitados 353 por los macrófagos alveolares de rata, mientras que de un total de 837 hongos de *Candida albicans* fueron fagocitados 42 por los macrófagos alveolares de rata (Cuadro 10).

De acuerdo con lo observado los neutrófilos del apéndice del conejo fueron los más activos al exponerse frente a *Candida albicans* (20.68 %), seguido de los macrófagos alveolares de rata sobre *Staphylococcus aureus* (10.03 %), posteriormente los macrófagos de rata sobre *Candida albicans* (5.01 %) y finalmente la mínima capacidad fagocítica se encontraron los neutrófilos del apéndice del conejo sobre *Staphylococcus aureus* (0.38%) resultado significativo ($P < 0.01$) (Cuadro 11).

Se comparó el porcentaje de los microorganismos fagocitados y no fagocitados frente a cada célula fagocítica, tomando como base el total de microorganismos (TM). La actividad fagocítica de los neutrófilos del apéndice del conejo contra *Staphylococcus aureus* fue de (0.38%) y los no fagocitados (99.62%); las mismas células presentaron una actividad

fagocítica frente a *Candida albicans* de (20.68%) y los no fagocitados (79.32%). La actividad fagocítica de los macrófagos alveolares de rata contra *Staphylococcus aureus* fue de (10.03%) y los no fagocitados (89.97%); las mismas células presentaron una actividad fagocítica frente a *Candida albicans* (5.01%) y los no fagocitados (94.99%) (Cuadro 12).

Se comparó el porcentaje de fagocitosis en base en el total observado de microorganismos fagocitados (TOF), siendo los más altos para los macrófagos alveolares de rata sobre *Staphylococcus aureus* (75.10%), seguido por los neutrófilos del apéndice de conejo contra *Candida albicans* (15.40%); posteriormente los macrófagos alveolares de rata contra *Candida albicans* (8.86%) y finalmente los neutrófilos del apéndice del conejo sobre *Staphylococcus aureus* (0.63%) (Cuadro 10).

También se comparó el porcentaje de microorganismos fagocitados, con base en el gran total de microorganismos observados (GT); los más altos fueron los macrófagos alveolares de rata sobre *Staphylococcus aureus* (6.46%), seguido por los neutrófilos del apéndice de conejo contra *Candida albicans* (1.32%); posteriormente los macrófagos alveolares de rata contra *Candida albicans* (0.76%) y finalmente los neutrófilos del apéndice del conejo sobre *Staphylococcus aureus* (0.05%) (Cuadro 10).

Con las frecuencias observadas se realizaron las proporciones de los distintos tratamientos por medio de la prueba de independencia por χ_i^2 a un nivel de significancia del 5% (cuadro 10). También se obtuvieron intervalos de confianza del 95% para la diferencia de dos proporciones. Así mismo, se construyeron gráficos correspondientes a las frecuencias relativas de los microorganismos fagocitados en cada tratamiento (cuadro 11).

DISCUSION

Se cumplió la hipótesis planteada originalmente. Los resultados permitieron observar que los neutrófilos del apéndice de conejo fueron los más activos contra *Candida albicans*, probablemente debido a una sensibilización previa o a la presencia de los peptidos de la pared de la *Candida albicans* NP-1 y NP-2, esto fue reportado por Leher en conejos. También se observó que el proceso de opsonización efectivamente aumenta la capacidad fagocítica de los neutrófilos; un resultado similar fue ya observado por Roiles donde utilizó neutrófilos humanos contra pseudohifas y blastosporas de *Candida albicans*; en el evaluó el efecto del Interferón γ (INF γ) y el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF) (39).

Otro elemento que influye en la fagocitosis es el Factor de Crecimiento tipo Insulina 1 (FGI-1), reportado en humanos por Bjerknes, donde aumenta la fagocitosis de los neutrófilos contra *Candida albicans* (40).

Los macrófagos alveolares de rata presentaron una actividad fagocítica más alta frente *Staphylococcus aureus*, debido probablemente a una sensibilización previa o a un aumento normal en el metabolismo oxidativo, que inclusive es mayor a otros tipos de macrófagos ubicados en distintos sitios como cabe mencionar a los macrófagos sinoviales y las células de la microglia (14).

Puesto que en el presente estudio sólo se evaluó la actividad fagocítica de las células del apéndice del conejo ante dos microorganismos infecciosos, se sugiere un estudio complementario con otros tipos de microorganismos (virus, parásitos, otras variedades de hongos y bacterias) lo cual permitiría una evaluación integral de estas células.

LITERATURA CITADA

1. Weisbroth S, Elat R. The Biology of the laboratory. 1a edic. USA: Academic Press Inc, 1974.
2. Blas C. Alimentación del conejo. 2a edic. España (Madrid): Mundi-Prensa, 1989.
3. Cheeke P. Rabbit Feeding and Nutrition. 1a edic. USA: Academic Press, 1987.
4. Banks W. Histología Veterinaria aplicada. 3a edic. México (D.F): El manual moderno, 1986.
5. Martínez Y. Fisiología digestiva del conejo (Tesis de Licenciatura). México (D.F): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
6. Maximow A. Tratado de Histología. 3a edic. Argentina (Buenos Aires): Labor, 1952.
7. Monrroy M. Consideraciones anatómicas macro y microscópicas del apéndice cecal del conejo. (Tesis de Licenciatura) México (D,F): FMVZ UNAM. 1973.
8. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 8a edic México (D.F): Interamericana, 1991.
9. Fradson R. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. 4a edic. México (D.F): Interamericana, 1988.
10. Gav H, Walter P. Histología y Anatomía microscópica comparada de los animales domésticos. 3a edic. España (Barcelona): Mundi Prensa, 1983.
11. Ham A. Histología de Ham. 8a edic. México (D.F): Interamericana, 1983.

12. Junqueira L, Caneiro J. *Histología Básica*. 3a edic. México (D.F): salvat ,1987.
13. Leeson T. *Histología*. 5a edic. México (D.F): Interamericana, 1981.
14. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. 4a edic. México (D.F): interamericana, 1995.
15. Bellanti J. *Inmunología*. 13a edic. México (D.F): Interamericana, 1987.
16. Taylor M, Erizondo, Casasola, J. Characterization of an anhibitory seric factor from tuberculosisanergic patient that acts on non-adherent PPD rective cells. *Inmunological Investigation* .1995; 24: 865-879.
17. Bockman D, Cooper M. Pinocytosis by epithelium associated with limphoid follicles in the Bursa of Fabricius, Appendix and Peyer's patch. *Am Journal Anat*. 1973; 136: 455-478.
18. Gebert A, Bartels H. Ultrastructure and protein trasport of cells in the rabbit cecal patch. *The anatomical Record*. 1995; 241: 487-495.
19. Neutra M, Phillips T. Transport of membrane boun macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res*. 1987; 247: 537-546.
20. Kagnoff M. *Inmunology of intestinal tract*. *Gastroenterology*. 1993; 105: 1275-1280.
21. Stramignoni A, Mool T. Development of the lymphoid tissue in the rabbit's appendix. *Acta Anat*. 1972; 7: 202-218.
22. Mirvik Q. *Bacteriología y Microbiología médica*. 2a edic. México(D.F): Interamericana, 1991.
23. Casasola V. *Infección de los macrófagos alveolares de rata con virus respiratorio sinsicial*. (Tesis de Licenciatura) México (D.F): Facultad de Química. UNAM, 1992.

24. Harkness J. The biology and medicine of rabbits and rodents. 3a edic. U.S.A: Lea and Febiger; 1989.
25. Konemar E, Jand W. Diagnóstico microbiológico. 3a edic. México(D.F): Médica Panamericana, 1992.
26. Braude A. Microbiología Clínica. 2a edic. Argentina (Buenos Aires): Médica panamericana, 1984.
27. Jawetz E. Microbiología Médica México(D.F): El manual moderno 1992
28. Custem V. Mycosis in domestic Animals. 1a edic. U.S.A: Janssen Research Foundation, 1991.
29. Carter G. Bacteriología y Micología Veterinaria. 1a edic. México (D.F): El manual Moderno ,1985.
30. Merchant I. Bacteriología y Virología Veterinaria. 3a edic. España (Zaragoza): Acribia, 1980.
31. Chandra K. Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. Archives of diseases in childhood. 1973;48: 864-866.
32. Rosen G. Leucocytes function in children with kwashiorkor. Archives of Diseases in Childhood. 1975; 50: 220-224.
33. Seth V. Opsonic Activity, phagocytosis, and bactericidal capacity of polymorphs in Undernutrition. Archives of diseases in childhood. 1972; 47: 282-284.
34. Gody K. Applied statistics and the SAS program Language. 3a edic. USA: Elsevier Science Publishing Co. Inc. 1991.
35. Mendez I. El protocolo de Investigación. 1a edic. México (D F): Trillas, 1986.
36. Alexander A. Técnicas Quirúrgicas en Animales Domésticos y Temas de terapéutica Quirúrgica. 6a edic. México (D:F): Interamericana, 1986.

37. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. 1a edic. México (D.F):Interamericana, 1993.
38. Lehrer R, Szlerek D. Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* activity. *Infection and Immunity*. 1985;43:
39. Roilides E. Neutrophil oxidative burst in response to blastoconidia and pseudohypha of *Candida albicans*: augmentation by granulocyte colony-stimulating factor and interferon- γ . *The Journal of infectious diseases*. 1992;166: 668-73.
40. Bjerknes R, Aarskog D. Priming of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes by Insulin-like growth Factor I: Increase phagocytic capacity, complement receptor expression, degranulation, and oxidative burst. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995;80:1948-1955 .

FIGURAS

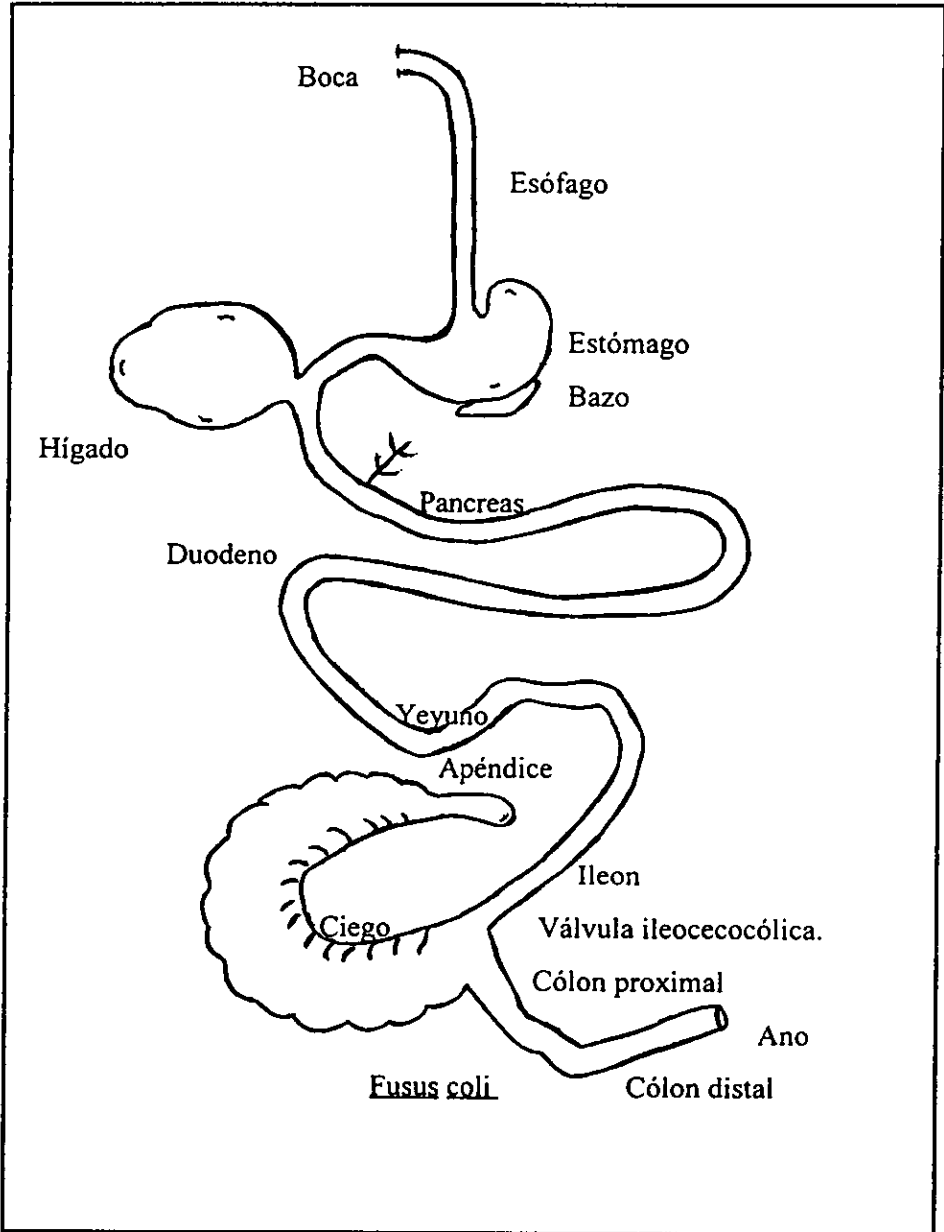


Figura 1. Aparato digestivo del conejo.

*Martínez M. Cunicultura. 1a edic. México (D.F.):Martínez M.1993.

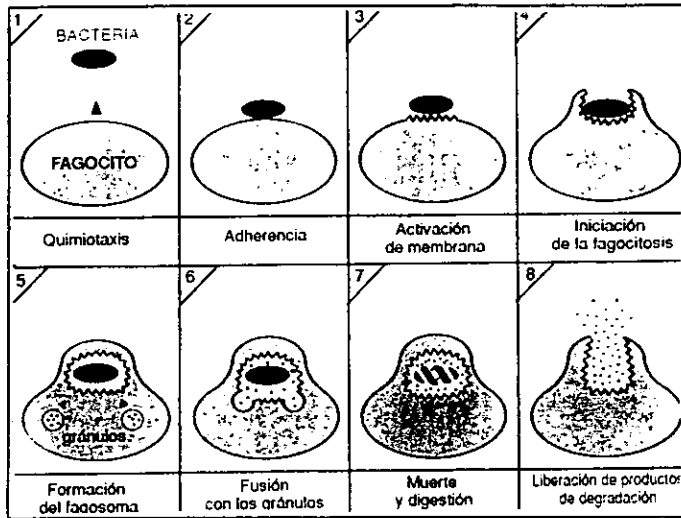
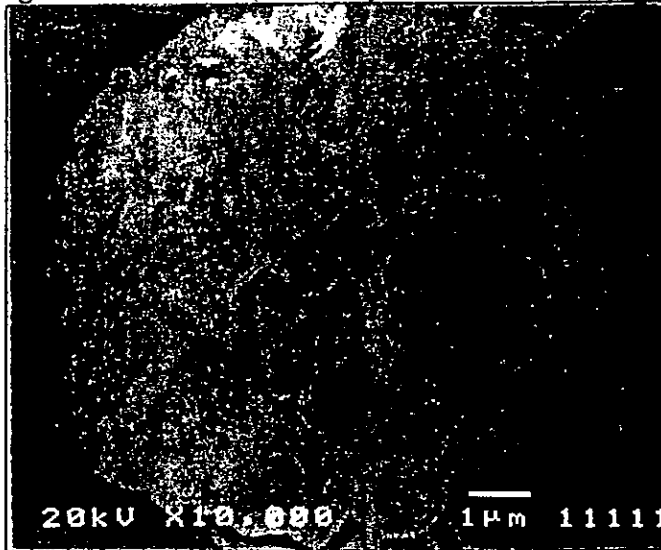


Figura 2. Etapas del proceso de fagocitosis*
 Roitt I. Inmunología Fundamentos. 7a edic. Argentina (Buenos Aires): Medica Panamericana, 1991.

a) Macrófago alveolar de rata (microscopia de barrido)



b) Neutrófilo de conejo (microscopia de transmisión)

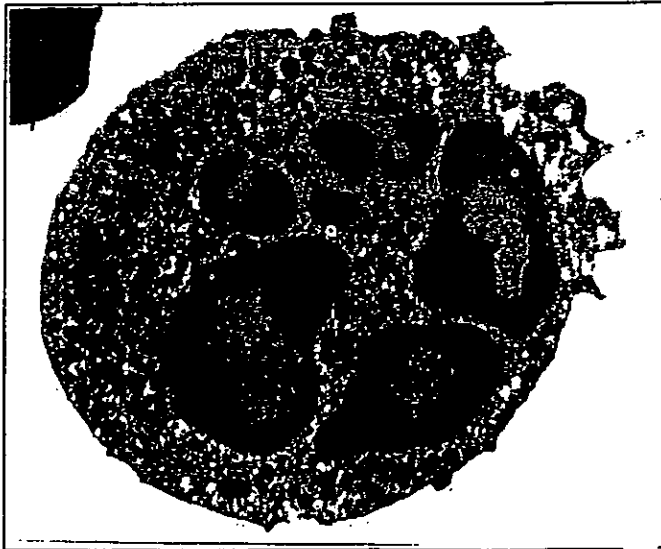


Figura 3. Células fagocíticas.

*a) Casasola F. Laboratorio de Virología. Hospital Infantil de México

*b) Roitt I. Inmunología Fundamentos. 7a edic. Argentina (Bueno Aires): Panamericana Medica, 1991.

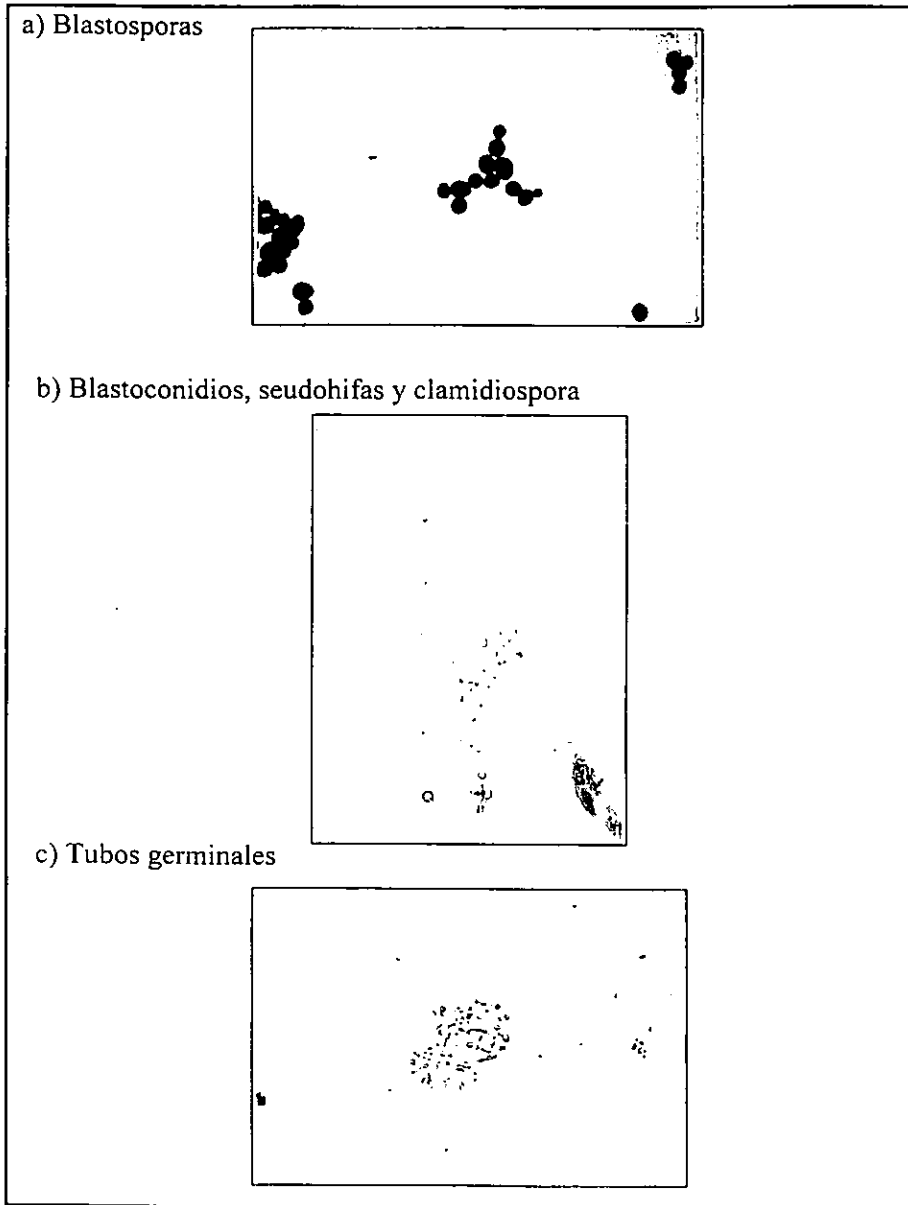


Figura 4. Fases de la *Candida albicans*

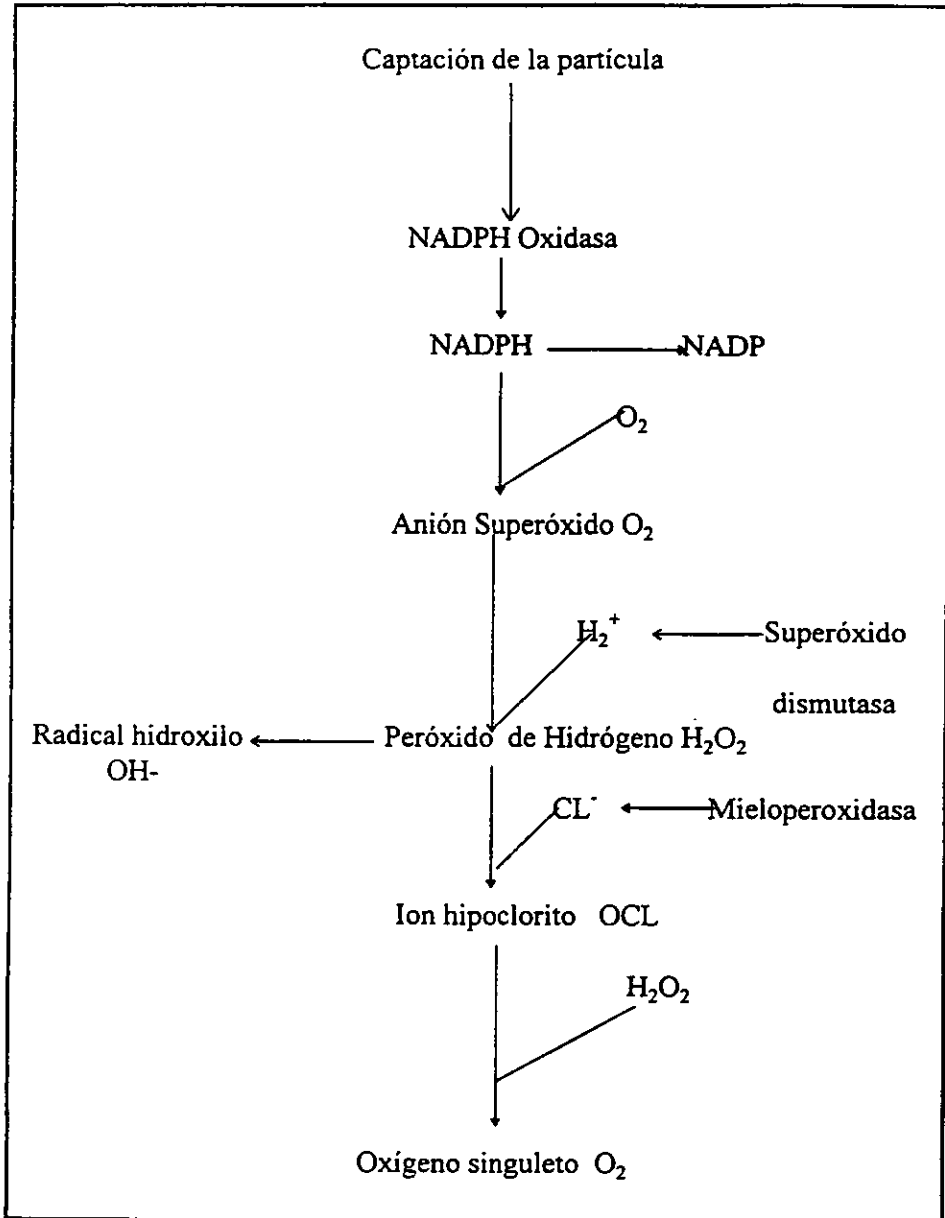
*Old R, Atlas de Microbiología. 1a edic. España (Barcelona): Científica-Médica, 1982.

CUADROS

Día 1	<ul style="list-style-type: none"> -Hay abundantes vasos sanguíneos -El tejido conectivo es abundante -No hay acumulación de células linfoides
Día 2 y 3	<ul style="list-style-type: none"> -Abundantes linfocitos pequeños -Tejido conectivo abundante -Moderada cantidad de vasos sanguíneos -Células linfáticas inmaduras
Día 4	<ul style="list-style-type: none"> -Hay poco linfocitos inmaduros -Hay pocos nódulos linfoides -El tejido conectivo disminuye -Menos vasos sanguíneos
Día 5	<ul style="list-style-type: none"> -Desarrollo de nódulos linfoides moderado -Moderada cantidad de tejido conectivo
Día 7	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento en el número de nódulos linfoides -Poco tejido conectivo -Linfocitos maduros
Día 8	<ul style="list-style-type: none"> -Gran cantidad de linfocitos maduros -Poco tejido conectivo -Gran cantidad de nódulos linfoides
Día 14	<ul style="list-style-type: none"> -Macrófagos y linfocitos abundantes -No hay tejido conectivo

Cuadro 1. Desarrollo del tejido linfoide del apéndice en conejos neonatos.

*Stramignoni A, Development of the lymphoid tissue in the rabbit's appendix. Acta Anat. 1972; 7: 202-218.



Cuadro 2. Metabolismo oxidativo presente en el citoplasma celular del neutrófilo durante la fagocitosis.

* Tizard I, *Inmunología Veterinaria*. 4a edic. México (D.F): Interamericana, 1995.

Secreciones de los macrófagos

Enzimas {
 lisozimas
 Proteasas neutras
 Hidrolasas ácidas.

Componentes del complemento C1, C2, C3, C4, C5, I, B, P

Transferrina

Fibronectina

Metabolitos reactivos
 del oxígeno

Prostanoides {
 Leucotrienos
 Prostaglandinas.
 Factor activador de plaquetas

Monocinas {
 Interleucina-1
 Interferón a
 Factores estimuladores de los
 fibroblastos

Cuadro 3. Secreciones de los macrófagos.

* Tizard I, Inmunología Veterinaria. 4a edic México (D.F): Interamericana, 1995.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

<p><i>Candida albicans</i></p> <p><i>Turulopsis pintolopsii</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Clostridium spiriforme</i></p> <p><i>Lactobacillus sp</i></p> <p><i>Salmonella sp</i></p>
--

Cuadro 3. Especies bacterianas que habitan normalmente el apéndice del conejo.

- a)*Custem Van, Mycosis in domestic Animals. 1a edic. U.S.A. Janssen Research Foundation, 1991.
- b)*Martínez M.: Cunicultura. 1a edic. México (D.F): Martínez M,1993.

Antígeno	Morfología	Auxonograma										Zimograma							
		Indispensable					Efectivo												
	Micelios o pseudomicelios	Clamidospora	Filamentos en suero	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xilosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+	-	-
<i>C.stellatoidea</i>	+	±	±	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>C.tropicalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C.parapsilosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C.krusei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	v	-	+	-	+	+	+	+
<i>C.guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+

+ = Positivo

- = negativo

± = casi siempre

Cuadro 4. Características morfológicas y bioquímicas para la identificación de *Candida albicans*.

*Arenas R, Micología Médica Ilustrada. 1a edic. México (D.F): Interamericana, 1993.

Solución Hank

Glucosa.....	1.00g
Cloruro de Sodio.	8.00g
Cloruro de Calcio.....	0.14g
Cloruro de Potasio.....	0.14g
Sulfato de Magnesio.....	0.14g
Cloruro de Magnesio.....	0.10g
Fosfato Monopótasio.....	0.06g
Fosfato Disódico.....	0.06g
Bicarbonato de Sodio.....	0.35g
Agua Bidestilada.....	1.00 Lt

Solución lítica

NH ₄ Cl.....	8.29g en 500 ml de H ₂ O bidestilada	(Cloruro de Amonio)
NaHCO ₃	4.20g en 500ml de H ₂ O bidestilada	(Carbonato de Sodio)
EDTA.....	0.73g en 500ml de H ₂ O bidestilada	(Acido Etil diamino tetra- ácetico)

Preparación final

NH ₄ Cl.....	500ml
EDTA.....	20ml
NaHCO ₃	10ml
Agua bidestilada.....	20 ml

Cradro 6. Soluciones empleadas para el experimento de fagocitosis.

*Casasola V, Infección de los macrófagos alveolares de rata con virus respiratorio sincicial. UNAM (D.F); Tesis de Licenciatura Facultad de Química , 1992.

Agar Dextrosa Sabouraud

Formula para 1000 ml de agua bidestilada

Ingredientes:

Dextrosa.....40 g

Mezcla de peptonas.....15 g

Agar15 g

pH.....5.6 ± 0.2

Método de preparación: Suspender 65 gramos en un litro de agua bidestilada, mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto, esterilizar a 118-121°C ó 15 libras de presión durante 15 minutos.

Cuadro 7. Ingredientes del medio de cultivo para hongos, usado para los experimentos de fagocitosis.

*Laboratorio SIGMA.

**Agar Infusión Cerebro Corazón
(B.H.I-Placa)**

Formula para 1000 ml de agua bidestilada

Ingredientes:

Infusión de Ternero.....	200.0g
Infusión de corazón de res.....	250.0g
Mezcla de peptonas.....	10.0g
Cloruro de Sodio.....	5.0g
Fosfato disódico.....	2.5g
Dextrosa.....	2.0g
Agar.....	15.0g

Método de preparación: Poner 52 gramos en un litro de agua bidestilada, esterilizar en autoclave a 121°C ó 15 libras de presión durante 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.

**Infusión Cerebro Corazón
(B.H.I.-Líquido)**

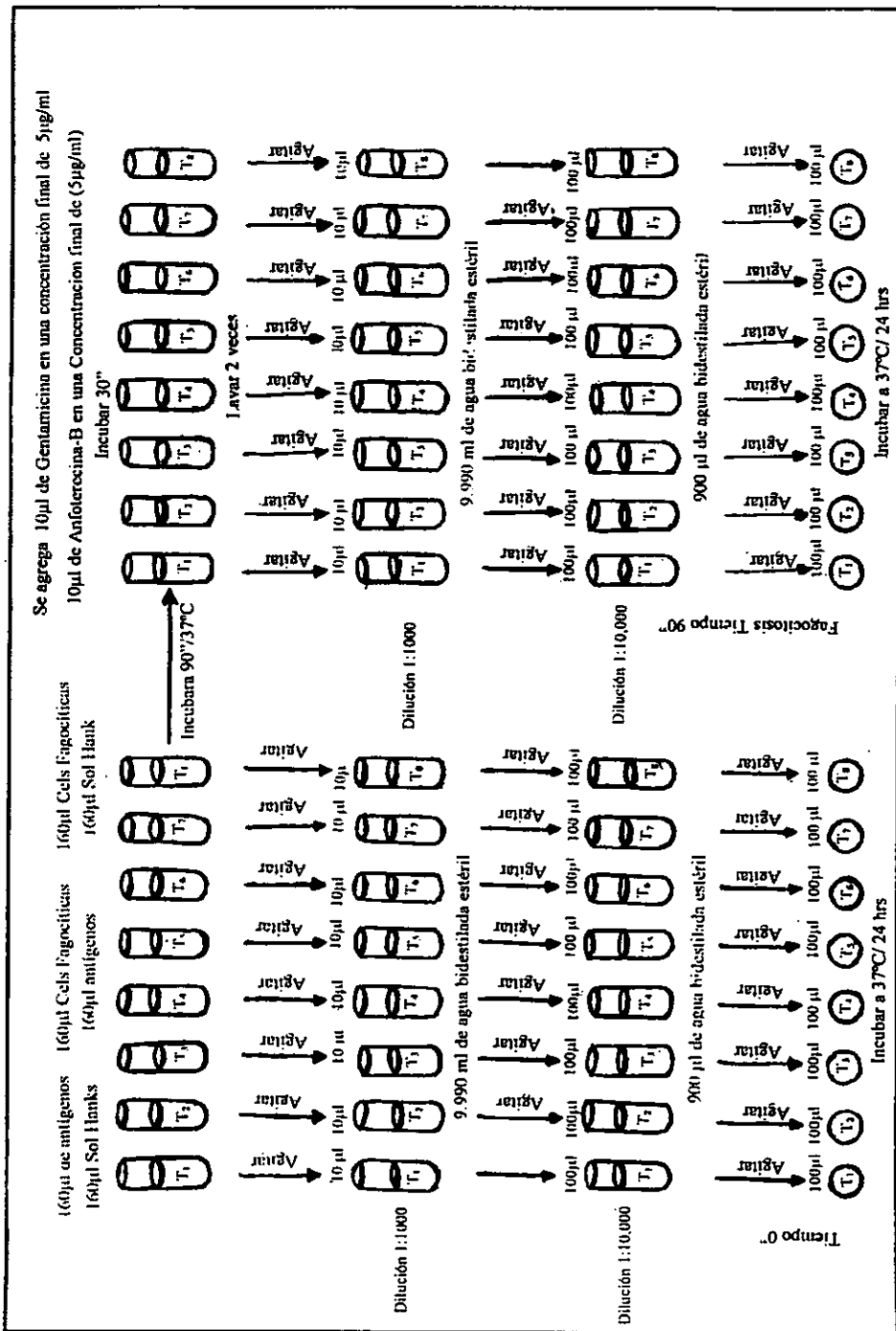
Ingredientes:

Infusión Cerebro Corazón.....	200.0g
Infusión de Corazón de res.....	250.0g
Peptona de Gelatina.....	10.0g
Cloruro de Sodio.....	5.0g
Fosfato disódico.....	2.5g
Dextosa.....	2.0g
pH.....	7.4±0.2

Método de preparación: Poner 37 gramos en un litro de agua bidestilada esterilizar en una autoclave a 121°C ó 15 libras de presión durante 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Cuadro 8. Ingredientes de los medios de cultivos bacterianos, empleados para los experimentos de fagocitosis.

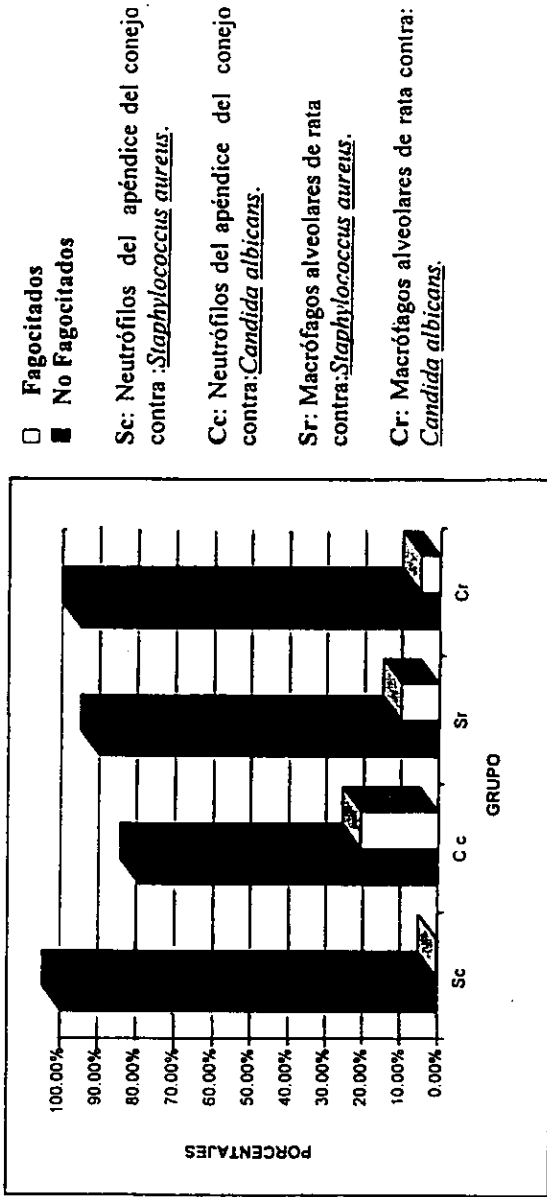
*Laboratorio SIGMA.



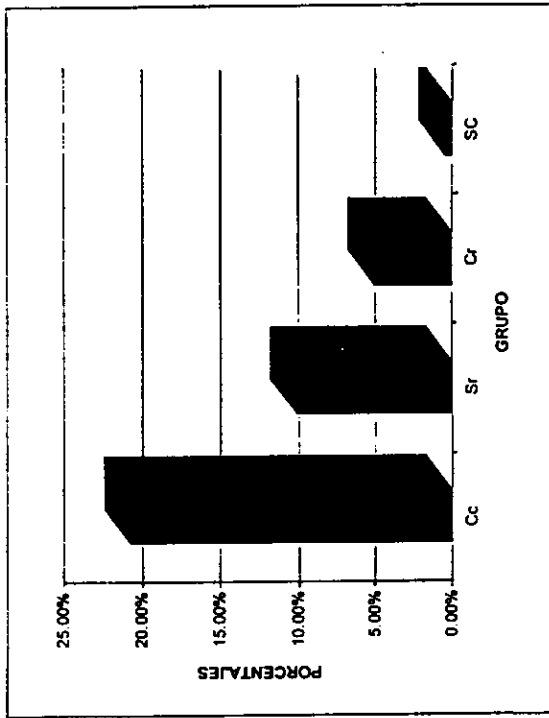
Cuadro 9. Representación gráfica del experimento de fagocitosis.

Antígeno Resultado	Células Fagocíticas				Total observado de fagocitados TOF	% respecto al gran total TOF
	Neutrófilos del apéndice del conejo		Macrófagos alveola- res de rata			
	<i>Staph. aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Candida albicans</i>		
Frec.observada (# fagocitados)	3	73	356	42	474	8.599
% de fagocitados respecto al GT	0.0540	1.3243	6.4586	0.7619		
% de fagocitados respecto al TOF	0.6329	15.4008	75.1054	8.8607		
% de fagocitados respecto al TM	0.3886	20.6798	10.0281	5.01179		
Frec.observada (# no fagocitados)	769	280	3194	795	503	91.40
% de no fagocitados respecto al GT	13.9513	5.0798	57.9462	14.4230		
%de no fagocitados respecto al TOF	15.2639	5.5577	63.3981	15.7800		
% de fagocitados respecto al TM	99.6113	79.3201	89.9718	94.9820		
Total de microorganismos (TM)	772	353	3350	837	5512 (GT) gran total	
% microorganismos respecto al GT	14.0058	6.4042	64.4049	15.1850		

Cuadro 10. Actividad fagocítica "in vitro" de dos tipos de células linfoides obtenidas de dos especies de mamíferos, expuestas a dos microorganismos durante 90 minutos.



Cuadro 11. Comparación de microorganismos fagocitados y no fagocitados por macrófagos alveolares de rata y neutrófilos del apéndice del conejo durante 90 minutos.



Cc: Neutrófilos del apéndice del conejo contra Candida albicans.

Sr: Macrófagos alveolares de rata contra Staphylococcus aureus.

Cr: Macrófagos alveolares de rata contra Candida albicans.

Sc: Neutrófilos del apéndice del conejo contra Staphylococcus aureus.

Cuadro 12. Comparación de la respuesta fagocítica de los neutrófilos del apéndice del conejo y macrófagos alveolares de rata ante: Staphylococcus aureus y Candida albicans durante 90 minutos.