



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México D. F. a 14 de noviembre de 2018.

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la CINVA  
Presente

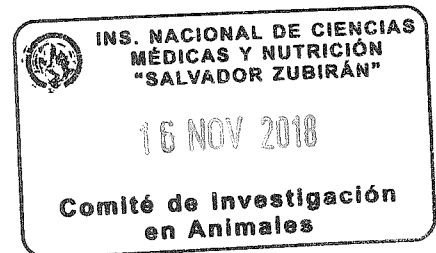
Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS MASTOCITOS DURANTE LAS INFECCIONES MICOBACTERIANAS", con No. de Registro PAT-901-13/14-1 y número de CINVA: **901** debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Rogelio Hernández Pando  
Investigador en Ciencias Médicas F  
Departamento de Patología  
Sección de Patología Experimental





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 14 de noviembre de 2018.

**Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.**  
Presidente del Comité de Investigación  
P r e s e n t e.

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este medio envío Informe final del proyecto titulado: Estudio de la función de los mastocitos durante las infecciones micobacterianas, con registro PAT-901-13/14-1 y número de CINVA 901.

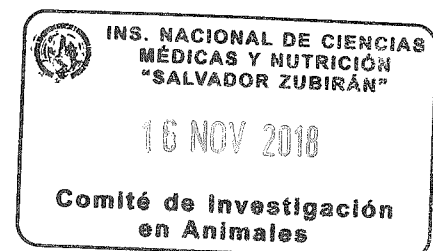
Derivado de éste proyecto La Med. Berenice Villareal Rivota se tituló de Maestría con la tesis titulada: Análisis de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en ratones deficientes de mastocitos (se adjunta acta de examen y portada de tesis).

#### Resultados:

A. LOS RATONES DEFICIENTES DE MASTOCITOS NO PRESENTAN MAYOR MORTALIDAD ANTE LA INFECCIÓN CON MTB EN RELACIÓN A UN GRUPO SILVESTRE.

Posterior a la infección con 250,000 bacilos vivos de Mtb H37Rv, los ratones de ambos grupos fueron monitorizados diariamente. Cuando se observó alguna anomalía (insuficiencia respiratoria, caquexia acentuada o inmovilización total) se sacrificó el animal y se marcó como defunción; que, sumada a las muertes espontáneas, corresponde a la mortalidad representada en la figura 1. Como se observa en la gráfica, no existen diferencias para la sobrevivencia entre el grupo control y el deficiente de mastocitos (MC), alcanzando porcentajes similares de sobrevivencia a lo largo de la infección.

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52) 54870900  
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

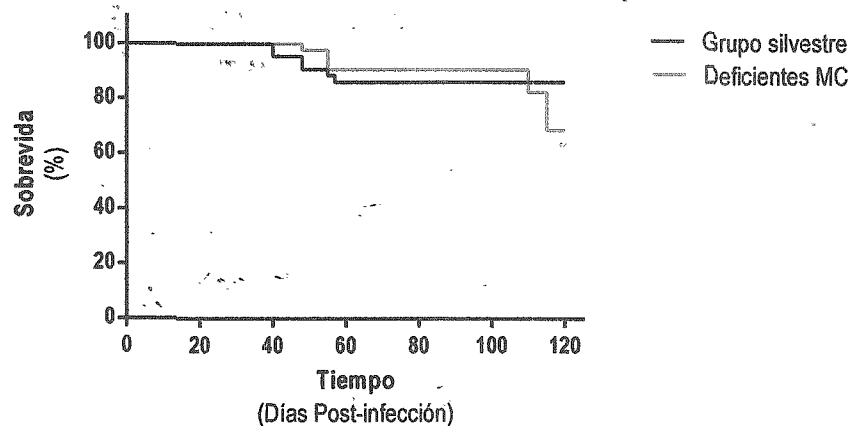


Figura 1. Sobrevida comparada entre grupos de estudio.

Ambos grupos de ratones fueron infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y monitorizados diariamente. Al analizar los porcentajes de supervivencia, no se presentaron diferencias significativas entre grupos a lo largo del experimento. (Gráfica representativa de 2 experimentos independientes con la misma tendencia. El análisis estadístico entre grupos se llevó a cabo aplicando las pruebas Log-Rank (Mantel-Cox) y Gehan-Breslow-Wilcoxon de supervivencia).

#### B. LA DEFICIENCIA DE MASTOCITOS GENERA UN DEFECTO EN EL CONTROL TEMPRANO DE LA CARGA BACTERIANA PULMONAR LUEGO DE LA INFECCIÓN CON MTB.

Se evaluó la carga bacteriana pulmonar a diferentes tiempos, secundaria a la infección con *Mtb H37Rv*, en ambos grupos de estudio. Como se aprecia en la figura 2, tanto en la etapa temprana de infección (día 14), como en la tardía (día 60), la deficiencia de los mastocitos se hizo evidente a través del desarrollo de un número significativamente superior de colonias para este grupo.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

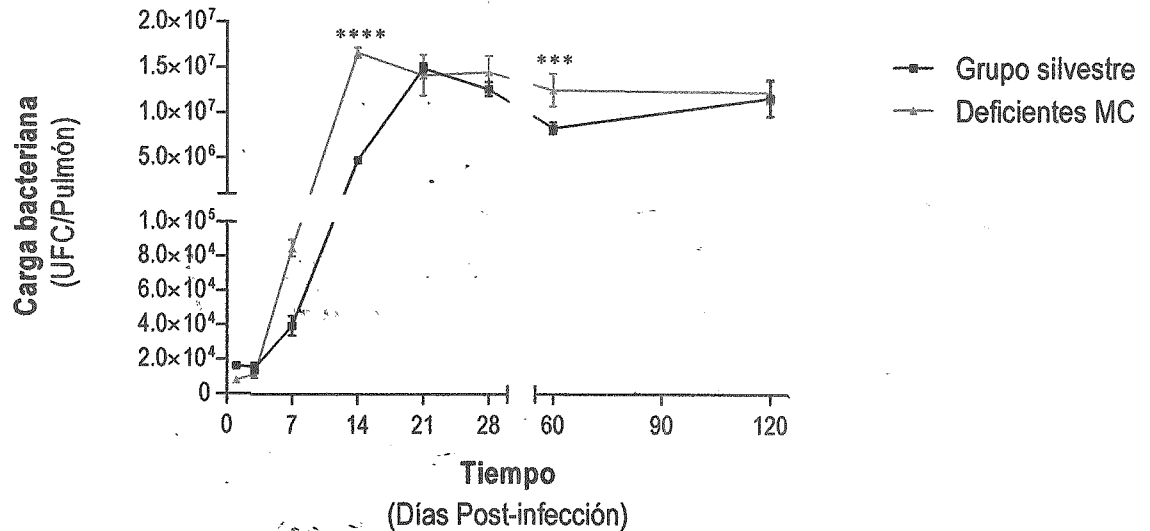


Figura 2. Unidades formadoras de colonias en pulmón.

Se muestran las unidades formadoras de colonias desarrolladas en tejido pulmonar, posterior a la infección intratraqueal con un inóculo de  $2.5 \times 10^5$  *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, en ambos grupos de estudio. El desarrollo de mayor carga bacteriana se hizo evidente de manera significativa para el grupo deficiente de mastocitos durante los días 14 y 60 (triángulo rojo) con respecto al grupo silvestre (cuadrado negro). (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n=6$ , los datos fueron evaluados empleando el análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías).

C. LOS RATONES DEFICIENTES DE MASTOCITOS PRESENTAN UNA MAYOR RESPUESTA INFLAMATORIA DURANTE LA ETAPA TEMPRANA DE INFECCIÓN CON MTB EN RELACIÓN AL GRUPO CONTROL.

Una vez obtenidos los pulmones en cada tiempo de sacrificio, se prepararon para el análisis histológico. Para todos los niveles estructurales analizados (espacio intersticial, área peribronquial y perivenular), se presentó un mayor infiltrado inflamatorio en el grupo deficiente de mastocitos. Lo anterior alcanzó significancia estadística para el día 28 postinfección en el espacio alvéolo-capilar (figuras 3 y 4).



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

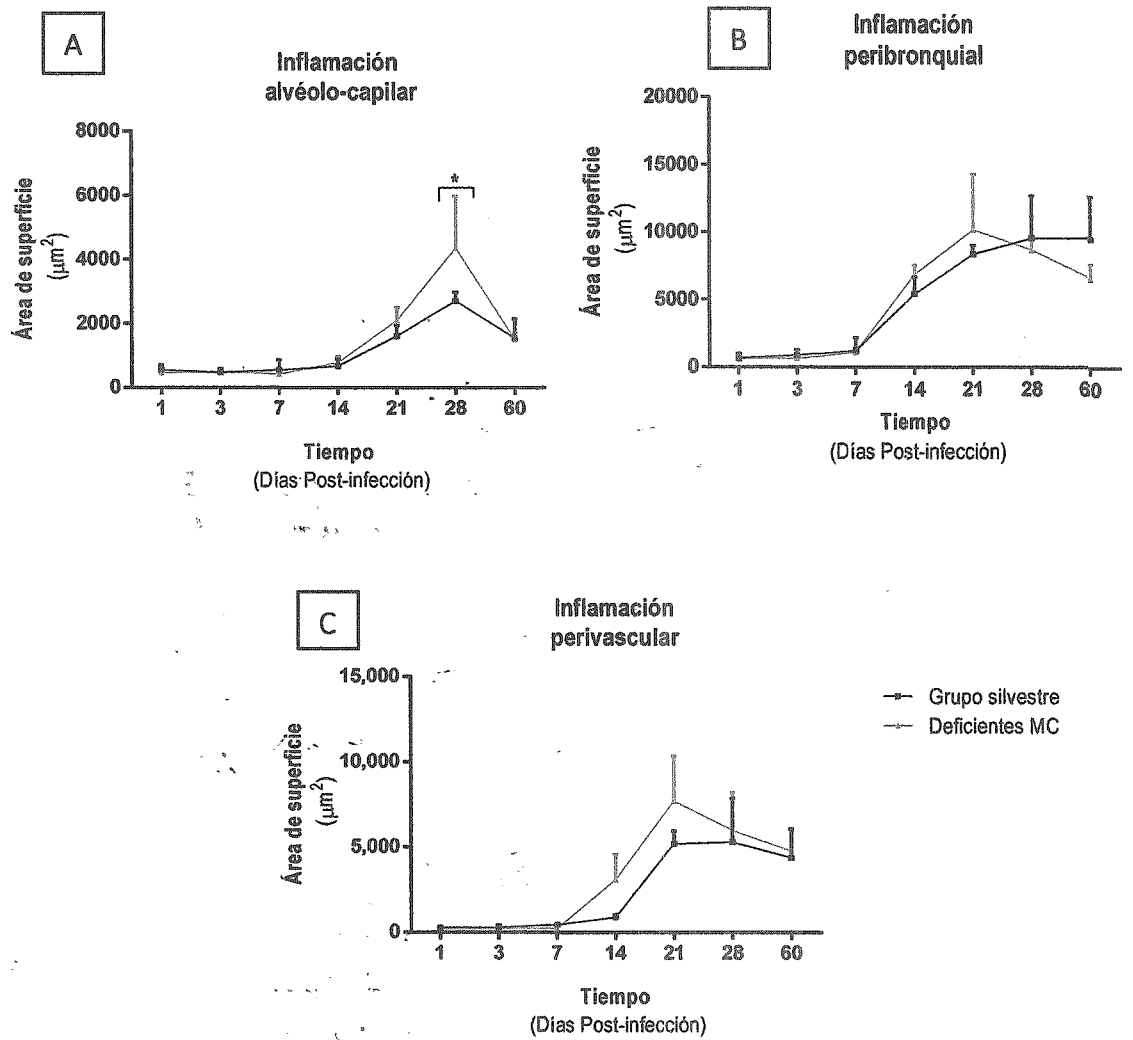


Figura 3. Cinética de infiltrados inflamatorios en pulmón de ambos grupos de estudio.

Los pulmones de 3 ratones por grupo para cada tiempo de evaluación, fueron obtenidos y preparados para análisis histológico; el área inflamatoria de cada compartimiento evaluado (A: espacio intersticial/alvéolo-capilar, B: infiltrado peribronquial, C: infiltrado perivascular) fue determinada por morfometría automatizada. En los 3 niveles morfológicos se aprecia una respuesta inflamatoria más acentuada para los ratones deficientes de mastocitos (triángulo rojo) adquiriendo significancia estadística para el día 28 postinfección en el espacio intersticial (A). (El asterisco (\*) denota significancia estadística,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías).

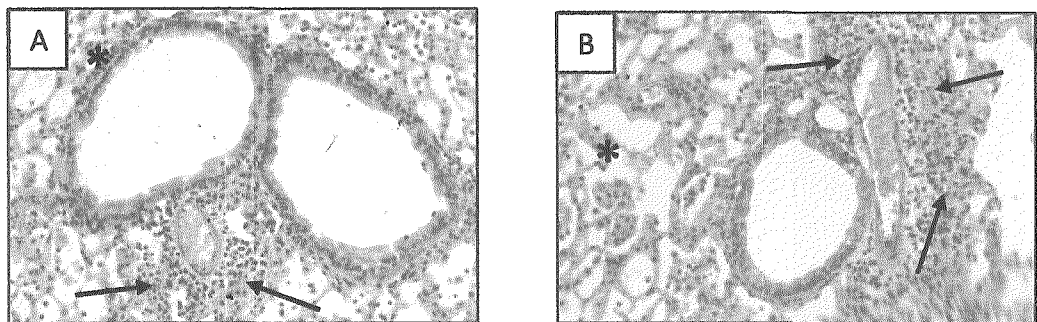


Figura 4. Histopatología pulmonar representativa del día 28 postinfección, ambos grupos.

Se muestran cortes pulmonares representativos de ambos grupos, en el día 28 postinfección; la figura de la izquierda (A) corresponde al grupo silvestre, donde se aprecia infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquial escasos (flechas) en relación al presente en un pulmón de ratón deficiente de mastocitos (B) donde el infiltrado inflamatorio es superior (flechas) incluyendo al espacio alvéolo-capilar (asterisco). (Hematoxilina/eosina; aumento 40X,  $n = 3$ ).



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

En relación al daño secundario al proceso neumónico, al alcanzar el mes postinfección, el grupo deficiente de mastocitos presentaba cerca del 60% del área pulmonar total ocupada por neumonía, siendo significativamente superior al grupo silvestre (figura 5); pero durante la infección tardía, para el día 60, la consolidación neumónica del grupo control alcanzó el 90% del área pulmonar total, invirtiendo los papeles.

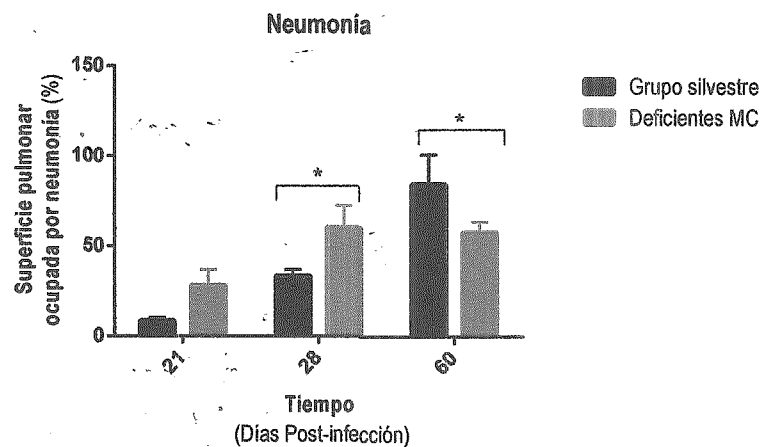
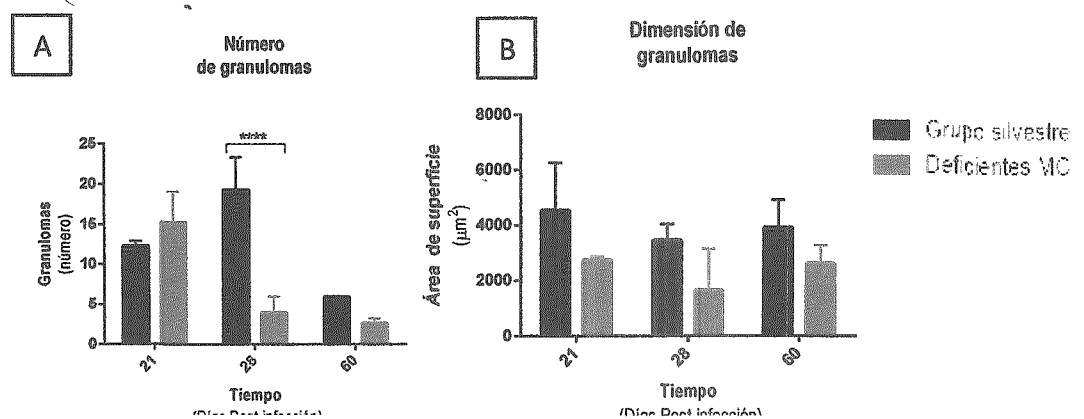


Figura 5. Evaluación del daño neumónico generado por *Mycobacterium tuberculosis*. El grupo deficiente de mastocitos (barra vino) presenta un porcentaje de daño neumónico significativamente superior, al mes postinfección (barra negra). Mientras que el grupo silvestre desarrolla un incremento gradual del área pulmonar ocupada por neumonía a lo largo del tiempo. (El asterisco (\*) denota significancia estadística,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías).

D. LA DEFICIENCIA DE MASTOCITOS GENERA UNA DISMINUCIÓN EN EL NÚMERO Y TAMAÑO DE GRANULOMAS DESARROLLADOS ANTE MTB,

Otro de los parámetros histológicos evaluados fue el desarrollo de granulomas, considerando el área y número de los mismos por pulmón. Los ratones deficientes de mastocitos presentaron un número significativamente menor de granulomas, al mes postinfección; además de tender a ser más pequeños en relación a los desarrollados por el grupo silvestre (figura 6).





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

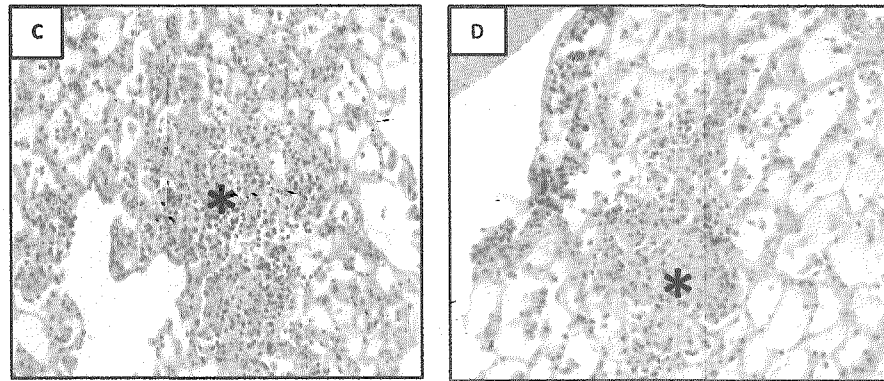


Figura 6. Determinación del número y tamaño de granulomas.

Los ratones deficientes (barrá vino) de mastocitos presentan un número significativamente menor de granulomas (A) y una tendencia a ser más pequeños (B) en relación a los del grupo control (barrá negra). La imagen C corresponde al corte de pulmón de un ratón silvestre en el día 28 postinfección, donde el asterisco denota el granuloma bien formado de mayor dimensión versus el desarrollado en el ratón deficiente de mastocitos (D). (El asterisco (\*\*\*) denota significancia estadística,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ , análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías. Hematoxilina/eosina; aumento 40X).

#### E. LOS RATONES DEFICIENTES DE MASTOCITOS EXPRESAN NIVELES SUPERIORES DE LA CITOCINA INFLAMATORIA TNF- $\alpha$ .

Luego de la obtención de las muestras se realizaron homogeneizados pulmonares para analizar, mediante PCR tiempo real, la expresión de una citocina del perfil Th1 que resulta clave durante la etapa temprana de infección con la micobacteria: TNF- $\alpha$ . Como muestra la figura 7, el grupo deficiente de mastocitos tiende a la mayor expresión de la citocina en todos los tiempos, siendo significativamente superior al grupo control durante la semana 1 postinfección.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

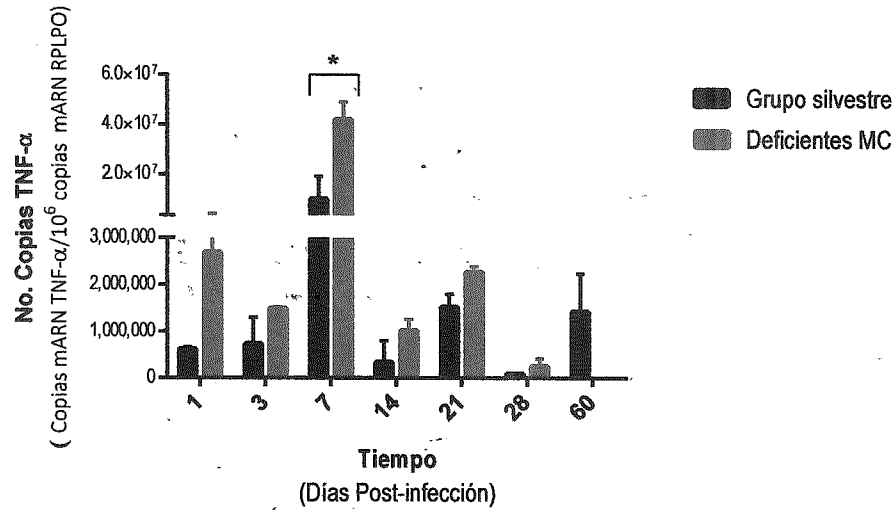


Figura 7. Cinética de la expresión de TNF- $\alpha$  en homogeneizados pulmonares.

Los homogeneizados pulmonares de 3 ratones para cada tiempo fueron evaluados a través de PCR tiempo real, analizando la expresión de la citocina inflamatoria, TNF- $\alpha$ . El grupo deficiente de mastocitos (barra vino) expresó niveles significativamente superiores al grupo control barra negra) para el día 7 postinfección. (El número de copias de la citocina fue normalizado con  $1 \times 10^6$  copias del gen constitutivo RPLPO (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0). El asterisco (\*) denota significancia estadística,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías).

F. LA CARGA BACTERIANA EN BAZO ES SIGNIFICATIVAMENTE SUPERIOR PARA EL GRUPO DEFICIENTE DE MASTOCITOS DURANTE LA ETAPA AVANZADA DE INFECCIÓN.

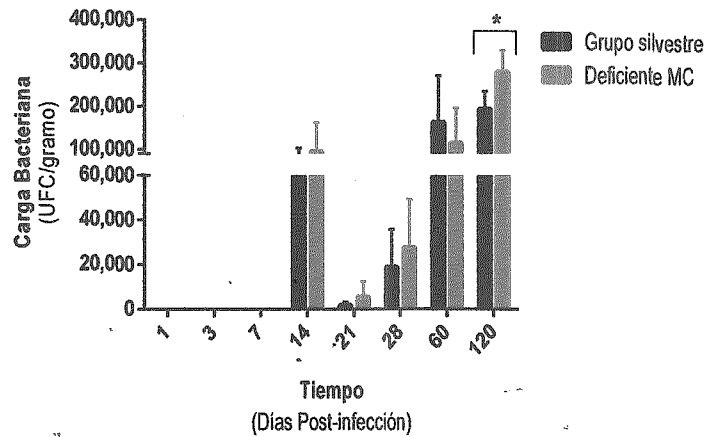
Durante la obtención de las muestras, se observaron diferencias en el tamaño del bazo entre los ratones deficientes de mastocitos y el grupo control. Por lo anterior, se decidió evaluar el desarrollo de unidades formadoras de colonias en dicho órgano. La carga bacteriana fue detectable para ambos grupos hacia el día 14 postinfección, presentándose cuentas significativamente superiores durante la etapa avanzada de infección (día 120) en el grupo deficiente mastocitos (figura 8, A). El incremento de las unidades formadoras de colonias no se vio reflejado en un comportamiento del peso de bazo entre grupos (figura 8, B).





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

A



B

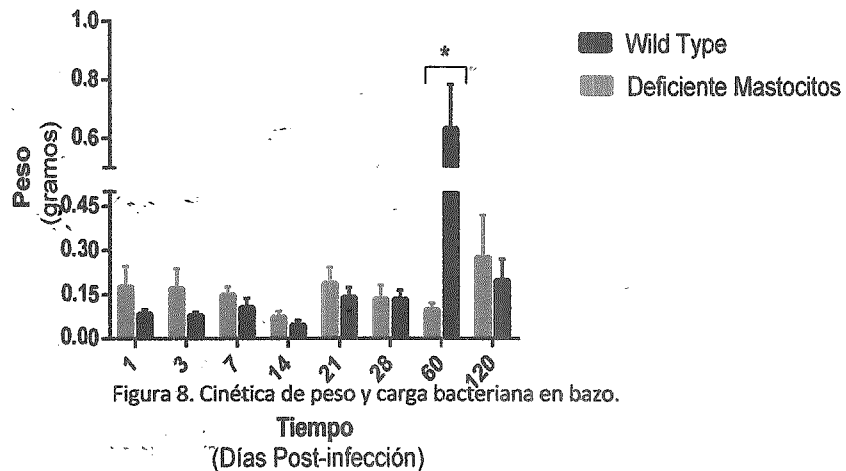


Figura 8. Cinética de peso y carga bacteriana en bazo.

A) Se muestran las unidades formadoras de colonias desarrolladas en bazo, posterior a la infección intratraqueal con un inóculo de  $2.5 \times 10^5$  *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, en ambos grupos de estudio. El desarrollo de mayor carga bacteriana se hizo evidente de manera significativa para el grupo deficiente de mastocitos durante la etapa tardía de infección (día 120). Por otra parte, no se encontró correlación con el peso del órgano a diferentes tiempos, presentando un comportamiento bastante homogéneo entre grupos a excepción del día 60 cuando el grupo control desarrolló un número significativamente superior de colonias. (El asterisco (\*) denota significancia estadística,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ , los datos fueron evaluados empleando el análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías).

## DISCUSIÓN

El modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva bajo el que se desarrolló el proyecto, está caracterizado por usar animales genéticamente idénticos (cepa singénica BALB/c) infectados por la vía natural intratraqueal, mediante inyección con bacterias vivas y virulentas (cepa tipo H37Rv) en una dosis elevada, dado que estos animales no son huéspedes naturales de las micobacterias.<sup>1</sup>

El presente proyecto constituye la primera ocasión en que el experimento fue montado en un modelo C57BL/6. Como se mencionó previamente, al tratarse de una cepa que se considera resistente a la infección, se esperaban modificaciones en la respuesta desarrollada ante la misma, que se harían evidentes en los diferentes parámetros evaluados. Por lo tanto, la discusión estará enfocada en la comparación de los dos modelos murinos (BALB/c versus C57BL/6), así como las diferencias entre el grupo deficiente de mastocitos y el silvestre (ambos C57BL/6).



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Entre las características más relevantes de la tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c, están las siguientes:

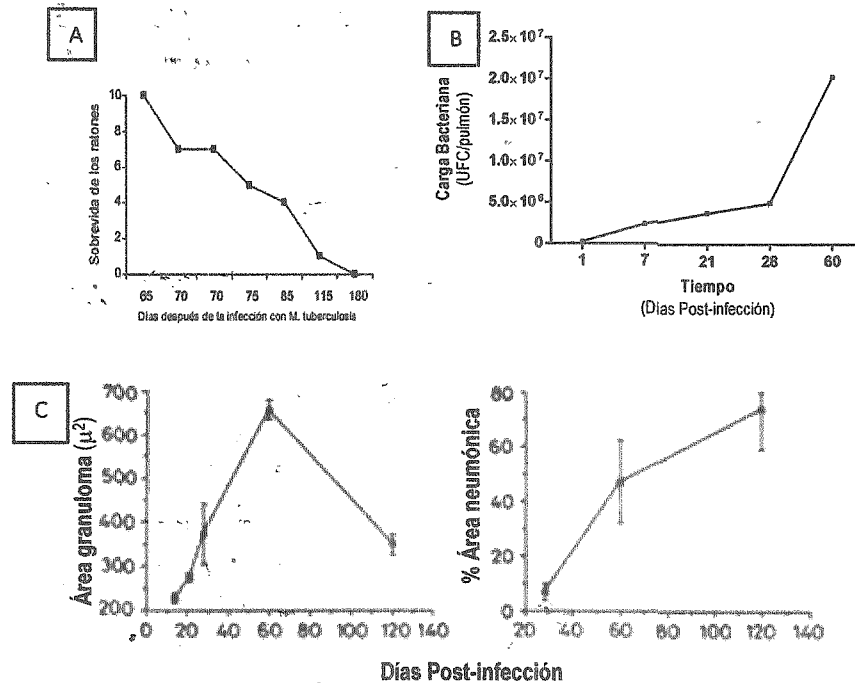


Figura 9. Principales características del modelo de tuberculosis pulmonar progresivo. (A) Curva de supervivencia de los animales durante el curso de la enfermedad. (B) Determinación de unidades formadoras de colonia bacterianas en homogenizados pulmonares. (C) Morfometría automatizada del tamaño de los granulomas y el porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía a lo largo de la enfermedad. Modificado de: Hernández-Pando, R., et al. "Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis", *Immunology* 1996 89 26-33. /

De acuerdo a la inmunopatología de la tuberculosis experimental, durante la fase avanzada de la misma se desarrollan anomalías inmunológicas importantes que permiten la supervivencia y proliferación de la micobacteria, generando la progresión de la enfermedad y llevando a la muerte de los animales por insuficiencia respiratoria debido a una extensa consolidación neumónica.<sup>2</sup> Así, para el modelo tradicional en fondo BALB/c, la supervivencia alcanzada al día 120 postinfección ronda sólo el 10% (figura



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

9 A), cifra que contrasta con el 90% observado en este proyecto para la misma fecha en fondo C57BL/6 (figura 1, grupo control); corroborando la susceptibilidad de la cepa BALB/c a la infección.

En el modelo tradicional, existe una clara correlación entre el incremento de la carga bacteriana pulmonar y la disminución de la sobrevida, que no se ve en el modelo con C57BL/6. Mientras que, en el primer caso, se da un incremento gradual de las unidades formadoras de colonias, teniendo como punto máximo de proliferación bacteriana el día 60 postinfección (momento en que la sobrevida empieza a decaer de manera abrupta), en el segundo existe un control temprano de la carga bacteriana al día 21 postinfección, tiempo en que las cuentas decaen y se mantienen en ese rango hasta la etapa avanzada sin generar muerte de los animales. Lo anterior evidencia nuevamente la resistencia de la cepa C57BL/6 a la infección, logrando la contención del proceso infeccioso durante la primera fase o etapa temprana; desarrollándose posteriormente, sin embargo, el daño neumónico característico de la etapa avanzada de infección.

La primera fase experimental corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, con formación sistemática de granulomas en la segunda semana de infección.<sup>2</sup> En el caso de la cepa resistente a la infección (C57BL/6) el infiltrado inflamatorio presentó un comportamiento similar al planteado para el modelo tradicional, con la instauración gradual de la inflamación durante el primer mes, cediendo paso a la formación de granulomas al día 21 postinfección. En este sentido, si bien la cepa susceptible presenta la formación de granulomas desde el día 14, éstos no son capaces de contener el proceso infeccioso y la carga bacteriana continúa elevándose hasta generar la muerte de los animales; de manera opuesta, en los ratones C57BL/6 la formación de dichas estructuras coincide con el control de la carga bacteriana que se da en la fase temprana.

La segunda etapa de la enfermedad en este modelo experimental, corresponde a la fase avanzada o progresiva, que se caracteriza por un gran incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto conduce a la muerte (figura 9 C).<sup>1-4</sup> Para la cepa C57BL/6 dicho patrón también se reprodujo, siendo el daño más extenso, al alcanzar el 90% de la superficie pulmonar en su momento más crítico (día 120) en relación al máximo de 70% en los ratones BALB/c, y de instauración más temprana (a partir del día 21 versus día 30); sin embargo, el incremento en el número de bacterias descrito para esta etapa, no se



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

presenta. Es decir, mantiene el daño inflamatorio sin una proliferación bacteriana desmedida que lo justifique.

En relación a los grupos deficientes de mastocitos *versus* silvestres no se encontraron diferencias significativas en la sobrevida, presentando valores en un rango del 70-90% para la fase tardía de infección. El hecho de que un déficit significativo de mastocitos no incremente la muerte de los animales al enfrentarse a un modelo de tuberculosis pulmonar, aunado a las evidencias aportadas por experimentos previos que evidencian una interacción mastocito-*Mycobacterium tuberculosis*, sugiere que el entorno es capaz de suplir eficazmente las funciones de la célula que se encuentra "ausente".

Respecto al comportamiento de la carga bacteriana, se apreció una falla en el control temprano de la micobacteria en el grupo deficiente de mastocitos, al presentar un desarrollo significativamente superior de UFC's al día 14 postinfección. Es decir, en los ratones silvestres, poseedores de conteos normales de mastocitos, se instaura un crecimiento limitado del bacilo que alcanza un pico al día 21; mientras que, ante la deficiencia del mastocito, esta proliferación se da de manera libre, adelantando su máxima multiplicación al día 14, una semana antes que el grupo control. A partir de este momento, elementos adicionales son capaces de controlar la infección manteniéndose en ese rango, hasta la etapa avanzada de infección. De esta manera se reafirmó lo observado en otros estudios en referencia al papel protector que el mastocito presenta en procesos infecciosos bacterianos durante la etapa temprana de desarrollo, limitando la proliferación del patógeno en relación a los grupos control.<sup>5-9</sup>

El análisis del infiltrado inflamatorio en varios niveles de organización estructural pulmonar (bronquio, vaso sanguíneo, intersticio) mostró que, ante la deficiencia de mastocitos, lejos de encontrarse poblaciones celulares disminuidas como reflejo de la ausencia de mediadores proinflamatorios que induzcan su reclutamiento, se observa una tendencia al incremento de las mismas en todas las estructuras analizadas (alcanzando significancia estadística en algunas de ellas). Si se integra esta información con el desarrollo del elemento clave de contención de la micobacteria: el granuloma, encontramos una correlación entre la falta de contención de la proliferación bacteriana mencionada anteriormente, y el menor número y tamaño de dichas estructuras en el grupo deficiente de mastocitos. Así mismo, el tiempo de aparición de los granulomas (día 21) coincide con el momento en que se genera la disminución en el conteo de la carga bacteriana para este grupo.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

De igual manera, el área pulmonar con afectación tisular secundaria al proceso inflamatorio, neumonía, fue mayor de manera significativa para el día 28 en el grupo problema alcanzando el 60% de la superficie pulmonar versus un 40% en los ratones silvestres. Sin embargo, en el grupo control continuó la extensión del proceso neumónico, llegando a un 90% para el día 120 postinfección, mientras que en el grupo deficiente de mastocitos se mantuvo de manera indefinida en el 60% ya mencionado. De esta manera, es evidente la generación de un entorno pro-inflamatorio ante el déficit de mastocitos en el sistema; que, secundariamente, es regulado, limitando el daño al tejido pulmonar.

Si bien existe un gran número de estudios desarrollados por diversos grupos de trabajo donde se ha dejado claro el papel pro-inflamatorio protector contra infecciones bacterianas que el mastocito es capaz de desempeñar<sup>5-9</sup> basado en su activación y subsecuente liberación de mediadores, citocinas y factores de crecimiento dirigidos al montaje de una respuesta inflamatoria,<sup>3,10</sup> cada vez toma mayor peso la evidencia también registrada en diferentes estudios<sup>9,11,12</sup> en relación a la función inmunoreguladora que encabeza esta célula. En el contexto de infección se habla de una etapa temprana pro-inflamatoria dirigida al control del agente infeccioso y una tardía montada para contener, precisamente, la respuesta inflamatoria generada evitando un potencial daño colateral al sistema.<sup>11</sup>

De este modo, la respuesta montada será muy variable dependiendo del tipo de estímulo y microambiente, pudiendo de ir de pro a anti-inflamatoria. El término que se le ha dado de "sensor celular" se refiere precisamente a la capacidad de evaluar el entorno para determinar si es necesario montar una respuesta inflamatoria dirigida a contener el agente infeccioso o bien, limitarlo, reparar y evitar daño adicional.<sup>10</sup> De hecho, dentro de las propiedades del mastocito resalta su plasticidad, es decir, la capacidad de cambiar de fenotipo y función de acuerdo al contexto y las condiciones fisiopatológicas que se presenten.<sup>3,4,13</sup>

En este sentido, la eliminación de dicho "sensor microambiental" pudiera haber contribuido en gran medida a la respuesta inflamatoria excesiva que se montó en el grupo deficiente de mastocitos. Por un lado, el reemplazo funcional de los mediadores que en condiciones normales habrían sido liberados por el mastocito (entre ellos TNF- $\alpha$ ) por parte de elementos celulares capaces de producirlos, habría generado en una etapa temprana un estado inflamatorio similar al montado en el grupo control; sin embargo, al estar ausente el mastocito, lejos de "encenderse" los mecanismos reguladores dependientes del mismo para generar la supresión o modulación de dicho estado, continuó exacerbándose, impidiendo la generación de un balance óptimo



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

capaz de contener los efectos colaterales gestados como consecuencia de un proceso inflamatorio desregulado; a saber, el daño tisular significativo que reflejó el importante porcentaje de neumonía observado para el grupo problema en un primer momento.

En este contexto, ¿la incapacidad de suplir al mastocito en su papel antiinflamatorio o inmunoregulatorio podría estarse viendo reflejada de manera directa en la etapa avanzada de la infección?

Entre la vasta gama de mediadores que el mastocito es capaz de almacenar y/o liberar perfilan no sólo citocinas inflamatorias sino también reguladoras, como es el caso de la interleucina 10,<sup>14,15</sup> que desempeña un papel regulador clave del proceso inflamatorio existente, haya sido o no generado por la misma célula. Por lo tanto, resulta lógico correlacionar la falta del mastocito con la pérdida de este componente inmunoregulatorio, que se manifestaría precisamente en la etapa avanzada del proceso infeccioso como daño al tejido pulmonar en respuesta a una falta de balance entre las citocinas pro y anti-inflamatorias.<sup>1,10,16</sup>

Al respecto, cuando se llevó a cabo el análisis de expresión en homogeneizados pulmonares mediante PCR tiempo real de la citocina considerada clave para el papel protector desempeñado por el mastocito ante procesos infecciosos<sup>5-8</sup> TNF- $\alpha$  (que constituye además un pilar dentro del perfil Th1 montado durante la infección micobacteriana), resaltó encontrarla incrementada para el grupo deficiente de mastocitos, contrario a lo planteado hasta el momento; una vez que se analiza en conjunto al estudio histopatológico se hace evidente la correlación entre el incremento de esta citocina y el aumento del infiltrado inflamatorio en las diferentes estructuras pulmonares evaluadas para este grupo. Con lo anterior, pues, se hace más factible la justificación del incremento en el reclutamiento celular como consecuencia del aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias provenientes de otros elementos celulares capaces de generarlas, en un intento de lograr un remplazo o sustitución funcional del mastocito y evitar así las repercusiones de su deficiencia en el sistema; fenómeno que, por otro lado, es bastante común en sistemas donde se elimina del contexto a un elemento celular en concreto.

A lo anterior podría estar contribuyendo, además, el efecto supresor que la histamina tiene sobre citocinas del llamado perfil Th1 (en este caso concreto, TNF- $\alpha$ ) de esta manera, al estar ausente la célula que constituye el principal almacén de dicha amina, se perdería también el efecto supresor sobre el perfil inflamatorio, con el subsecuente incremento en su expresión.<sup>17</sup>



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Cuando el proceso infeccioso no es capaz de ser resuelto o contenido a través de los mecanismos ya mencionados en apartados previos, el agente infeccioso es capaz de diseminarse al resto del organismo, ya sea a través de la vía linfática o bien, hematógena, alcanzando órganos distantes como el bazo.<sup>18</sup> Por lo tanto, se decidió analizar la carga bacteriana presente en este órgano y determinar si la presencia del mastocito tenía un impacto en la migración de la micobacteria.

Al analizar los pesos de bazos del grupo control en relación a los del grupo deficiente de mastocitos se apreció una tendencia, durante la primera semana, a presentar un mayor peso por parte de estos últimos; haciendo alusión a lo señalado por diferentes estudios,<sup>9,11,12</sup> que identifican esta característica (esplenomegalia) como secundaria a la mutación que se emplea en el modelo murino de estudio (C57BL/6–Kit Wsh/W-sh) generando hematopoyesis extramedular en este órgano. Sin embargo, de manera inesperada, durante el día 28 postinfección, se mostró un incremento significativo en el peso de los bazos del grupo control, sin que hubiera una correlación con un incremento en la carga bacteriana para este día.

Al respecto, la identificación de carga bacteriana fue posible hasta el día 14 post-infección, acorde a lo reportado por otros grupos de estudio.<sup>13</sup> De manera interesante, la carga bacteriana registrada para el grupo deficiente de mastocitos fue superior de manera significativa hacia el día 120; es decir, la presencia del mastocito había evitado o comprometido en cierto grado, la migración de las bacterias desde el pulmón (donde se llevó a cabo la inoculación) hacia otros órganos, limitando su proliferación en el tejido esplénico. Algo similar había sido reportado previamente<sup>17</sup> en un modelo de infección por el estreptococo del grupo B (GBS), comensal habitual del tracto genital femenino que, durante el embarazo, mediante la infección ascendente hacia útero, es capaz de generar infecciones severas, llevando a partos pretérmino o bien a la infección invasiva del recién nacido. Dado que el GBS se disemina a bazo durante la infección sistémica, en un modelo murino deficiente de mastocitos (Cpa3-Cre; Mcl-1<sup>fl/fl</sup>) se comparó la carga bacteriana y respuesta inflamatoria en los bazos de ratones infectados. De manera semejante a nuestro modelo, las unidades formadoras de colonias fueron significativamente más altas en el grupo deficiente de mastocitos en relación al control; mientras que los niveles de citocinas inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ /IL-6 mostraron niveles superiores para el grupo wild type. De esta manera, queda clara la contribución del mastocito en la contención del proceso infeccioso al sitio de inoculación, así como la limitación de la diseminación sistémica de infecciones bacterianas.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

## CONCLUSIONES

- Los ratones deficientes de mastocitos no presentan mayor mortalidad ante la infección con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en relación a un grupo silvestre.
- La deficiencia de mastocitos genera un defecto en el control temprano de la carga bacteriana pulmonar luego de la infección con Mtb.
- La deficiencia de mastocitos genera una disminución en el tamaño y número de granulomas desarrollados ante Mtb.
- La respuesta inflamatoria del tejido pulmonar secundaria a la infección es mayor en el grupo deficiente de mastocitos.
- Los ratones deficientes de mastocitos expresan niveles superiores de la citocina inflamatoria TNF- $\alpha$ .
- La carga bacteriana en bazo es significativamente superior para el grupo deficiente de mastocitos durante la etapa avanzada de infección.

## PERSPECTIVAS

- Evaluación de niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias mediante ELISA en ambos grupos de estudio.
- Determinación de la expresión de marcadores específicos del mastocito a nivel pulmonar (triptasa -Tpsb2- y carboxipeptidasa-Cpa3-) a través de RT-PCR en homogeneizados pulmonares.
- Cuantificar la producción pulmonar de otras citocinas (IL-6, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-10) en ambos grupos de ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR.





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

- Reconstitución de los animales deficientes de mastocitos, empleando mastocitos derivados de pulmón de animales silvestres, vía intratraqueal.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hernández-Pando, R., et al. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996 89 26-33.
2. Hernández-Pando., et al. Inmunopatología de la tuberculosis experimental. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVIII (2004).
3. Hernández-Pando., et al. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology* 2000 Jul;100(3):352-8.
4. Hernández-Pando., et al. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis? *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995 Sep;12(1):63-72.
5. Trinchieri, G., Sher, A., «Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence.» *Nature Reviews Immunology* (2007): 7, 179-190
6. Piliponsky, A.M., et al. «The Chymase Mouse Mast Cell Protease 4 Degrades TNF limits Inflammation, and Promotes Survival in a Model of Sepsis.» *Am J Pathol* (2012): 181, 875-886.
7. Malaviya, R., et al. «Mast Cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alfa.» *Nature* (1996): 381, 77-80.
8. Mazzone, A., et al. «Dendritic cell modulation by mast cells controls the Th1/Th2 balance in responding T cells.» *Journal of Immunology* (2006): 177, 3577-3581.
9. Michel, A. S. et al. Mast cell-deficient Kit W-sh "Sash" mutant mice display aberrant myelopoiesis leading to the accumulation of splenocytes that act as myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of Immunology* 2013; 190(11):5534-44.
10. Smith, SD., Liggitt, E., Jeromsky, X., «Local role for tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pulmonary inflammatory response to Mycobacterium tuberculosis infection.» *Infect Immun* (2002): 70, 2082.
11. Beghdadi, W., et al. Mast cells as sensors in inflammation and immunity. *Frontiers Immunology*. 2011; Volumen 2, Article 37.
12. Nigrovic, P; et al. Genetic Inversion in Mast Cell-Deficient W<sup>sh</sup> Mice Interrupts *Corin* and Manifests as Hematopoietic and Cardiac Aberrancy. *The American Journal of Pathology*. 2008 Dec; 173(6): 1693-1701.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

13. Eruslanov, EB., et al. Lung cell responses to *M. tuberculosis* in genetically susceptible and resistant mice following intratracheal challenge. *Clinical and Experimental Immunology*. 2004 Jan; 135(1): 19–28.
14. Bos, K., Harkins, K., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., & Comas, I. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 2014; 514, 494- 509Lawn, S., & Zumla, A. Tuberculosis. *The Lancet* 2011; 378, 57 - 72.
15. Armstrong JA, Hart PD. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *The Journal of Experimental Medicine* 1971; 134(3 Pt 1):713-40.
16. Hernández-Pando, R., et al. «Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection.» *The Lancet* (2000): 356, 213-8.
17. Gendrin, C., et al. Mast cell degranulation by a hemolytic lipid toxin decreases GBS colonization and infection. *Sci Adv*; 2015 Jul 17;1(6): e1400225.
18. Wolters, P. M. (2005). Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient Kit<sup>Wsh</sup>/Kit<sup>Wsh</sup> mice. *Clin Exp Allergy*.

Se adjunta copia de constancia de asistencia a Congreso y Constancia de obtención de grado de la Med. Berenice Villareal Rivota.

Sin más por el momento, me despido con cordiales saludos.

Atentamente,

**Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando**  
Investigador en Ciencias Médicas F  
Departamento de Patología  
Sección de Patología Experimental

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

C.c.p: **Dr. Gerardo Gamba Ayala** – Director de Investigación  
**MVZ. Mariela G. Contreras Escamilla** - Jefe del Depto. de Investigación Experimental y Bioterio

SEP

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos".  
"60 Aniversario del CECyT 14 "Luis Enrique Erro".  
"60 Aniversario del Patronato de Obras e Instalaciones".  
"50 Aniversario de la COFAA-IPN".  
"30 Aniversario de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología".

A QUIEN CORRESPONDA:

El que suscribe, Jefe de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, hace constar que fungieron como:

Director de la Tesis de Maestría, el(a) C. Profesor(a):

**Dr. Rommel Chacón Salinas**

Director de Tesis de Maestría, el(a) C. Profesor(a):

**Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa**

del(a) alumno(a):


CE

TESIS: **Análisis de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en ratones deficientes de mastocitos**

Fecha de examen: 26 de junio de 2017.

A petición de el(la) interesado(a) y para los usos legales que se estimen pertinentes, se extiende la presente CONSTANCIA a los 26 días del mes de junio del año dos mil diecisiete.

ATENTAMENTE  
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

  
DR. GERARDO APARICIO OZORES, E.P.  
JEFE DE LA SECCION  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

GAO/EGCV/lhgv.



## **XXII CONGRESO NACIONAL DE INMUNOLOGÍA 2016**

**"International Meeting - New Trends in Immunology"**

**"40<sup>o</sup> aniversario de la**

**Sociedad Mexicana de Inmunología"**

**Zacatecas, Zacatecas.**

**19-23 de abril de 2016.**

## ANÁLISIS DE LA INFECCIÓN POR *Mycobacterium tuberculosis* EN RATONES DEFICIENTES DE MASTOCITOS.

### Autores

CE<sup>1</sup>, CE<sup>1</sup>, CE<sup>1</sup>

1, Jorge Barrios Payán 2, Dulce Mata Espinosa 2, Brenda Marquina Castillo 2, Rogelio Hernández Pando 2, Rommel Chacón Salinas 1.

1 Instituto Politécnico Nacional

2 Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán

### Introducción

La tuberculosis constituye una de las principales causas de muerte generadas por enfermedades bacterianas. Usualmente se considera que los principales elementos celulares implicados en su control son macrófagos, células dendríticas y linfocitos T; sin embargo, otras estirpes pueden contribuir a dicha respuesta, como los mastocitos, que son abundantes en los pulmones humanos. Estudios previos han demostrado que esta población celular desempeña un papel clave durante la respuesta temprana en contra de diferentes bacterias al inducir un proceso inflamatorio que permite el reclutamiento de células efectoras al sitio de infección. Estudios previos han demostrado que los mastocitos pueden activarse *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis*.

### Objetivo

Evaluar el desarrollo de la infección *in vivo* de ratones deficientes en mastocitos con *Mycobacterium tuberculosis*.

### Materiales y Métodos

Grupos de ratones C57BL/6 y Kit W-sh/W-sh fueron infectados intratraquealmente con 2.5 x 10<sup>5</sup> bacilos *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. El desarrollo de la infección fue evaluado por sobrevivencia, histopatología pulmonar, carga bacteriana y la expresión de citocinas por qPCR a diferentes tiempos.

### Resultados

No se presentó modificación en sobrevivencia entre grupos; la carga bacteriana pulmonar de ratones Kit W-sh/W-sh mostró un incremento significativo al día 14, mientras que sus infiltrados inflamatorios fueron mayores en estadios tempranos de infección en comparación a ratones C57BL/6.

### Conclusiones

Estos resultados muestran que los ratones deficientes de mastocitos presentan un defecto en el control temprano de la carga bacteriana, que correlaciona con una mayor respuesta inflamatoria. Sin embargo, otros elementos inmunes contribuyen a un control de la infección en etapas tardías.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

# ACUSE

"2017, Año del centenario de la promulgación de la constitución de los Estados Unidos Mexicanos"

México, D. F., a 11 de abril de 2017.

**Dr. Rogelio Hernández Pando**  
Depto. Patología Experimental  
Presente.

REF: CINVA-901 PAT-901

Estimado Dr. Hernández.:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

““Estudio de la función de los mastocitos durante las infecciones micobacterianas””.

**ACUERDO: ACEPTADA la prórroga hasta el 31 de diciembre de 2017.**


Este comité ha dictaminado que **SE AUTORIZA LA PRÓRROGA.**

Que solicita ampliación de fecha al diciembre 2017 para la realización del protocolo..

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

 INVEST. EXPERIMENTAL Y  
BIOTERIO

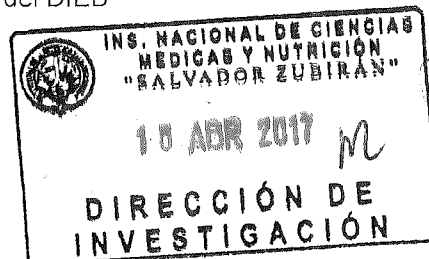
18 ABR 2017

INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

1320

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación  
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom



*Patología  
García  
18-10-17*

Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

*"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"*

Ciudad de México, a 10 de marzo de 2017.

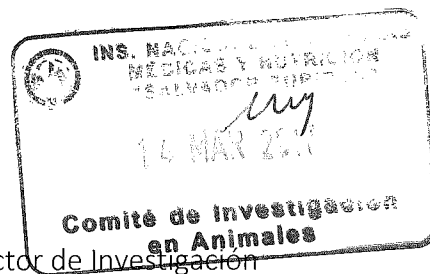
**Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.**  
Presidente del Comité de Investigación  
P r e s e n t e.

En atención a su oficio fechado 23 de febrero del año en curso, solicito de la manera más atenta se extienda la vigencia del protocolo titulado: **"Estudio de la función de los mastocitos durante las infecciones micobacterianas"** al 31 de diciembre del año en curso. Dicha solicitud se debe a que durante ese tiempo no se tuvo acceso a la cepa de animales B6.Cg-Kit<sup>W</sup><sup>sh</sup>/HNIhr-Br por dificultades en su reproducción en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio.

Sin más por el momento, me despido con cordiales saludos.

Atentamente,

**Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando**  
Investigador en Ciencia Médicas F  
Departamento de Patología  
Sección de Patología Experimental



Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

C.c.p: **Dr. Gerardo Gamba Ayala** – Director de Investigación  
**M. V. Z. Mariela Contreras Escamilla** – Jefa del DIEB



# ACUSE

"Año del centenario de la promulgación de la constitución política de los Estados Unidos Mexicanos"

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 23 de Febrero de 2017

Dr. Rogelio Hernández Pando  
Depto. de Patología Experimental  
Presente

1775 BDR  
INVEST. EXPERIMENTAL Y  
BIOTERIO 12:20  
23 FEB 2017

INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS  
Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

Estimado Dr. Hernández:


Por este conducto le informo que su proyecto: "ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS MASTOCITOS DURANTE LAS INFECCIONES MICOBACTERIANAS.", con registro CINVA: PAT-901-13/14-1 finalizó en agosto del 2016. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente. De no recibir respuesta de su parte en el plazo de 15 días, el protocolo se dará por cerrado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

  
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
Coordinadora de la CINVA

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación  
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

  
24/feb/2017.  
Branda Marquez  
patología  
astro

Alexis

23-02-17

Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

NAB/nom





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México D.F. a 8 de Julio de 2014

**Dr. Rafael Hernández G.**

**Jefe del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio.**

**PRESENTE:**

Estimado Dr. Rafael Hernández, por este conducto deseo darle respuesta a su detallado comunicado con fecha 4 de mayo de 2014 en el que hace referencia que el día 1 de julio del presente a través del conducto del Dr. Jorge Barrios el bioterio recibió unos ratones B.6Cg-Kit(Wsh)Hnhr-BR, de antemano le ofrezco una disculpa por la demora en la respuesta pero en nuestro departamento tenemos mucho trabajo.

1. El proyecto al que se vincula es: **PAT-901-13/14-1**
2. Propósito para el que se introduce: reproducción para uso de los hijos en la investigación.
3. El tiempo que se mantendrá la línea será de 1 año.
4. Características de los animales: Como en anteriores ocasiones tuvimos que proporcionar 15 microaisladores para alojar a los animales, en 9 de ellos hay parejas con crías, en los 6 restantes había distribuidos 9 hembras y 12 machos sin aparear. La edad de los animales 14 semanas los adultos.
5. Características genéticas: animales deficientes de mastocitos. Características Fenotípicas: Pelo blanco y ojos negros.
6. Parámetros biológicos: Contactar al bioterio de CINVESTAV.
7. Parámetros Reproductivos: Contactar al bioterio de CINVESTAV.
8. Tipo de apareamiento: Contactar al bioterio de CINVESTAV.
9. Condiciones de alojamiento: ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura y humedad: la que puede proporcionar el bioterio.
10. Requerimientos específicos: agua, cama y croquetas utilizadas en la reproducción de nuestro animales.
11. Necesidades del investigador: se requerirán tres entregas de 50 machos de 8 semanas y 22gr de peso en el año.



**INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

12. Equipo con el que se manejarán los animales: Conforme vaya creciendo la colonia, Patología Experimental proporcionará los microaisladores necesarios para alojar a los animales.

Aprovecho para informarle que la semana pasada el Sr. Leonardo le proporciono al Biol. Sergio 23 rejillas para ser utilizadas en las cajas para ratones recientemente adquiridas.

Si mas por el momento me despido deseando que ésta información le sea útil para valorar la situación y atender nuestras necesidades.

Atentamente

**Dr. Rogelio Hernández Pando**  
Investigador en Ciencias Médicas "F"  
Sección de Patología Experimental  
Departamento de Patología

**Dr. Jorge Alberto Barrios Payán**  
Investigador en Ciencias Médicas "C"  
Sección de Patología Experimental  
Departamento de Patología

C.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala. Director de Investigación.  
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez. Coordinador de Atención al Usuario.

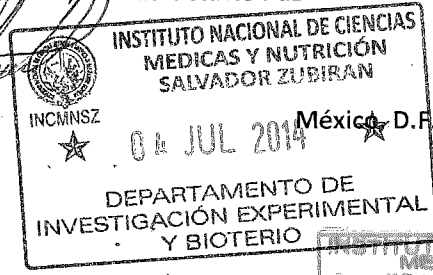


INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

ACUSE

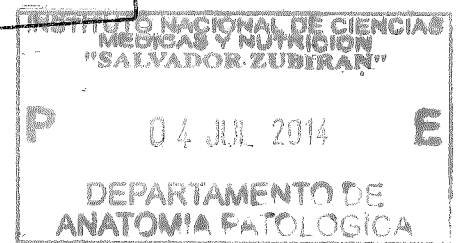
*Rafael Hernández González*

"2014, Año de Octavio Paz"



México, D.F., a 4 de mayo de 2014

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO  
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS F  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA



*Gerardo Ayala*

Estimado Dr. Hernández,

El día martes 1 de julio del presente se recibieron en este Departamento por conducto del Dr. Jorge Barrios ratones de la línea genética: B6.Cg-Kit(Wsh)Hnhr-BR, la única información que se tiene es la procedencia de los animales (Cinvestav). Sin embargo, no se recibió información sobre lo siguiente:

- |   |   |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proyecto de investigación al que se le vincula.</li> <li>2. Propósito para el que se introduce:             <ol style="list-style-type: none"> <li>a) reproducción para conservación de línea genética</li> <li>b) reproducción para uso de los hijos en investigación</li> <li>c) sin reproducción, se utilizan directamente en investigación</li> </ol> </li> <li>3. Tiempo que se mantendrá la línea genética en el DIEB.</li> <li>4. Características de los animales recibidos             <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Cantidad y relación de los animales</li> <li>b) Edad</li> <li>c) Sexo</li> </ol> </li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>f) Distribución (separados por sexos, parejas/tríos en reproducción, otro).</li> <li>5. Características genéticas y fenotípicas de la línea.</li> <li>6. Parámetros biológicos.</li> <li>7. Parámetros reproductivos.</li> <li>8. Tipo de apareamiento (en su caso).</li> <li>9. Condiciones de alojamiento que requiere.</li> <li>10. Requerimientos específicos (alimentación, nido, tratamientos, etc.).</li> <li>11. Necesidades del investigador.</li> <li>12. Equipo con el que manejarán los animales.</li> </ol> |
|---|---|

Esta es información que se requiere para valorar la situación y poder ofrecer atención a sus necesidades.

Sin otro particular,

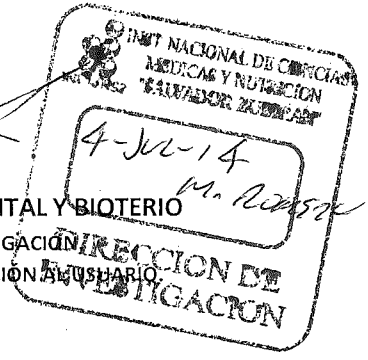
ATENTAMENTE

*Rafael Hernández González*

DR. RAFAEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

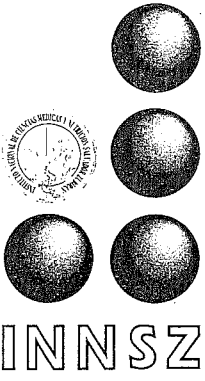
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL Y BIOTERIO

C.c.p. DR. GERARDO GAMBA AYALA. DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN ANATOMICA  
M en C OCTAVIO VILLANUEVA SÁNCHEZ. COORDINADOR DE ATENCIÓN AL USUARIO



Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Sección XVI  
Delégación Tlalpan  
México, D. F. 14000  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

11/10/14/2014 f"



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Junio 17, 2013

Dr. Rogelio Hernández Pando  
Sección de Patología Experimental  
Departamento de Patología  
P r e s e n t e.

Con referencia al proyecto de investigación: "Estudio de la función de los mastocitos durante las infecciones micobacterianas".

Registro CINVA: 901

Clave: PAT-901-13/14-1

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA) revisó la respuesta a las observaciones emitidas por la comisión y decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

Atentamente

Dr. Rafael Hernández González  
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

- ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
- MVZ. Griselda Salmerón Estrada. Secretaria CINVA
- Dra. Nimbe Torres y Torres.- CINVA
- MVZ.M.C. Ma. de la Luz Streber J. CINVA
- Dr. Gonzalo M. Torres Villalobos. CINVA
- Dr. Emiliano Tesoro Cruz. CINVA

RECIBI ORIGINAL  
5/7/13  
DR. JORGE BARRIOS

Investigación  
Tradición Servicio  
Asistencia Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

"2013, Año de la Lealtad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

"11/01/2014"

México D. F. a 07 de junio de 2013

**Dr. Rafael Hernández González**

Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales  
Presente.

En respuesta a la revisión del protocolo de investigación con animales no. PAT-901-13/14-1, en la que nos solicita explicar cuáles serán los criterios que se considerarán para establecer los puntos terminales humanitarios que determinarán que se sacrifique al animal por presentar dolor o sufrimiento durante el procedimiento experimental, le enlistamos los siguientes puntos:

- Dificultad para alimentarse o beber agua.
- Pérdida de peso mayor al 20%.
- Dificultad para respirar.
- Disminución de la actividad.
- Piloerección.
- Postura anormal o espalda arqueada.

Así mismo, adjunto al presente la declaración de los investigadores firmada por cada uno de los participantes.

Agradezco de antemano su atención al presente, quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración al respecto.

Atentamente,

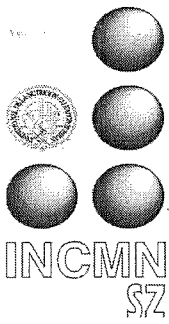
**Dr. Rogelio Hernández Pando**

Investigador Responsable del Proyecto  
Departamento de Patología,  
Sección de Patología Experimental.

C.c.p: MVZ Griselda Salmerón. Secretaria del CINVA  
Dra. Nimbe Torres y Torres  
Dr. Gonzalo Manuel Torres Villalobos  
M. en C. María de la Luz Streber Jiménez  
Dr. Emilio Tesoro Cruz

Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
México, D. F. 14000  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

"11/01/2014 f"



# INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

México, D.F. a 07 de mayo de 2013

## DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

**TÍTULO DEL PROYECTO:** ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS MASTOCITOS DURANTE LAS INFECCIONES MICOBACTERIANAS.

**Clave de Registro:** PAT-901-13/14-1

Los investigadores que participamos en el proyecto arriba mencionado sometemos voluntariamente a evaluación dicho proyecto ante la Comisión de Investigación en Animales y declaramos libremente:

- Que conocemos todos los aspectos del estudio y contamos con la capacidad de llevarlo a buen término.
- Que la revisión minuciosa de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización y nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad.
- Que conocemos los riesgos potenciales a los que exponemos al personal técnico, investigadores y los animales mismos involucrados en el proceso experimental, que se encuentran tanto en contacto directo como indirecto en el lugar donde se realiza la investigación. Por lo anterior, se establecen en el protocolo las medidas precautorias necesarias.
- Que pondremos el bienestar de los animales sujetos de investigación y la seguridad del personal en contacto con ellos por encima de cualquier otro objetivo.
- Que nos conduciremos de acuerdo con EL PRINCIPIO GENERAL DE LAS TRES R's descrito en el Manual del Usuario del SISTEMA ELECTRÓNICO DE REGISTRO DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN: Comisión de Investigación en Animales, numeral 13 ([http://132.247.8.50/latis\\_invp/archivos/Manual.pdf](http://132.247.8.50/latis_invp/archivos/Manual.pdf)). Asimismo, nos someteremos a los estándares de comportamiento ético y científico aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud y el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud de México, La NOM 062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (publicada por SAGARPA en el Diario Oficial, 22 de agosto del 2001), y los lineamientos para el buen uso de los animales recopilados por el Consejo Internacional para La Ciencia de los Animales de Laboratorio en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (ICLAS-WHO, <http://www.iclas.org/harmonization.htm>).

Nombre del investigador	Firma
Hernández Pando, Rogelio	
Mata Espinosa, Dulce Adriana	
Chacón Salinas, Rommel	
Barrios Payan, Jorge Alberto	
Marquina Castillo, Brenda Noemí	

WMBIC/2014/1"

RESPUESTA A REVISIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CON ANIMALES PRESENTADOS AL  
CINVA

Mayo 07, 2013

PROTOCOLO CLAVE: PAT-901-13/14-1

TÍTULO: "Estudio de la función de los mastocitos durante las infecciones bacterianas"

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dr. Rogelio Hernández Pando

DEPARTAMENTO: Patología. Patología Experimental

**Observaciones.**

1. Presentar llenada y firmada la declaración de los investigadores que se adjunta a la presente comunicación.
2. Explicar cuáles serán los criterios que se considerarán para determinar los puntos terminales humanitarios que determinarían que se sacrifique al animal por presentar dolor o sufrimiento durante el procedimiento experimental. A modo de ejemplo se presenta el caso de la Universidad de Pennsylvania, el cual se basa en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio 2011

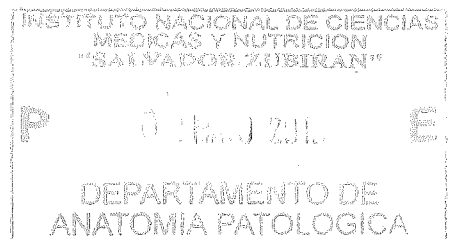
<http://www.upenn.edu/regulatoryaffairs/Documents/iacuc/guidelines/iacucguideline-humaneendpoints-8%2023%2011.pdf>

Atentamente

DR. RAFAEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

- c.c.p. MVZ Griselda Salmerón. Secretaria del CINVA  
 Dra. Nimbe Torres y Torres  
 Dr. Gonzalo Manuel Torres Villalobos  
 M en C María de la Luz Streber Jiménez  
 Dr. Emilio Tesoro Cruz



Éndira Angeles

"11/01/2014"

**IACUC Guideline  
Humane Intervention and Endpoints for  
Laboratory Animal Species**



Office of Regulatory Affairs

To develop a humane endpoint, the researchers should describe the clinical progression that a particular animal or group of animals is likely to experience as a result of experimental manipulation or spontaneously occurring disease during the animals' lifetime. Research staff must be adequately trained in recognition of species-specific behaviors and, in particular, species-specific signs of pain, distress, and morbidity (see **Table 1**).

The selection of appropriate humane endpoints requires a detailed knowledge of the impact of the procedure on the animal to allow for intervention before unpredicted distress or pain develops. "When novel studies are proposed or information for an alternative endpoint is lacking, the use of pilot studies is an effective method for identifying and defining humane endpoints and reaching consensus among the PI, IACUC, and the veterinarian." (*Guide 2011*)

**Please note: the IACUC may request a pilot study specifically related to endpoint determinations.**

The duration of biomedical studies involving pain and distress should be kept to a minimum. Before submission of a protocol, the research staff should ensure that the following have been determined and included:

- (i) development of both appropriate experimental AND humane endpoints for the study;
- (ii) assignment of the appropriately trained person(s) responsible for determining that an experimental and/or a humane endpoint has been reached;
- (iii) description of current literature searches for alternatives for any/all potentially painful/distressful procedures.

**Humane Endpoints in Behavioral Studies**

In all behavior studies and tests, proposed procedures for monitoring, record keeping, and humane interventions must be described in the protocol. A baseline behavioral profile of an animal should be established if changes in behavior are going to be used to monitor the animal for distress. An understanding of the species-typical behavior of the animals used in awake, behaving experiments is critical for adequately assessing the animal for signs of stress/discomfort that may be minimized either through an earlier endpoint determination or by modifying experimental procedures. Subtle changes detected in the animal's demeanor or its willingness to work in a study or sudden changes in performance on behavioral tasks may be the first indicators of a health problem that should be investigated. If such changes are noted, the researcher should promptly notify the ULAR veterinary staff so that the animal can be more fully evaluated. (NRC 2003)

**Moribund Condition as a Humane Endpoint**

Procedures or experiments that are expected to produce a moribund state must be categorized as UPENN Pain Category C. These types of studies will be reviewed by the full IACUC and must have scientific justification. The continuation of an experimental study to the point where an animal dies without the benefit of intervention or euthanasia ("death as an endpoint" study) is not acceptable without strong scientific justification.

Various clinical signs are indicative of a moribund condition in laboratory animals. If any of these signs are noted, prompt consultation with the ULAR veterinary staff or euthanasia must occur. The following signs can quickly lead to a moribund state and should be considered when developing endpoints:

- Any condition interfering with eating or drinking (e.g. difficulty with ambulation)
- Inability to remain upright
- Rapid weight loss or net weight loss of more than 20% of the body weight



"11/01/2014"

## IACUC Guideline Humane Intervention and Endpoints for Laboratory Animal Species



Office of Regulatory Affairs

- Prolonged inappetance
- Evidence of muscle atrophy/marked loss of body condition
- Diarrhea, if debilitating or constipation
- Markedly discolored urine, polyuria or anuria
- Rough hair coat, hunched posture, lethargy or persistent recumbency
- Central nervous system disturbance - head tilt, seizures, tremors, circling, paresis
- Lack of physical or mental alertness
- Coughing, labored breathing, nasal discharge, or respiratory distress
- Jaundice and/or anemia (paleness)
- Unexplained/uncontrolled bleeding from any site on the body
- Excessive or prolonged hyperthermia or hypothermia
- Conclusive evidence that untreatable organ failure has occurred with signs associated with the failure of the organ system
- Marked dehydration

### Monitoring Frequency

A detailed and descriptive plan for scheduled monitoring of research animals both before and after a procedure, including the provision of treatments and supportive care, must be included in the protocol submission. Investigators should be aware that as the potential for pain/distress in animals rises, there should be an increasing intensity of monitoring and frequency of observations performed.

### Scoring Systems (example provided in Table 2)

Professional and clinical judgments are essential for the evaluation of an animal's well being, and are critical to the ultimate decision of euthanasia for humane reasons. As well, objective data-based approaches to predicting imminent death, when developed for specific experimental models, should facilitate the implementation of timely euthanasia before the onset of clinically overt signs of moribundity. (Toth 2000)

Scoring systems are one way in which humane endpoints can be defined and implemented. The attached example of a scoring system is based upon routine observations. In this example, a score is assigned to each variable, 0 (normal or mild) to 3 (severe change/variation from normal). The cumulative score gives an indication of the likelihood that the animal is experiencing pain or distress. Humane endpoints can be established based on these criteria. A total score of >5 or a score of 3 in any one variable, regardless of the total score should warrant mandatory evaluation/decision by a veterinarian or humane euthanasia. **The example in this document should be modified for specific species and designed to fit each protocol and animal model.**

### Euthanasia

Timely euthanasia can improve research and scientific validity by eliminating distress and improving animal well-being, alleviating unnecessary animal suffering, while potentially enhancing the integrity and quality of samples to be collected. (Stokes 2000)

Animals must be euthanized in accordance with the approved protocol, based upon the current American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines on Euthanasia, or as recommended by the ULAR veterinary staff.

"11/01/2014"

IACUC Guideline  
Humane Intervention and Endpoints for  
Laboratory Animal Species



TABLE 1. Indicators of Pain in Several Common Laboratory Animals (NRC 2003)

Species	General Behavior	Appearance	Other
Rodents	Decreased activity; excessive licking and scratching; self-mutilation; may be unusually aggressive; abnormal locomotion (stumbling, falling); writhing; does not make nest; hiding	Piloerection; rough/stained haircoat; abnormal stance or arched back; porphyrin staining (rats)	Rapid, shallow respiration; decreased food/water consumption; tremors
Rabbit	Head pressing; teeth grinding; may become more aggressive; increased vocalizations; excessive licking and scratching; reluctant to locomote	Excessive salivation; hunched posture	Rapid, shallow respiration; decreased food/water consumption
Dog	Excessive licking; increased aggression; increased vocalizations, inclusive of whimpering, howling, and growling; excessive licking and scratching; self-mutilation	Stiff body movements; reluctant to move; trembling; guarding	Decreased food/water consumption; increased respiration rate/panting
Cat	Hiding; increased vocalizations, inclusive of growling and hissing; excessive licking; increased aggression	Stiff body movements; reluctant to move; haircoat appear rough, ungroomed; hunched posture; irritable tail twitching; flattened ears	Decreased food/water consumption
Nonhuman Primate	Increased aggression or depression, self-mutilation; often a dramatic change in routine behavior (e.g., locomotion is decreased); rubbing or picking at painful location	Stiff body movements; reluctant to move; huddled body posture	Decreased food/water consumption

11/10/2014

**IACUC Guideline  
Humane Intervention and Endpoints for  
Laboratory Animal Species**



**TABLE 2. Representative Scoring System\*\* for Determining Humane Endpoints**

Variable		Score
<b>Body Weight Changes</b>		
0	Normal	
1	< 10 percent weight loss	
2	10-15 percent weight loss	
3	> 20 percent weight loss	
<b>Body Condition Score (see diagram for details)</b>		
0	Body condition score >3	
1	BCS >2 and < 3	
2	BCS >1 and <2	
3	BCS of 1 or less	
<b>Physical Appearance</b>		
0	Normal	
1	Lack of grooming	
2	Rough coat, nasal/ocular discharge	
3	Very rough coat, abnormal posture, enlarged pupils	
<b>Measurable Clinical Signs</b>		
0	Normal	
1	Small changes of potential significance	
2	Temperature change of 1-2oC, cardiac and respiratory rates increased up to 30 percent	
3	Temperature change of > 2oC, cardiac and respiratory rates increased up to 50 percent, or markedly reduced	
<b>Unprovoked Behavior</b>		
0	Normal	
1	Minor changes	
2	Abnormal, reduced mobility, decreased alertness, inactive	
3	Unsolicited vocalizations, self mutilation, either very restless or immobile	
<b>Behavioral Responses to External Stimuli</b>		
0	Normal	
1	Minor depression/exaggeration of response	
2	Moderately abnormal responses	
3	Violent reactions, or comatose	
		<b>TOTAL:</b>

**\*\*This representative scoring template should be modified for specific species and designed to fit each protocol and animal model.**

"11/01/2014"

IACUC Guideline  
Humane Intervention and Endpoints for  
Laboratory Animal Species



Representative Body Condition Scoring (BCS) charts for rodents

**NOTE: BCS should be extrapolated to the particular species approved in your IACUC protocol**

**BC 1**  
 Mouse is emaciated.  
 • Skeletal structure extremely prominent;  
 little or no flesh cover.  
 • Vertebrae distinctly segmented.

**BC 2**  
 Mouse is underconditioned.  
 • Segmentation of vertebral column evident.  
 • Dorsal pelvic bones are readily palpable.

**BC 3**  
 Mouse is well-conditioned.  
 • Vertebrae and dorsal pelvis not prominent;  
 palpable with slight pressure.

**BC 4**  
 Mouse is overconditioned.  
 • Spine is a continuous column.  
 • Vertebrae palpable only with firm pressure.

**BC 5**  
 Mouse is obese.  
 • Mouse is smooth and bulky.  
 • Bone structure disappears under flesh and  
 subcutaneous fat.

A "+" or a "-" can be added to the body condition score  
 if additional increments are necessary (i.e. ...2+, 2, 2-...)

**BC 1**  
 Rat is emaciated  
 • Segmentation of vertebral column prominent  
 if not visible.  
 • Little or no flesh cover over dorsal pelvis. Pins  
 prominent if not visible.  
 • Segmentation of caudal vertebrae prominent.

**BC 2**  
 Rat is under conditioned  
 • Segmentation of vertebral column prominent.  
 • Thin flesh cover over dorsal pelvis, little  
 subcutaneous fat. Pins easily palpable.  
 • Thin flesh cover over caudal vertebrae,  
 segmentation palpable with slight pressure.

**BC 3**  
 Rat is well-conditioned  
 • Segmentation of vertebral column easily  
 palpable.  
 • Moderate subcutaneous fat store over pelvis.  
 Pins easily palpable with slight pressure.  
 • Moderate fat store around tail base, caudal  
 vertebrae may be palpable but not segmented.

**BC 4**  
 Rat is overconditioned  
 • Segmentation of vertebral column palpable  
 with slight pressure.  
 • Thick subcutaneous fat store over dorsal  
 pelvis. Pins of pelvis palpable with firm  
 pressure.  
 • Thick fat store over tail base, caudal vertebrae  
 not palpable.

**BC 5**  
 Rat is obese  
 • Segmentation of vertebral column palpable  
 with firm pressure; may be a continuous  
 column.  
 • Thick subcutaneous fat store over dorsal  
 pelvis. Pins of pelvis not palpable with firm  
 pressure.  
 • Thick fat store over tail base, caudal vertebrae  
 not palpable.

Ulman-Cullere M, Foltz C, 1999 Body Condition Scoring: A  
Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in  
Mice, LAS Vol 49 no 3 pg 319-323.

Hickman D, Swan M, 2010 Use of a Body Condition Score  
Technique to Assess Health Status in a Rat Model of  
Polycystic Kidney Disease, JAALAS Vol 49 No 2 pg 155-159.

"11/01C/2014"

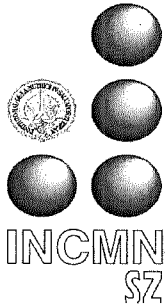
**IACUC Guideline  
Humane Intervention and Endpoints for  
Laboratory Animal Species**



**References**

1. AWIC (Animal Welfare Information Center). Humane Endpoints. <http://wic.nal.usda.gov/nal>.
2. Carstens E and Moberg GP. 2000. Recognizing pain and distress in laboratory animals. *ILAR J* 41:62-71.
3. IRAC (Interagency Research Animal Committee). The US Government Principles for Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research and Training. Federal Register. 1985.
4. Morton DB. 200. A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J* 41:80-86.
5. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington(DC): National Academies Press (US):2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32660/>
6. NRC (National Research Council). 2010. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington D.C.: National Academy of Sciences.
7. NRC.2003. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. Washington:National Academic Press.
8. Olfert ED and Godson DL. 2000. Humane Endpoints for Infectious Disease Animal Models. *ILAR J* 41:99-104.
9. Silverman J., M.A. Suckow, S. Murthy. 2007. *The IACUC Handbook (2nd ed.)*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 17: 33-35.
10. Stokes WS. 2000. Reducing unrelieved pain and distress in laboratory animals using humane endpoints. *ILAR J* 41:59-61.
11. Toth LA. 2000. Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. *ILAR J* 41:72-79.
12. Tulane University Institutional Animal Care & Use Committee. "Policy of Humane Experimental Endpoints in Rodent Research" [tulane.edu/asvpr/.../P6-08-Humane-Experimental-Endpoints-in-Rodent.doc](http://tulane.edu/asvpr/.../P6-08-Humane-Experimental-Endpoints-in-Rodent.doc)
13. University of California-Irvine IACUC Policy on Establishing Humane Endpoints. <http://www.research.uci.edu/ora/acup/humaneEndpoints.htm>
14. University of Illinois Office of Animal Care and Institutional Biosafety. "Guidelines-Humane Experimental Endpoints v 2.0."
15. Wallace J. 2000. Humane endpoints and cancer research. *ILAR J* 41:87-93.

"11 Dic 2014 f"



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION  
"SALVADOR ZUBIRAN"  
COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES  
(CINVA)

7 de mayo de 2013

**DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES**


**TÍTULO DEL PROYECTO:**

**Clave de Registro:**

Los investigadores que participamos en el proyecto arriba mencionado sometemos voluntariamente a evaluación dicho proyecto ante el Comité de Investigación en Animales y declaramos libremente:

- Que conocemos todos los aspectos del estudio y contamos con la capacidad de llevarlo a buen término.
- Que la revisión minuciosa de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización y nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad.
- Que conocemos los riesgos potenciales a los que exponemos al personal técnico, investigadores y los animales mismos involucrados en el proceso experimental, que se encuentran tanto en contacto directo como indirecto en el lugar donde se realiza la investigación. Por lo anterior, se establecen en el protocolo las medidas precautorias necesarias.
- Que pondremos el bienestar de los animales sujetos de investigación y la seguridad del personal en contacto con ellos por encima de cualquier otro objetivo.
- Que nos conduciremos de acuerdo con EL PRINCIPIO GENERAL DE LAS TRES R's descrito en el Manual del Usuario del SISTEMA ELECTRÓNICO DE REGISTRO DE PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN: Comité de Investigación en Animales, numeral 13 (<http://132.247.8.10/invp/archivos/Manual.pdf>). Asimismo, nos someteremos a los estándares de comportamiento ético y científico aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud y el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud de México, La NOM 062-ZOO-1999: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (publicada por SAGARPA en el Diario Oficial, 22 de agosto del 2001), y los lineamientos para el buen uso de los animales recopilados por el Consejo Internacional para La Ciencia de los Animales de Laboratorio en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (ICLAS-WHO, <http://www.iclas.org/harmonization.htm>).

Nombre del investigador	Firma

 <p>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición <b>Salvador Zubirán</b></p>	<p>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN</p> <p>SALVADOR ZUBIRAN</p> <p>Dirección de Investigación</p> <p>FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS</p>
---	---

FECHA DE RECEPCIÓN: 04/03/2013

CLAVE: PAT-901-13/14-1

TÍTULO: ESTUDIO DE LA FUNCION DE LOS MASTOCITOS DURANTE LAS INFECCIONES MICOBACTERIANAS.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Hernandez Pando Rogelio

DEPARTAMENTO O SERVICIO: UNIDAD DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Investigación Experimental

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
--------------	----------

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 01/08/2013 al 31/08/2015

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 0.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		FIRMAS	
Materiales	\$ 0.00		
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Investigador responsable	Jefe de Departamento
Animales	\$ 0.00		Ó
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)		Director de Investigación	Director General
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)		Fecha de resolución	
Publicaciones	\$ 0.00		
costo directos de publicación, sobregiro)			
Suscripciones	\$ 0.00		
(libros, revistas, software, periódicos, etc)			

Varios	\$ 0.00
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Fondo de apoyo	\$ 0.00
15% de la cantidad total del proyecto	
Total :	\$ 0.00



COMITÉ INSTITUCIONAL DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN  
HUMANOS



Instituto Nacional de Ciencias  
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

FORMATO DE  
EVALUACIÓN DE  
PROYECTO DE  
INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH: PAT-901-13/14-1

**1. Título del proyecto**

ESTUDIO DE LA FUNCION DE LOS MASTOCITOS DURANTE LAS INFECCIONES MICOBACTERIANAS.

**2. Investigadores**

**2a. Identificación**

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
BARRIOS PAYAN JORGE ALBERTO		Investigador asociado		
CHACÓN SALINAS ROMMEL		Investigador invitado	(55) 57296300	
HERNANDEZ PANDO ROGELIO	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable		
MARQUINA CASTILLO BRENDA NOEMI	LABORATORISTA A	Investigador asociado		
MATA ESPINOSA DULCE ADRIANA	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador asociado		

**2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto**

**3. Instituciones participantes**

- ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN

**4. Patrocinio**

**4a. Organismos patrocinadores**

**4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.**

**5. Marco teórico**

**ANTECEDENTES:**

Los mastocitos fueron descritos por primera vez en 1877 por Paul Ehrlich, quien los identificó gracias al patrón de tinción metacromático que caracteriza a estas células. Aunque en un principio Ehrlich propuso que los mastocitos participaban en la eliminación de células tumorales, se han descrito una amplia diversidad de funciones para esta población celular, abarcando desde la regulación del proceso de la coagulación hasta su participación en el sistema endocrino. Sin embargo, es claro que estas células también pueden participar en procesos inmunológicos, tal y como lo describió Metchnikoff al describir su capacidad fagocítica (1). Probablemente la función más ampliamente estudiada de los mastocitos es aquella de célula efectora durante el proceso inflamatorio promovido por la hipersensibilidad tipo I (2).

Sin embargo, recientemente se han descrito más funciones inmunológicas, y de hecho se consideran actualmente como un elemento clave en el proceso de la inmunomodulación temprana exacerbando o disminuyendo diversos procesos inflamatorios. Los pocos estudios que han analizado la función de los mastocitos en infecciones micobacterianas se han centrado en la tuberculosis. Uno de los primeros reportes al respecto mostraron que en la primera semana de la infección de cobayos por *M. tuberculosis* (*Mtb*) existe un infiltrado de mastocitos que suele desaparecer con el desarrollo de la infección (3). De hecho, estudios en humanos han demostrado que en casos de linfadenitis causada por tuberculosis hay un incremento en la densidad de mastocitos en el área de los granulomas (4). Recientemente se ha demostrado por experimentos *in vitro* que los mastocitos pueden reconocer al bacilo de la tuberculosis provocando la desgranulación del mastocito, así como inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-6 y TNF- $\alpha$  (5). Inclusive, se ha descrito que los bacilos pueden tener acceso al interior de los mastocitos a través de balsas lipídicas. Por otra parte, estudios *in vivo* señalan que los mastocitos tienen un papel importante en la regulación de la infección por *Mtb*. Por ejemplo, se sabe que ratones deficientes en TLR2 tienen una mayor susceptibilidad a la infección por *Mtb*; sin embargo, si los ratones son reconstituidos previo a la infección con mastocitos derivados de médula ósea (BMMC) de ratones TLR-2<sup>+/+</sup> muestran una mayor resistencia a la infección (6). Por otra parte, en otro estudio se demostró que al activar *in vivo* a mastocitos con el mediador químico C48/80 previo a la infección con *M. tuberculosis* se provoca una regulación del ambiente de citocinas y quimiocinas que desemboca en una disminución del proceso inflamatorio pulmonar y un aumento en la carga bacteriana en relación con ratones que no fueron tratados, implicando de esta manera a los mastocitos como elementos claves en la regulación del proceso inflamatorio provocado por *Mtb* (6). Aunque los aprovechamientos farmacológicos para activar mastocitos pueden proveer información útil, se encuentran limitados por la especificidad de la droga así como en su potencial de activación de las células, que frecuentemente no refleja el grado de activación provocado por los microorganismos estudiados. Es por ello, que actualmente se considera que para definir la función de los mastocitos y sus componentes en un proceso biológico se realizan técnicas diferentes, como lo es el estudio en animales deficientes de mastocitos (cepa KitW/W<sup>v</sup> o cepa KitW-sh/W-sh) y en aquellos en los que se reconstituye esta población celular con BMMC, lo que suele ser conocido como ratones 'mast-cell knock-in'. Este aprovechamiento es considerado actualmente como el más certero para definir y caracterizar las funciones asociadas a mastocitos *in vivo*. El objetivo del presente proyecto es analizar el desarrollo de la infección *in vivo* por micobacterias utilizando como modelo a ratones deficientes de mastocitos KitW-sh/W-sh, así como en ratones deficientes reconstituidos con BMMC.

#### **DEFINICION DE PROBLEMAS :**

Son pocos los estudios que han analizado la función de los mastocitos en infecciones micobacterianas particularmente en la tuberculosis. Uno de los primeros reportes al respecto mostró que en la primera semana de la infección en cobayos por *M. tuberculosis* (*Mtb*) existe un infiltrado de mastocitos que desaparece con el desarrollo de la infección. Estudios en humanos han demostrado que en casos de linfadenitis causada por tuberculosis hay un incremento en la densidad de mastocitos en los granulomas. Recientemente se demostró *in vitro*, que los mastocitos reconocen al bacilo de la tuberculosis provocando su desgranulación, así como la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Por lo que es necesario analizar el desarrollo de la infección *in vivo* por micobacterias utilizando como modelo a ratones deficientes de mastocitos KitW-sh/W-sh, así como en ratones deficientes reconstituidos con BMMC.

#### **JUSTIFICACION :**

La función más ampliamente estudiada de los mastocitos es aquella de célula efectora durante el proceso inflamatorio promovido por la hipersensibilidad tipo I. Recientemente se han descrito más funciones inmunológicas, y de hecho se consideran actualmente como un elemento clave en el proceso de la inmunomodulación temprana exacerbando o disminuyendo diversos procesos inflamatorios

### **6a. Hipótesis**

Las micobacterias activan a los mastocitos los cuales liberan de manera rápida TNF- $\alpha$  pre-formado el cual regula la migración celular necesaria para la contención de la infección.

## **6b. Objetivos.**

Analizar la función de los mastocitos durante la infección por micobacterias in vivo

## **7. Metodología: Diseño general.**

Modelo de infección in vivo Las cepas de ratones a utilizar en el presente trabajo serán C57BL/6 y KitW-sh/W-sh. Un tercer grupo será formado con ratones KitW-sh/Wsh que serán reconstituidos i.v. con BMMC de ratones C57BL/6, como ha sido reportado previamente (7). Cada ratón será infectado con  $2.5 \times 10^6$  CFU a través de la traquea. Los números de bacterias viables e histología con morfometría automatizada en los pulmones será determinado en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post-infección sembrando diferentes diluciones de homogeneizados de los órganos en agar Middlebrook 7H11 y contando la formación de colonias bacterianas después de 21 días. De manera alterna, un pulmón de 3 ratones en dos experimentos por separado serán disgregados en mallas con un poro de  $200 \mu\text{m}$  y los leucocitos serán obtenidos después de una separación en un gradiente de Percoll. Posteriormente las diferentes poblaciones celulares serán teñidas con anticuerpos fluorescentemente marcados y dirigidos contra Gr-1, CD4, CD8, CD11b y CD11c para posteriormente ser adquiridas por citometría de flujo y analizadas con el software FlowJo. Para el análisis la producción in situ de citocinas, se obtendrá el ARN total de los pulmones que serán homogeneizados en Trizol® siguiendo las indicaciones del fabricante y posteriormente el ARN obtenido será purificado con el estuche 'RNeasy RNA clean up' acorde a las instrucciones del fabricante. A continuación se obtendrá cDNA a partir de la retrotranscripción del ARN total usando un estuche de alta capacidad de retrotranscripción de Applied Biosystems. 25 ng de cDNA será sometido a una reacción de PCR en tiempo real usando mezclas de reacción con sondas específicas para  $\beta$ -actina, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Los ciclos de umbral (Ct) para las citocinas serán normalizados con los de  $\beta$ -actina, como lo hemos realizado con anterioridad. Finalmente para evaluar la respuesta T específica, obtendremos células mononucleares a partir del bazo de los ratones infectados y a continuación estimularemos con  $10 \mu\text{g/ml}$  de proteínas obtenidas a partir del sonicated de las micobacterias. La activación de las células T será evaluada por la producción de IFN- $\gamma$ , que será medido por ELISA, y la proliferación de linfocitos T por medio del ensayo de CFSE. Los ratones se compararán directamente de Jackson Laboratories y se infectarán en las instalaciones BSL-3 del bioterio, se albergarán en grupos de 5 animales por microaislador en el sistema de bioseguridad con inyección y filtración continua de aire. Los sacrificios se realizarán en las campanas nivel 3 del mismo cuarto del bioterio, serán por exsanguinación con los ratones anestesiados con pentobarbital sódico por personal altamente calificado y entrenado. La bacteria con la que se infectarán los ratones será la cepa de laboratorio H37Rv. Todos los procedimientos de infección, sacrificio, toma de tejido y eliminación de material contaminante se realizarán con los lineamientos establecidos por el CINVA que han normado la rutina de trabajo desde hace más de 10 años y que han permitido mantener al personal sin ningún accidente hasta el momento. Dichos experimentos se realizarán en un año con 50 ratones por grupo, los grupos serán: el de ratones KitW/W-v y C57/Bl, se sacrificarán 6 ratones por grupo en los tiempos indicados, cuatro pulmones se destinarán para la determinación de unidades formadoras de colonias bacterianas, otros cuatro para histología/morfometría automatizada y cuatro más para la expresión de citocinas.

## **8. Metodología: Criterios de selección**

NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

## **9. Metodología: Desenlaces y variables**

NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

## **10. Riesgos y beneficios del estudio**

**BENEFICIO :** NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

### **RIESGOS:**

**MOLESTIAS GENERADAS :** NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

**COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO :** NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

**EFFECTOS ADVERSOS :** NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

EFFECTOS PSICOLOGICOS : NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

METODOS DE SEGURIDAD : NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

PROCEDIMIENTOS : NO APLICA, EL PROTOCOLO ES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

## 11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Fondo de apoyo	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

## 12. Citas bibliográficas.

Maurer, M., T. Theoharides, R. D. Granstein, S. C. Bischoff, et al. 2003. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol* 12:886---910.

Bischoff, S. C. 2007. Role of mast cells in allergic and non---allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* 7:93---104.

Ratnam, S., B. K. Puri, and S. Chandrasekhar. 1977. Mast cells response during the early phase of tuberculosis : an electron microscopy study *Can J Microbiol* 23: 1245-1251

Taweewisit, M., and U. Pomsuk. 2007. High mast cell density associated with granulomatous formation in tuberculous lymphadenitis. *Southeast Asian J trop Med Public Health* 38: 115-119.

Munoz, S., R. Hernandez---Pando, S. N. Abraham, and A. Enciso. 2003. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediators release and role of CD48. *J Immunol* 170: 5590-5596.

Carlos, D., F. G. Frantz, D. A. Souza-Junior, M. C. Jamur, C. Oliver, S. G. Ramos, V. F. Quesniaux, B. Ryffel, C. L. Silva, et al. 2009. TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 11:770-778.

Limon-Flores, A. Y., R. Chacon---Salinas, G. Ramos, and S. E. Ullrich. 2009. Mast cells mediate the immune suppression mediated by dermal exposure to JP-8 jet fuel. *Toxicol Scie* 112: 144-152.

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**