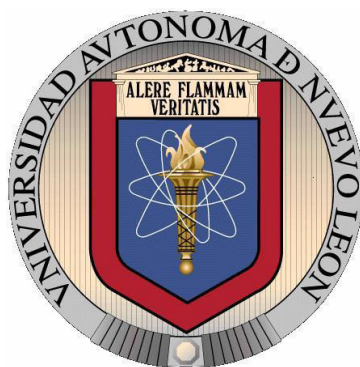


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Caracterización de las vías de señalización asociadas a la activación celular en
macrófagos infectados con *Mycobacterium bovis*

Por:

M.C. UZIEL CASTILLO VELÁZQUEZ.

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
Especialidad en MICROBIOLOGÍA.

Caracterización de las vías de señalización asociadas a la activación celular en
macrófagos infectados con *Mycobacterium bovis*

Comité de Tesis



Dr. Ricardo Gómez Flores
Director



Dra. Patricia Tamez Guerra
Secretaria



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal



Dr. Moisés Franco Molina
Vocal



Dra. Lydia Rivera Morales
Vocal

AGRADECIMIENTOS.

A mi honorable y distinguido jurado: Dr. Ricardo Gómez Flores, Presidente. Dra. Patricia Tamez Guerra, Secretaria, Dr. Edgar Mendoza Gamboa, Vocal. Dr. Moisés Franco Molina, Vocal, Dra. Lydia Rivera Morales, Vocal.

Por sus juiciosos y desinteresados comentarios para mejorar el presente trabajo.

A mi tutor: Ricardo Gómez Flores. Gracias por permitirme lograr una de las muchas metas en mi vida, por demostrarme que uno nunca termina de crecer y que siempre habrá algo que se puede mejorar, por instaurar en mi la capacidad, la confianza y la objetividad para lograr este objetivo, por darme la oportunidad de tomar decisiones y hacerme consiente de las consecuencias que ellas implican, gracias por NO darme la oportunidad de fallar, ya que de eso dependió este éxito, que mas que mío es de un grupo de trabajo que siempre velo por mi buen funcionamiento, gracias más que tutor o asesor fue un amigo incondicional y a veces hasta fungió como padre con sus consejos y regaños.

A la Dra Paty, Gracias Doctora sin usted no habría logrado nada, gracias por sus animos y su ayuda incondicional, por ser un ejemplo, puedo decir que jamas había conocido a un investigador tan entregado y tan generoso con su conocimiento, que me siento dichoso de haber coincidido ese momento de espacio-tiempo con usted, a veces era difícl diferenciarla entre madre o tutora dado que siempre nos llamaba la atención con tanta gentileza que era difícl entender si era regaño o halago. Gracias Dra, ahora si sè que tipo de investigador quiero ser y sobre todo el tipo de investigador que este país necesita, gente entregada, responsable, humilde, gentil y sobre todo profesional, gracias por ser el tipo de persona que quiero ser y sobre todo por demostrarme que si se puede.

A mis amigos del Laboratorio, a los culaes no cito por nombre, ya que seria una isnulto omitir a algúno, sin embargo agradezco a todos los cuales pertenecen a un grupo de trabajo que siempre tuvo el tiempo y la disponibilidad para compartir sus conocimientos, su amistad y sobre todo su calidad humana, grupo al cual me siento completamente orgulloso de pertenecer, gracias por hacerme sentir como de la familia.

Al Dr. Juan José Zarate Ramos, quien me tuvo confianza y más que una oportunidad me brindó su amistad y apoyo incondicional, gracias Dr, el compromiso es perpetuo y la satisfacción de saberme parte de su grupo de trabajo es mi mayor motivo para seguirme esforzando y entender que el trabajo en equipo es la piedra angular de cualquier meta que se desee alcanzar.

Al Dr, Rogelio Ledezma Torres, por su apoyo en lo académico, en lo personal y en lo económico, gracias por apoyarme con su proyecto para poder realizar el mío, agradezco la confianza pero sobre todo su desinteresado interés en mi formación.

Al Dr: José Luis Lazcano Villarreal, Gracias Doc. por siempre ver por mi bienestar, por apoyarme ante todos, por siempre buscarme las mejores oportunidades de desarrollo dentro y fuera de lo académico, gracias porque siempre me ha hecho sentir como un hijo y sobre todo por su confianza, apoyo, dirección y todos y cada uno de los consejos que amablemente me comparte. No tengo como pagar tantas consideraciones.

Gracias, sobre todo por darme el apoyo que más de un jefe ha sido de un padre.

Al Dr. Héctor Fimbres Durazo. Por apoyarme en lo económico y por hacerme parte del equipo, por su dirección, su amistad y por la confianza en mi proyecto, ya que si no fuera por él no hubiera podido realizar algunos de los experimentos en mi investigación. Gracias Dr. Fimbres.

DEDICATORIA

A Dios.

Principalmente a el.

A mis madre:

Rosalía Castillo (Q.E.P.D.)

Quien siempre velò por mí y me diò lo mejor que un hijo puede tener que es amor y apoyo incondicional, así como por impulsarme todos los días a superarme y mantener una competencia eterna conmigo mismo, esto es especialmente para usted, mi viejita linda, aliciente de todo lo que he hecho en la vida. Se que desde donde quiera que este celebra este triunfo, que mas que mio es suyo.

A mis hermanos:

Uriel, Adriana y Juana Elideth.

A mis Sobrinos:

Manelick, Esteban y principalmente a Gahel y a Memitto

A ustedes por ser los motores que cada día me impulsan a superarme y hacerme ver que cualquier mal día es superado y olvidado por una miradita que de ustedes venga.

A Arai:

Gracias a ti, por que al buscarte me encontré yo mismo

Por demostrarme que la humildad es la llave maestra que abre cualquier puerta y por siempre ver en mi a un amigo, y recordarme que ante ti solo soy eso “tu tejon”

Te Amo Flaca.

TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN.	Página.
AGRADECMIENTOS.....	III
DECICATORIA.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1.- INTRODUCCIÓN.....	13
2.- HIPÓTESIS.....	14
3.- OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivos particulares.....	15
4.- ANTECEDENTES.....	17
4.1. Revisión de literatura.....	17
4.1.1 Agente etiológico.....	19
4.2. Patogenia de la infección.....	21
4.3. Interacción de M. bovis con el sistema inmune del hospedero.....	23
4.4. Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública y situación actual.....	26
4.5. Diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	26
4.5.1. Evaluación de la respuesta inmune celular.....	27
4.5.1.1. Prueba de hipersensibilidad retardada.....	27
4.5.1.2. Prueba de interferón gamma (IFN- γ).....	30
4.5.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	32
4.5.2.1. Prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA).....	32
4.5.3. Identificación del agente.....	34
4.5.3.1. Inspección sanitaria e histopatología.....	35
4.5.3.2. Aislamiento bacteriano.....	35
4.5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
4.6. Respuesta inmune contra Mycobacterium bovis.....	38

4.6.1. Respuesta inmune innata.....	38
4.6.2. Respuesta inmune adquirida.	39
4.7. Tipos de activación celular de los macrófagos.....	42
4.7.1. Activación clásica del macrófago.....	42
4.7.2. Activación alterna del macrófago.....	43
4.8. Resistencia natural del ganado a patógenos intracelulares.....	45
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
5.1. Tamaño de muestra.....	49
5.2. Cepas bacterianas	50
5.2.1. Mycobacterium bovis BCG.....	50
5.2.2. Mycobcaterium bovis 9926	50
5.2.3. Preparación de inóculos.....	51
5.2.3.1. Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC`s).....	51
5.3. Obtención de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de donadores bovinos.....	52
5.3.1. Desarrollo de ensayo bactericida.	54
5.3.2. Clasificación fenotípica de los animales en respuesta al crecimiento intracelular de M. bovis BCG y evaluación del crecimiento intracelular de M. bovis 9926.....	56
5.3.3. Infección de macrófagos.	57
5.3.3.1. Infección para la extracción de ARN Total para medición de transcritos asociados a la respuesta inmune contra M. bovis y obtención de sobrenadante para la detección de óxido nítrico (ON) y arginasa.....	57
5.3.3.2. Infección para la realización de ensayo bactericida y evaluación del crecimiento intracelular de M. bovis	57
5.4. Tratamientos.....	58
5.5. Extracción de ARN Total.....	58
5.5.1. Síntesis de ADN complementario.....	59
5.5.2. Cuantificación de ARNm de citocinas por Reacción en	

Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (QPCR-RT).....	59
5.5.3. Método de cuantificación.....	60
5.6. Análisis estadístico.	61
6. RESULTADOS.....	62
6.1. Cinética de crecimiento de <i>M. bovis</i>	62
6.2. Macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de donadores bovinos.....	63
6.2.1. Identificación de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a parásitos bacterianos intracelulares.....	63
6.2.2. Crecimiento intracelular de <i>M. bovis</i> patógenos en macrófagos derivados de bovinos resistentes y susceptibles a parásitos bacterianos intracelulares.....	64
6.2.3. Inducción “in vitro” de la activación clásica de los macrófagos.	67
6.2.4. Inducción “in vitro” de la activación alternativa de los macrófagos.....	68
6.3. Producción de óxido nítrico.	68
6.5. Índice de fagocitosis de <i>M. bovis</i> en macrófagos bovinos procedentes de bovinos resistentes y susceptibles activados por las diferentes vías de activación celular.....	72
6.6. Índice de supervivencia intracelular de <i>M. bovis</i> en macrófagos bovinos procedentes de bovinos resistentes y susceptibles activados por las diferentes vías de activación celular.....	73
6.7. Expresión de transcritos asociados a la respuesta inmune innata contra <i>M. bovis</i>	74
7. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	81
8. CONCLUSIONES.....	93
9. APÉNDICES.....	95
10. LITERATURA CITADA.....	100
11. RESUMEN BIOGRAFICO.....	114

LISTA DE CUADROS.

TABLA	pagina
I. Sensibilidad y especificidad de las pruebas intradérmicas realizadas en el ganado bovino.....	28
II. Distribución de los granulomas detectados en los bovinos infectados con Tuberculosis bovina.....	34
III. Características bioquímicas de especies del complejo M. tuberculosis.....	36
IV. Características de macrófagos, linfocitos T y respuesta a anticuerpos en ganado naturalmente resistente y susceptible a patógenos intracelulares.....	46
V. Tabla de iniciadores.	60
VI. Expresión de citocinas y quimocinas expresados en Unidades Relativas de Expresión (URE) de animales resistentes y susceptibles y activados por las diferentes vías de activación celular y desafiados con M. bovis MOI 10:1	76
VII. Preparación de solución de Percoll de trabajo.....	95
VIII. Tabla de Excel para calcular índice de fagocitosis y supervivencia intracelular	98

LISTA DE FIGURAS.

FIGURA	pagina
1. Escenario evolutivo del complejo <i>M. tuberculosis</i>	20
1 Diagrama que muestra los posibles resultados después de la exposición del ganado a <i>M. bovis</i>	23
2 Interacción de <i>M. bovis</i> con el sistema inmune del hospedero.	23
3 Representación del espectro de la respuesta inmune del bovino después de la infección por <i>M. bovis</i>	25
4 Influencia de la prueba cervical comparativa y la prueba caudal en la prueba de IFN- γ en animales infectados naturalmente con <i>M. bovis</i>	32
6 Cinética de crecimiento de <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. bovis</i> 9926.	63
7 Porcentaje de crecimiento intracelular de <i>M. bovis</i> BCG en macrófagos bovinos a las 24 h PI.	65
8 Evaluación del crecimiento intracelular diferencial de <i>M. bovis</i> 9926 en macrófagos de bovinos.	66
9 Comparación del crecimiento intracelular diferencial de <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. bovis</i> 9926 en macrófagos de bovinos a las 24 h PI.	67
10 Efectos de estimulación de macrófagos derivados de monocitos de bovino con IFN- γ + LPS.	68
11 Producción de Óxido Nítrico de macrófagos resistente y susceptibles bajo los diferentes activadores celulares.	70
12 Índice de Fagocitosis.	72
13 Índice de supervivencia Intracelular.	75
14. Expresión diferencial de la óxido nítrico sintaza inducible (iNOS II) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de <i>M. bovis</i>	77
15. Expresión diferencial de la Interleucina 1 beta (IL-1β) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de <i>M. bovis</i>	77
16. Expresión diferencial de la enzima Arginasa II (ARG II) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de <i>M. bovis</i>	79
17. Expresión diferencial del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de <i>M. bovis</i>	78
18. Expresión diferencial del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-β) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de <i>M. bovis</i>	79
19. Expresión diferencial de la Proteína Inflamatoria del Macrófago 3 (MIP-3) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de <i>M. bovis</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ADNc	ADN complementario
RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Rpm	Revoluciones por minuto
X g	Gravedades
Min	Minuto
S	Segundo
ml	Mililitro
l	Microlitro
g	Gramo
g/l	Gramos por litro
m	Metro
ng	Nanogramo
Mm	Milimolar
pM	Picomolar
DEPC	Diethylenepyrocarbonate
Agua MQ	Agua obtenida por el sistema de purificación Milli-Q
bp	Pares de bases
Car	Carbenicilina
DTT	Dithiothreitol
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
GAS	Medio de cultivo Sales-alanina-glicerol
HRP	Peroxidasa de rábano picante
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético

RESUMEN

Se sabe que los macrófagos de animales resistentes poseen una fuerte respuesta inmune contra la tuberculosis bovina lo que conlleva a un mejor control de la infección micobacteriana. En el presente estudio, se evaluó la actividad fagocítica de los macrófagos, la supervivencia intracelular bacteriana y la expresión de citocinas inducida por el tipo de activación celular clásica y alterna contra *Mycobacterium bovis* en bovinos resistentes y susceptibles a parásitos bacterianos intracelulares. La importancia de la tuberculosis bovina está en las pérdidas económicas a la ganadería, el riesgo para la salud pública y su papel como una barrera no arancelaria a la exportación de ganado. Aunque los métodos de alimentación y cría de los animales influyen en la variabilidad en la expresión de la enfermedad se ha observado que la resistencia natural es hereditaria y se puede transmitir de un progenitor a su descendencia, por lo tanto, es importante para generar información, como este fenotipo de resistencia natural puede ser modificado por el efecto de la activación celular del macrófagos o la relación entre el fenotipo de resistencia y la activación de la presentación clásica o alternativa por los macrófagos. Los animales fueron clasificados como resistentes o susceptibles basado en la capacidad de sus macrófagos para permitir el crecimiento de *M. bovis* (BCG); los animales resistentes permitieron menos del 65% del crecimiento bacteriano. Macrófagos derivados de sangre periférica de animales resistentes y susceptibles se activaron por la vía clásica (LPS + IFN- γ) y alternativa (IL-4) y fueron desafiados con la cepa de *M. bovis* BCG y *M. bovis* cepa patógena 9926, a una multiplicidad de infección de 10:1 (bacterias/macrófagos). Animales resistentes presentaron un mayor índice de fagocitosis y un mejor control microbiano después de ser estimulados por la vía clásica, siendo esta respuesta mayor para la cepa 9926 que para BCG; además, la respuesta de los macrófagos activados por la vía clásica fue mayor que en comparación con la vía de activación alternativa para ambos tipos de cepas. Además, macrófagos activados de forma clásica expresaron mayores niveles de iNOS, además de los marcadores pro-inflamatorias, IL-1 β , TNF- α , MIP-1 y MIP-3, y ARGII 1; y el anti-inflamatorio TGF- β , particularmente con la cepa BCG. Sin embargo, la estimulación con la rbIL-4 mostró una reducida expresión en estos mismos marcadores. Estos resultados sugieren que el tipo de la activación celular modifica la respuesta de macrófagos hacia las micobacterias, siendo este efecto más evidente en los macrófagos de animales resistentes, quienes muestran una mejor capacidad para controlar la infección micobacteriana.

ABSTRACT

It is known that macrophages from resistant animals possess a strong immune response against bovine tuberculosis. In the present study, the macrophage phagocytic activity, intracellular bacterial survival, and cytokine expression induced by classical and alternative activators against *Mycobacterium bovis* in resistant and susceptible bovines was evaluated. The importance of bovine tuberculosis lies in economic losses to livestock, the risk to public health and its role as a non-tariff barrier to the export of livestock. Although methods of feeding and management of animals influence the variability in disease expression has been observed that natural resistance is hereditary and can be passed from a parent to its offspring, therefore, it is important to generate information as this natural resistance phenotype could be modified by the effect of the macrophage cell activation or the relationship between the resistance phenotype and activation presenting either classical or alternative by macrophages. Animals were classified as resistant or susceptible based on the ability of their macrophages to allow *M. bovis* (BCG) growth; resistant and susceptible animals allow less than 65% or more than 65% bacterial growth, respectively. Peripheral blood cell macrophages from resistant and susceptible animals were activated by classical (LPS + IFN- γ) and alternative (IL-4) stimuli and challenged with non-pathogenic *M. bovis* BCG strain and pathogenic 9926 strain at a ratio bacteria to macrophage of 10:1. Resistant animals showed the highest phagocytosis index and microbial control after classical and alternative stimuli, being this response higher for the strain 9926 than for BCG; in addition, the response of macrophages activated by the classical pathway was higher than that under the alternative activation for both types of strains. Furthermore, classical pathway-activated macrophages derived from resistant animals expressed higher levels of the pro-inflammatory markers iNOS, IL-1 β , TNF- α , MIP-1 and MIP-3, and the anti-inflammatory markers ARGII and TGF- β , particularly to BCG. However, rbIL-4 activation reduced their expression. All together results suggest that the type of cellular activation modifies macrophage response to mycobacteria, being such an effect more evident in macrophages from resistant animals which showed a better ability to control mycobacterial infection.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis humana es la principal causa de enfermedad y muerte en el mundo, especialmente en Asia y África. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por su sigla en inglés) en el 2006 hubo 9.2 millones de casos nuevos, y 1.7 muertes por tuberculosis. Esta enfermedad es causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en éste grupo se encuentra *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), el agente causante de la tuberculosis bovina, el cual tiene un espectro de hospederos muy amplio, dentro de los que se encuentran los primates, incluido el humano, animales domésticos y de vida silvestre (Morris et al., 1994).

La tuberculosis bovina es una enfermedad transmisible y crónica, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas (Thoen and Barletta, 2006). Esta es una de las enfermedades más importantes en la industria pecuaria al ocasionar graves pérdidas económicas, y representar una barrera para la comercialización del ganado y sus subproductos; además de constituir una amenaza para la salud humana (López-Marín et al., 2006).

La prevalencia de tuberculosis en humanos causada por *M. bovis* muestra una considerable variación regional dependiendo de la presencia y extensión de la enfermedad en el ganado, la situación económica, social y la aplicación de medidas preventivas por lo que la información disponible es muy variable. En general, se considera que la incidencia de la infección en humanos es mucho mayor en áreas rurales con hatos infectados (Moda et al., 1996). La infección en los humanos puede ocurrir por inhalación de aerosoles o a través del consumo de leche no pasteurizada. Considerándose un riesgo ocupacional en veterinarios, granjeros y trabajadores de rastros. La transmisión entre personas es posible dependiendo del estatus inmunológico del individuo (Biet et al., 2005; Milián et al., 2010).

La tuberculosis bovina sigue manifestándose como un problema en el ganado a pesar del establecimiento de programas de control de la enfermedad. Los factores más importantes son económicos, sociales y culturales que evitan que se lleven a cabo eficientemente los programas de control, aunado a las limitaciones en la sensibilidad y 2 especificidad del derivado proteico purificado (PPD, por sus sigla en inglés) y la incapacidad de detectar

todos los animales infectados con *M. bovis* lo que contribuye significativamente a la persistencia de la enfermedad (Gormley et al., 2006). El PPD actualmente utilizado contiene una mezcla de proteínas pobremente definida, muchas de las cuales se encuentran presentes en micobacterias ambientales, por lo que en algunos casos no permite una diferenciación entre animales infectados con *M. bovis* y animales sensibilizados por micobacterias ambientales, lo que representa un serio problema en lugares donde es común la co-infección con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Van Pinxteren et al., 2000).

Es por esto que se ha propuesto el uso de pruebas alternativas o complementarias para confirmar o negar los resultados de la prueba intradérmica, como la prueba de interferón gamma (IFN- γ); sin embargo, debido a su alto costo, comparado con la prueba de la tuberculina, y la necesidad de personal y equipo especializado es difícil su aplicabilidad (Whelan et al., 2003).

Estudios *in vitro* han demostrado que los antígenos micobacterianos ESAT-6 y CFP-10 dan mejores resultados que el PPD al utilizarlos en una prueba de detección de IFN- γ en bovinos infectados y libres de la enfermedad. Estos resultados indican que el uso del cóctel proteico incrementa la especificidad de la prueba sin afectar su sensibilidad, por lo que su uso podría ser de gran valor en las pruebas diagnósticas de rutina en el ganado (Aagaard et al., 2006). El uso de estos antígenos permite diferenciar animales infectados por *M. bovis* o sensibilizados por la exposición a micobacterias ambientales, así como entre animales infectados por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Además la vacunación con *M. bovis* BCG no induce una respuesta hacia estos antígenos, favoreciendo de esta forma la vacunación en el ganado (Buddle et al., 1999).

2. HIPÓTESIS:

Habrá diferencias en el mecanismo de acci3n, dadas por las diferentes vías de activaci3n celular y cambios en el patr3n de expresi3n de citocinas y quimiocinas por parte de los macr3fagos derivados de donadores resistentes y susceptibles a pat3genos bacterianos intracelulares como *Mycobacterium bovis*.

3. OBJETIVOS:

3.1. **Objetivo general:**

Identificar el mecanismo de acción y las vías de activación celular en el control de la infección por parte de los macrófagos activados de forma alterna y clásica en animales susceptibles y resistentes, antes y después de la infección por *Mycobacterium bovis*.

3.2. **Objetivos específicos:**

- Identificar bovinos resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.
- Mensurar el nivel de crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* BCG y *M. bovis* patógeno en macrófagos de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos
- Estandarizar los métodos de activación in vitro por medio de IL-4 para activación alterna y LPS+IFN- γ para activación clásica.
- Identificar el índice de fagocitosis y supervivencia intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos procedentes de donadores resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares, activados por las diferentes vías de activación celular y desafiados con *M. bovis*
- Evaluar el efecto de la virulencia de *Mycobacterium bovis* en la expresión de citocinas y quimiocinas a nivel de ARNm en macrófagos procedentes de individuos resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares activados por la vía clásica y la vía alterna.

4. ANTECEDENTES

La tuberculosis, antigua plaga de la humanidad, hoy en día es causa de infección de un tercio de la población mundial. Cerca de un 5% de los seres humanos recién infectados en un lapso de 5 años desarrollará la enfermedad en forma clínica. Sus estragos se resumen en alrededor de 8 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes anuales. A lo anterior debemos adicionar la pandemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA); enfermedad que diezma el sistema inmunológico de los infectados generando condiciones para la reactivación de la infección o mayor susceptibilidad al ingreso del agente etiológico (Rook and Hernandez-Pando, 1996; Glickman and Jacobs Jr, 2001).

Las primeras descripciones de la enfermedad son referidas por Hipócrates (460-377 a. C.), Lebert denominó “Corpúsculo tuberculoso” a la lesión característica de la enfermedad. El desarrollo de nuevas teorías sobre el origen de las enfermedades estableció como posible causa un agente microbiano. Klencke en 1843 observó lesiones en hígado y pulmón tras las primeras inoculaciones de material tuberculoso en conejos. El trabajo más esclarecedor sobre el origen de la enfermedad fue sin duda el de Villemin en 1865, quien inoculó material purulento procedente de lesiones tuberculosas humano, pus no tuberculosa y pus tuberculosa de bovino. Confirmó así la teoría específica de la enfermedad y estableció una aparente identidad de la tuberculosis bovina y humana. El mejor aporte metodológico fue hecho por Conheim al inocular material infeccioso en la cámara anterior del ojo de conejos, lo que facilitó observar la progresión de las lesiones. No fue hasta 1882 cuando fue aislado en forma pura el bacilo tuberculoso humano por el alemán Robert Koch, siguiendo la metodología sugerida por Henle para confirmar el origen infeccioso de una enfermedad. La aparente identidad etiológica en todas las formas de tuberculosis en diversas especies animales y humana cayó en controversia, basada esta en las observaciones de las características de los cultivos, virulencia y transmisibilidad del bacilo entre especies animales. Ya desde 1863, Virchow promulgaba que no eran enteramente iguales la tuberculosis bovina y humana, concepto contrario a lo expresado por Koch en 1882, subsecuentes ensayos hechos por Chauveau, Gunther, Harms y Bollinger no fueron capaces de producir la enfermedad en bovinos, cerdos y cabras alimentados con material tuberculoso humano, pero sí con leche y pulmones

contaminados con bacilo bovino. Baungarten (1893) cuestionó la completa identidad de la enfermedad en bovinos y humanos; años después tras una serie de experimentos se postuló que el bacilo de origen humano tiene menor capacidad para establecer la infección en el bovino, y por el contrario, el bacilo bovino tiene mayor virulencia en esta especie animal. En 1904, tras debates científicos se comenzó a declinar sobre las enseñanzas de Koch en relación a la transmisibilidad del bacilo bovino al humano, concluyéndose que algunas formas de tuberculosis humana especialmente en niños, eran debidas a la introducción del bacilo de la tuberculosis bovina a través de la ingestión de leche contaminada. Estas conclusiones están acordes a lo expresado por los Doctores Schroeder y Cotton en “The bolletin of the Bureau of Animal Industry of the United States Departament of Agriculture”, donde afirmaban que: “una vaca tuberculosa constituye un elemento de más peligro para la salud humana comunitaria que un humano tuberculoso” (Schoeder and Cotton, 1907).

La tuberculosis bovina, enfermedad infecto-transmisible, con tendencia a la cronicidad, causada principalmente por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) miembro del complejo tuberculosis y al igual que en el humano se caracteriza por el desarrollo de lesiones denominadas granulomas (Neill et al., 2001; Pollock et al., 2001; Aldwell et al., 2001; Domenech et al., 2002; Brosch et al., 2001, 2002; Gordon et al., 2001; Collins, 2001; Mostowy et al., 2000). La ruta principal de infección en el ganado es la vía respiratoria; la mayoría de las lesiones tuberculosas en animales enfermos se encuentran en tejidos que conforman o se asocian al aparato respiratorio. La vía aerógena no es la única forma de ingreso del *Mycobacterium*, a través del tracto digestivo es posible que se inicie la infección, sin embargo, la dosis infectiva requerida es mucho mayor en comparación con la vía aerógena, en la cual la infección puede ser establecida por un solo bacilo (Mellroy et al., 1986; Neill et al., 1988, 19991, 2001; Cassidy et al., 1999a,b). El tamaño del inoculo que ingresa al animal tiene una relación inversa al periodo de inicio de excreción del bacilo por el animal infectado, dicha excreción se inicia en promedio 12 a 14 semanas postinfección (Cassidy et al., 1999; Costello et al., 1998). La transmisión de la enfermedad en el hato depende de una serie factores asociados a las condiciones ambientales que enfrenta la bacteria, la resistencia o susceptibilidad del hospedero y la virulencia de la bacteria. Ambientes húmedos, templados y protegidos de los rayos

solares beneficia la supervivencia de la bacteria por largos periodos conservando su capacidad infecciosa (Goodchild and Clifton-Hadley, 2001).

La bacteria contenida en gotas pequeñas de moco fluido expectoradas por un animal infectado, induce una reacción inflamatoria en el tejido pulmonar que genera la acumulación de neutrófilos en primera instancia, los cuales son remplazados por macrófagos que intentan capturar y eliminar el bacilo (Cassidy et al., 1999; Phillips et al., 2003; Cassidy et al., 1998). Cuando esta última célula no logra destruir a la bacteria, se convierte en la célula hospedera del *Mycobacterium*. Sin embargo, esta célula puede variar su comportamiento contra la bacteria por influencia de varios factores, entre ellos la resistencia natural a la enfermedad (Cassidy et al., 1999; Pollock and Neill, 2002). Esta capacidad provee al individuo que la posee una mayor posibilidad de controlar una infección, y por lo tanto ser resistente y sobrevivir a la enfermedad. La capacidad de resistencia a una enfermedad puede ser transmitida a su descendencia, la heredabilidad de esta condición provoca que en las siguientes generaciones de individuos, la proporción de resistentes sea mayor que en un principio, cuando la población está sometida a una presión de selección por la enfermedad (Bellamy, 2003). En este sentido se ha descrito la participación del gen de la proteína 1 del macrófago asociada a resistencia natural o por sus siglas en inglés “Natural resistance-associated macrophage protein-1” (Nramp1) (*Bcg/Ity/Lsh* locus, *Slc11a1*) en el control temprano de la infección por microorganismos intracelulares no relacionados, dentro de los cuales se encuentran los géneros *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium* y *Leishmania* (Govoni et al., 1996; Gruenheid et al., 1997; Hackam et al., 1998; Xu et al., 1997; Brown et al., 1997).

4.1. Agente etiológico

El complejo *M. tuberculosis* consiste de siete especies y subespecies que incluyen *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*, los cuales se caracterizan por tener el 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y una secuencia idéntica de ARNr 16S (Ernst et al., 2007).

M. bovis, es un bacilo ácido alcohol resistente, alargado de aproximadamente 1- 4µm, de lento crecimiento (intervalo generacional de 16 a 20 horas), aerobio y de vida intracelular (Thoen and Barletta, 2006). La teoría tradicional del origen de la tuberculosis menciona que es una antropozoonosis; se sugería que *M. tuberculosis* había surgido de *M. bovis* durante la domesticación del ganado hace unos 10-15,000 años aproximadamente, cuando el bacilo de la tuberculosis bovina se pudo haber transmitido a la población humana (Hewinson et al., 2006). Sin embargo, los análisis genómicos indican un escenario diferente. La pérdida de genes en el genoma de *M. bovis* sugiere que *M. canetti* es el antecesor común de las especies del complejo *M. tuberculosis*, las pérdidas sucesivas de regiones de ADN, empezando por la pérdida de la región RD9 originó a *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*. Las cepas modernas de *M. tuberculosis* se originaron del antecesor común por la pérdida del locus TbD1 (Figura 1) (Mostowy and Behr, 2005).

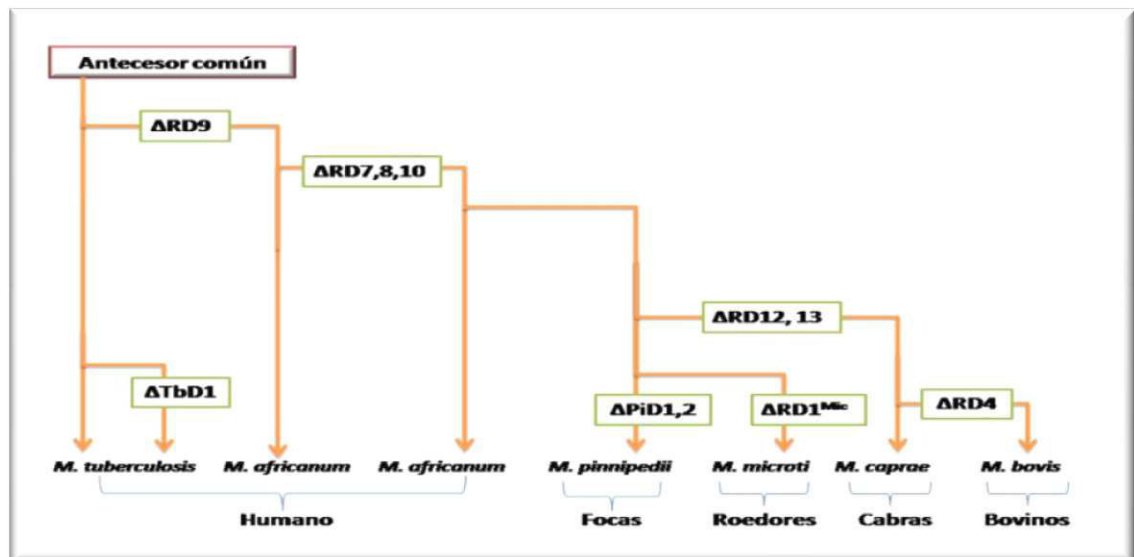


Figura 1. Escenario evolutivo del complejo *M. tuberculosis*. La identificación de distintas deleciones en el genoma funciona como un marcador único para cada cepa (Tomado y modificado de Hewinson et. al., 2006).

4.2. Patogenia de la Infección

La infección en el bovino puede ser adquirida por diferentes vías. Sin embargo, la edad, comportamiento de los animales, el medio ambiente y las prácticas en las explotaciones tienen una influencia significativa en la forma en que la bacteria se pone en contacto con su hospedero (Neill et al., 1994). La ruta principal de infección es la vía respiratoria por lo que la distribución de las lesiones y la patología se observa predominantemente en el tracto respiratorio, y en los linfonodos asociados (Cassidy et al., 1999).

La transmisión de la enfermedad dentro del hato depende de una serie de factores asociados a las condiciones ambientales que enfrenta la bacteria, la resistencia o susceptibilidad del hospedero y su virulencia. Ambientes húmedos, templados y protegidos de los rayos solares, benefician la sobrevivencia de la bacteria por largos períodos de tiempo conservando su capacidad infecciosa (Morris et al., 1994). Estudios en bovinos infectados experimentalmente muestran que es posible detectar de forma intermitente al bacilo en el exudado nasal después del establecimiento de la infección. El inicio y duración del período de excreción depende de la dosis infectante. No obstante, los bacilos también son eliminados por heces, orina y leche (Neill et al., 1994; Phillips et al., 2003).

Una vez que el bacilo ha ingresado a las vías respiratorias bajas, es fagocitado por los macrófagos alveolares; estos pasan a través de la pared de los bronquiolos, entran a la circulación y son llevados a los linfonodos, donde subsecuentemente interactúan con las células ahí almacenadas (Pollock and Neill, 2002). Diversos estudios han demostrado que *M. bovis* ha desarrollado diversas estrategias para asegurar su entrada dentro de los macrófagos, engañar y evadir la respuesta inmune durante y después de su entrada al fagocito, y modular la función efectora de la respuesta inmune celular (Thoen and Barletta, 2006; Trejo-Márquez et al., 2003). Esta interacción induce una respuesta pro-inflamatoria localizada, conduciendo a la producción de quimiocinas y citocinas que amplifican el reclutamiento celular dando lugar a una masa celular conocida como granuloma (Pieterse, 2008). Esta estructura está compuesta por un centro de macrófagos infectados rodeados por células gigantes vacuoladas o macrófagos espumosos, la capa

más externa de la estructura es delineada por linfocitos, y puede estar rodeada de colágeno y otros componentes de matriz celular (Russell, 2007).

En un estudio de bovinos infectados experimentalmente, las lesiones microscópicas pudieron ser observadas 7 días post-infección; sin embargo, las lesiones más grandes no pudieron ser observadas hasta los 14 días post-infección (Cassidy et al., 1998). Si los mecanismos de defensa del individuo se encuentran en condiciones adecuadas, limitan al mínimo el desarrollo de la bacteria dentro del granuloma, pero estas pueden permanecer viables durante toda la vida del individuo. Por lo que si el estatus inmunológico del hospedero se debilita, el granuloma se convierte en la fuente para la diseminación sistémica de las bacterias (Russell, 2007).

Pollock y Neill (2002) refieren que una vez que el bovino se ha expuesto a *M. bovis* existen cuatro posibles escenarios, que son necesarios considerar en el diagnóstico de la enfermedad (Figura 2)

- 1) El bovino tiene la capacidad de resistir el desafío de la exposición a través de su respuesta inmune innata por lo que estos animales pueden resultar negativos a las pruebas diagnósticas y permanecer libres de la infección.
- 2) El bovino a pesar de resistir el desafío desarrolla cambios patológicos, que pueden ser evidentes en la inspección post-mortem y presentan respuestas positivas a las pruebas diagnósticas.
- 3) El bovino después de la exposición a *M. bovis* es infectado y desarrolla la enfermedad, puede presentar respuestas positivas a las pruebas diagnósticas; sin embargo, conforme la enfermedad progresa puede llegar a ser anérgico.
- 4) El bovino después de la exposición e infección desarrolla una respuesta inmune eficaz, los cambios patológicos pueden ser menores, por lo que en la inspección post-mortem puede no haber evidencia de la infección. A estos animales se les conoce como reactores sin lesiones evidentes en la inspección post-mortem.

4.3. Interacción de *M. bovis* con el sistema inmune del hospedero

El papel del macrófago en la tuberculosis es una enigmática dicotomía. Por un lado es el célula huésped de la micobacteria; y por el otro, es la célula efectora para el control y destrucción de dicho patógeno (Cassidy et al., 1998). Esta célula es capaz de inhibir el desarrollo del bacilo mediante la fagocitosis y de participar ampliamente en la inmunidad celular, en el proceso de presentación de antígeno y el reclutamiento de linfocitos T (Flynn and Chan, 2003).

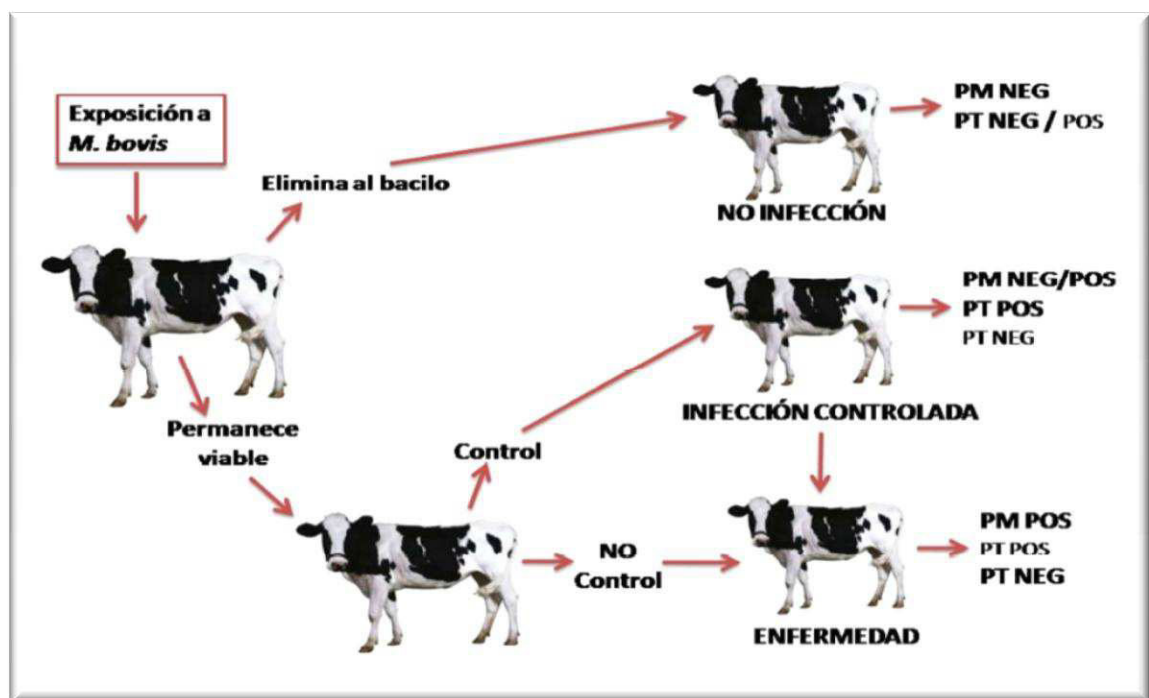


Figura 2. Diagrama que muestra los posibles resultados después de la exposición del ganado a *M. bovis* (PM: Inspección post-mortem; PT: prueba de la tuberculina) (Tomado y modificado de Pollock and Neill, 2002).

El reconocimiento de la micobacteria por el macrófago puede llevarse a cabo por diversos receptores, como los receptores para Fc, receptores de complemento CR1, CR3, CR4, receptores de manosa, receptores scavenger y otras moléculas receptoras de superficie celular (Herrera et al., 2005). Después del reconocimiento de la micobacterias por las células fagocíticas se lleva a cabo la activación celular y la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, como IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18, TNF- α ,

RANTES, MCP-1, MIP-1 β e IL-18. De la misma forma se producen citocinas anti-inflamatorias, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β que en conjunto coordinan la respuesta inflamatoria (Figura 3) (Berrington and Hawn, 2007).

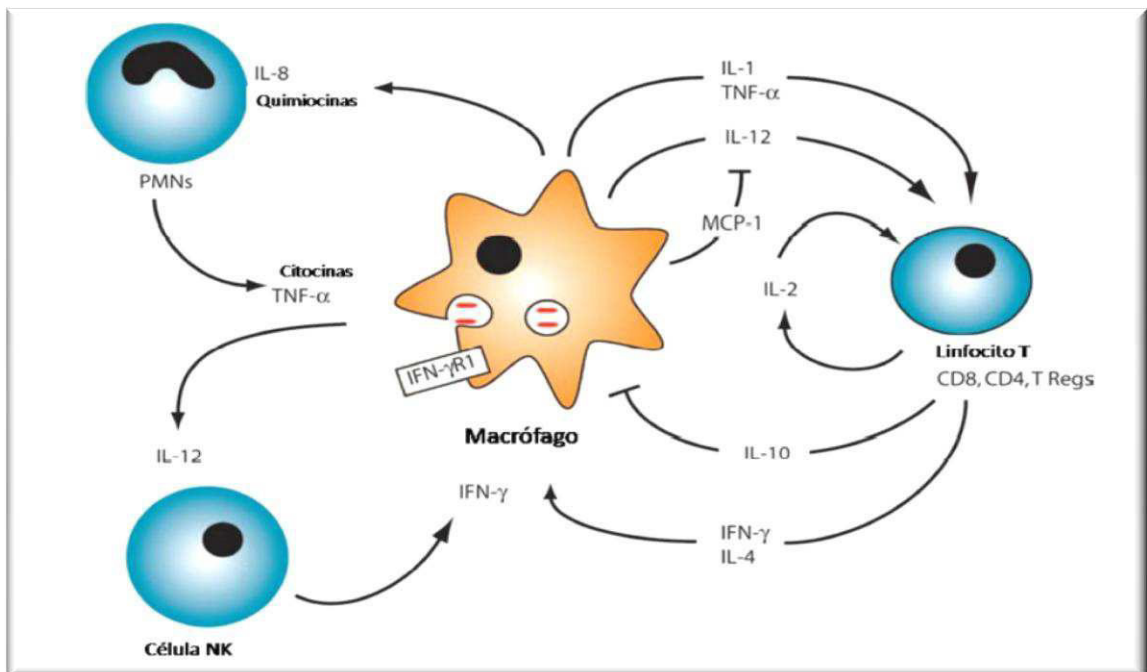


Figura 3. Interacción de *M. bovis* con el sistema inmune del hospedero. Después de la infección los macrófagos se activan y secretan citocinas y quimiocinas, para atraer al sitio de infección macrófagos, linfocitos T, células NK, los cuales producen IFN- γ , y junto con otras citocinas activa a los macrófagos y así controlan la infección (Tomado y modificado de Berrington and Hawn, 2007).

La respuesta inmunológica específica hacia *M. bovis* se inicia con la participación de los linfocitos T (α/β CD4+ y CD8+ y δ/γ) siendo el principal efector el linfocito T CD4+, involucrado en el reconocimiento de antígenos que son procesados en el fagosoma y presentados como pequeños fragmentos peptídicos anclados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II en la superficie celular de las células

presentadoras de antígenos. Por otra parte, los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos que han sido procesados en el citosol y que son presentados por moléculas MCH I. La respuesta inmune celular es tanto el mecanismo de defensa y la causa de la formación de granulomas observados en las infecciones por *M. bovis* (Gormley et al., 2006). Además, la respuesta inmune celular predominante cambia hacia una respuesta inmune humoral conforme la enfermedad progresa, provocando un fenómeno conocido como anergia, en el cual los animales no reaccionan a las pruebas diagnósticas actualmente usadas, representando un riesgo de infección para los otros animales (Figura 2-4) (Wood and Rothel, 1994).

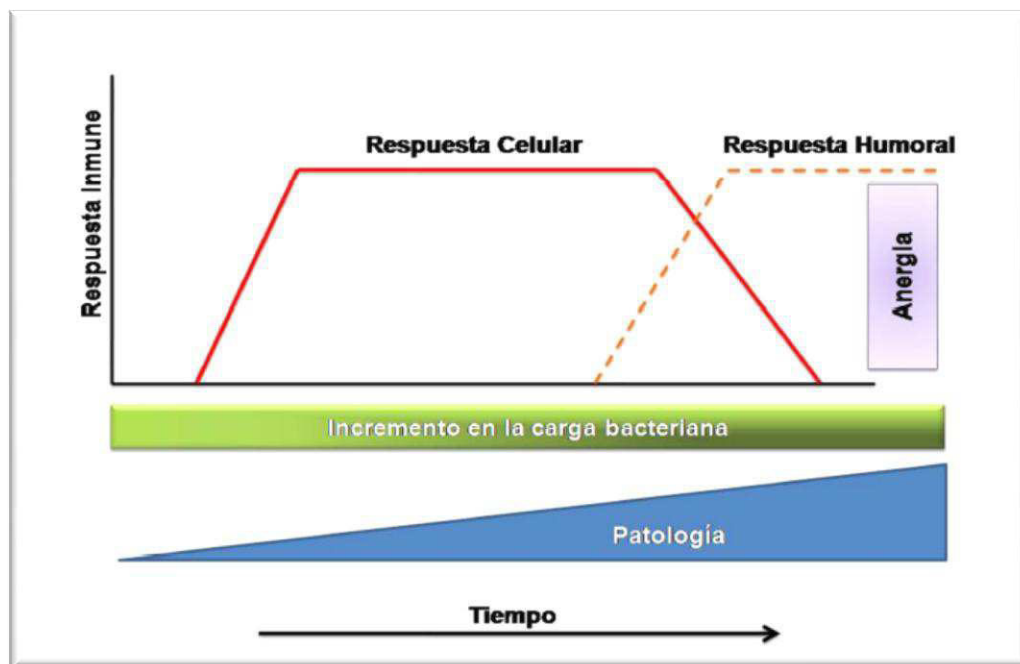


Figura 4. Representación del espectro de la respuesta inmune del bovino después de la infección por *M. bovis*. Inicialmente se desarrolla una respuesta inmune celular, la cual cambia hacia una respuesta humoral conforme la enfermedad progresa y aumenta la carga bacteriana, en estados avanzados de la enfermedad se puede desarrollar un estado de anergia (Tomado y modificado de Pollock and Neill, 2002).

4.4. Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública y situación actual

Como se mencionó anteriormente *M. bovis* es el agente etiológico de la tuberculosis en animales domésticos, también es una de las 3 especies del complejo *M. tuberculosis* que causa enfermedad en humanos. Históricamente, la infección por *M. bovis* ha sido relacionada a tuberculosis extra-pulmonar en niños debido al consumo de leche no pasteurizada, después de la introducción de la pasteurización la incidencia por esta vía de infección ha disminuido. Sin embargo, la infección por vía aérea es frecuente entre personas que tienen un contacto cercano con ganado infectado (Pérez et al., 2008).

La incidencia real de la infección por *M. bovis* en humanos es desconocida y quizá subestimada ya que generalmente no se hace una distinción entre especies del aislado obtenido. En América Latina, la mayoría de los estudios han sido realizados en Argentina describiendo incidencias del 0.7% al 6.2% en regiones lecheras (LoBue, 2006).

En México existe poca información al respecto, en un estudio realizado en pacientes con problemas respiratorios crónicos, 3 de 19 aislamientos obtenidos correspondieron a *M. bovis* (Toledo et al., 1999). Sin embargo, un análisis retrospectivo realizado en San Diego, California, reveló que de los años 2001 a 2005 el 8% de los casos de tuberculosis se debió a *M. bovis*, de estos el 60% se presentó en personas de origen mexicano (Rodwell et al., 2008).

El control de la tuberculosis por *M. bovis* en el humano se basa en el control de la enfermedad en los animales, es por eso que se realiza una intensiva campaña para su erradicación y evitar las pérdidas económicas asociadas y las restricciones a la movilización de animales. Gracias a esto, actualmente 11 estados del país se encuentran en etapa de erradicación con una prevalencia menor al 0.5%.

Para efectos de exportación de ganado en pie el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 24 regiones de baja prevalencia, 14 de las cuales con una prevalencia menor al 0.1% pueden exportar con una sola prueba de tuberculina al lote, 9 regiones con una prevalencia menor al 0.5% pueden exportar con prueba de lote y prueba de hato de origen y una región que no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos ya que tiene una prevalencia menor al 0.01% (SENASICA, 2010).

4.5. Diagnóstico de la tuberculosis bovina

La identificación y eliminación temprana de los animales enfermos es la base de los programas de erradicación de tuberculosis alrededor del mundo. La infección se diagnostica por lo general en el animal vivo mediante reacciones de hipersensibilidad retardada. Habitualmente la infección es subclínica, raramente se observa evidencia clínica de la enfermedad en el ganado (Thoen and Ebel, 2006).

La tuberculinización es la prueba ante-mortem autorizada por la Organización Mundial en Sanidad Animal (OIE, 2010); sin embargo, en la Unión Europea, Estados Unidos y Australia se ha aprobado el uso de la prueba de IFN- γ . La primera prueba detecta la reacción de hipersensibilidad tardía a la inyección intradérmica del PPD, mientras que la segunda prueba, detecta la liberación de IFN- γ en cultivos con sangre completa estimulados con PPD usando una prueba de ELISA (Gormley et al., 2006; Rothel et al., 1990; de la Rúa et al., 2006). Tras el sacrificio, se realiza un examen post-mortem para buscar lesiones sugestivas a tuberculosis bovina, las cuáles se analizan por técnicas histopatológicas y bacteriológicas. También se pueden utilizar técnicas con sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, el cultivo bacteriano tradicional continúa siendo el método rutinario de confirmación de la infección.

4.5.1. Evaluación de la respuesta inmune celular

4.5.1.1. Prueba de hipersensibilidad retardada

Esta prueba se fundamenta en la aplicación intradérmica de la tuberculina que fue descubierta por Roberto Koch en 1890, (Gradmann, 2006) el objetivo es identificar la presencia de los linfocitos T del huésped que han sido expuestos y están sensibilizados a antígenos específicos de *M. bovis* (Andersen et al., 2006), esta reacción es actualmente definida como una hipersensibilidad de tipo retardado (Sell and Max, 2001).

Koch desarrolló la tuberculina para ser utilizada como una vacuna terapéutica en humanos; sin embargo, pronto advirtió sus propiedades diagnósticas, ya que al ser inyectadas en personas infectadas, estas desarrollaban fiebre, escalofríos y vómito,

signos no observados en personas no infectadas. Esta prueba fue adoptada para su uso en el ganado cuando se descubrió que los animales desarrollaban una respuesta térmica o aumento de la temperatura en la zona de aplicación después de inyecciones subcutáneas con 0.2 a 0.5 ml de tuberculina (de la Rua et al., 2006; Francis et al., 1973; Monaghan et al., 1994; Daniel, 2006). En 1908 Moussu y Mantoux modificaron la forma de aplicar la tuberculina, de una forma subcutánea a intradérmica, siendo los primeros en describir su uso en el ganado en el pliegue caudal (McIntosh and Konst, 1947).

La prueba comparativa usando el PPD aviar fue introducida hasta 1942, y en 1975 se sustituyó la tuberculina humana por la tuberculina bovina después de demostrar que esta tenía una potencia mayor y era más específica (Monaghan et al., 1994).

La prueba de la tuberculina consiste en la inyección intradérmica del PPD bovino en la tabla del cuello y la subsecuente medición de la inflamación en el sitio de inoculación 72 horas después. Esto se puede llevar a cabo utilizando solo PPD bovino, o en una prueba comparativa, empleando PPD bovino y el PPD aviar. En México la prueba simple se realiza en el pliegue caudal de la cola (NOM-031-ZOO-1995). La elección de la prueba a utilizar depende de la prevalencia de la infección por *M. bovis* y el nivel de exposición ambiental a otras micobacterias sensibilizadoras (OIE, 2010). La sensibilidad y especificidad de las pruebas es variable, pero se considera que la prueba cervical es más sensible que la prueba caudal (Monaghan et al., 1994; Francis et al., 1978). Aunque el uso de varias técnicas, diferentes dosis y preparaciones hace difícil una comparación, algunos autores han analizado la sensibilidad y especificidad de las pruebas (Cuadro 2-1) (Monaghan et al., 1994; Francis et al., 1978a,b; Schiller et al., 2010).

Cuadro 2.1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas intradérmicas realizadas en el ganado bovino.¹

Prueba de la tuberculina	Sensibilidad %	Especificidad %
Caudal	68-96.8	96-98.8
Cervical Simple	80-91	75.5-96.8
Cervical Doble Comparativa	55.5-93.5	88.8-100

¹Tomado y modificado de Schiller et al., 2010).

Los resultados de estas pruebas pueden ser influenciados por la etapa de la enfermedad, la presencia de otros organismos que provoquen reacciones cruzadas y por factores propios del bovino, como la inmunosupresión durante el período post-parto, un estado de estrés por transporte, infecciones virales que depriman al sistema inmune, etc. (de la Rúa et al., 2006).

La reacción de hipersensibilidad hacia el PPD usualmente se desarrolla 3-6 semanas después de la infección con *M. bovis*, se cree que hay una correlación positiva entre el tamaño de la respuesta intradérmica y la extensión de la patología, lo que podría aumentar la probabilidad de hallar lesiones en rastro en animales con fuerte reacciones intradérmicas (Goodchild and Clifton-Hadley, 2006). Aunque un animal que se encuentre en un estado avanzado de la enfermedad puede desarrollar pobres reacciones intradérmicas y presentar varias lesiones.

La administración del PPD induce una supresión temporal de la respuesta intradérmica hacia los antígenos micobacterianos que puede confundir la interpretación de las subsecuentes pruebas (Coad et al., 2010). Dicha supresión se presenta desde el día 3 al 60 después de la inoculación, los mecanismos responsables de este efecto no han sido esclarecidos pero este fenómeno limita la versatilidad de las pruebas intradérmicas y es una advertencia de los efectos de la administración del antígeno en posteriores pruebas in vitro (Palmer et al., 2006).

La gran desventaja del PPD actualmente utilizado es que muchos de los antígenos son encontrados en especies micobacterianas ambientales, lo que ocasiona problemas con la especificidad de la prueba. Por esta razón se introdujo el uso del PPD aviar en la prueba doble comparativa. A pesar de que esta prueba constituye una buena señal de exposición a micobacterias no siempre es posible discriminar entre el ganado con tuberculosis y ganado expuesto a micobacterias ambientales, lo que representa un serio problema en lugares donde es común la co-infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ya que en algunos animales, la respuesta hacia el PPD aviar puede ser igual o mayor que hacia el PPD bovino (van Pinxteren et al., 2000).

4.5.1.2. Prueba de interferón gamma (IFN- γ)

Debido a la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de la prueba de la tuberculina se ha propuesto la utilización de pruebas alternativas o complementarias, una de ellas es la prueba de IFN- γ que fue desarrollada en Australia (Rothel et al., 1990) y es comercializada bajo el nombre de Bovigam® (Prionics, Switzerland), este kit emplea como antígenos al PPD bovino y aviar, se puede utilizar en borregos, cabras, búfalos y teóricamente en cualquier especie de la familia Bovidae.

Esta prueba presenta una sensibilidad y especificidad superior a la prueba de la tuberculina (87.7% y 99.2%, respectivamente); (Schiller et al., 2010) además, el uso de ambas pruebas en paralelo mejora sustancialmente la sensibilidad (95.2%) (Gormley et al., 2006; de la Rúa et al., 2006). Tiene la ventaja que el criterio para definir a un animal como positivo puede ser ajustado para mejorar la sensibilidad o especificidad de la prueba, pero sobre todo, detecta a una importante proporción de animales que escapan a la detección con la prueba intradérmica porque permite la identificación temprana de animales infectados desde los 14 días (Buddle et al., 1995). Esta prueba ha sido evaluada en muchos países, apoyando la idea que puede ser considerada como una prueba diagnóstica complementaria a la prueba de la tuberculina. Sin embargo, debido a su alto costo, comparado con la prueba de la tuberculina, la necesidad de personal y equipo especializado, y a las limitaciones logísticas, es difícil su aplicabilidad. Es bien conocido que después de la inyección intradérmica del PPD se induce una supresión temporal de las respuestas de hipersensibilidad retardada hacia los antígenos micobacterianos (Doherty et al., 1995); sin embargo, el efecto sobre la prueba de IFN- γ no es muy claro. Los primeros reportes indican un aumento gradual de los valores de densidad óptica (OD) en la prueba de IFN- γ entre el día 7 y 59 después de la prueba caudal (Rothel et al., 1992), aunque este efecto puede variar dependiendo del formato de la prueba intradérmica empleado, y si el estudio fue realizado en animales infectados naturalmente o experimentalmente (Gormley et al., 2006; de la Rúa et al., 2006; Schiller et al., 2010; Palmer and Waters, 2006).

Después de la prueba caudal en animales sensibilizados con una preparación de *M. bovis* AN5 inactivada se observó un aumento en las respuestas hacia el IFN- γ en un período de

3 a 28 días (Whipple et al., 2001). Por otro lado, en animales infectados experimentalmente este aumento se observó entre 3 a 7 días después, pero esto no tuvo efecto sobre la respuesta diferencial a la tuberculina, por lo que no hay una interferencia con la interpretación final de la prueba de IFN- γ (Palmer et al., 2006). Sin embargo, en animales infectados naturalmente el incremento en la respuesta hacia el PPD bovino se observó 3 días después de la prueba caudal, y no hacia el PPD aviar como lo anteriormente reportado (Coad et al., 2010).

Respecto a la prueba cervical comparativa, los estudios en animales infectados naturalmente indican que este formato de la prueba intradérmica no aumenta o disminuye significativamente las respuestas hacia el PPD en la prueba de IFN- γ (Coad et al., 2010; Doherty et al., 1995; Gormley et al., 2004). En animales infectados experimentalmente, los resultados fueron contradictorios: por una parte, se menciona que hay una disminución en la producción de IFN- γ 3 días después de la prueba cervical comparativa (Whelan et al., 2004); y por otro lado, un aumento en la producción de IFN- γ 7 días después de la prueba (Thom et al., 2006).

Lo anterior demuestra que los resultados obtenidos en animales infectados experimentalmente no siempre pueden validarse en infecciones naturales, por lo que hay que tener cuidado al extrapolar la información. Schiller et al. (2010) después de analizar estos estudios concluyen que de acuerdo a los resultados obtenidos en animales infectados naturalmente, no hay evidencia de que la prueba cervical comparativa induzca un aumento o disminución en la producción de IFN- γ hacia el PPD bovino o aviar, a diferencia de la prueba caudal la cual puede inducir un aumento en la producción de IFN- γ hacia el PPD bovino 3 días después de la prueba (Figura 5).

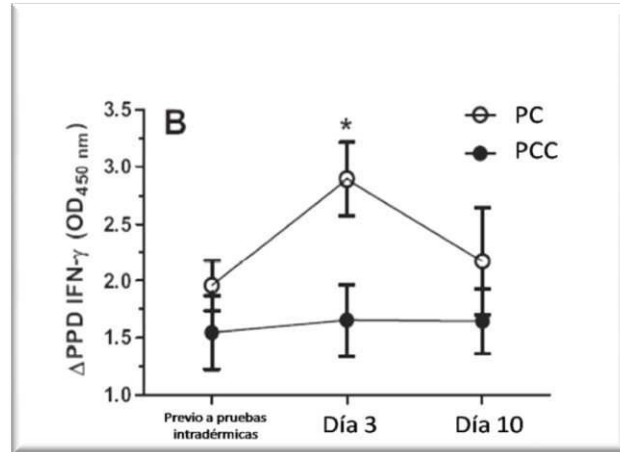


Figura 5. Influencia de la prueba cervical comparativa y la prueba caudal en la prueba de IFN- γ en animales infectados naturalmente con *M. bovis*. Las respuestas fueron medidas antes, 3 y 10 días después de la prueba intradérmica. Se muestran las medias de las respuestas hacia el PPD (PPD-B menos PPD-A \pm SEM) en bovinos que se les aplicó la prueba caudal (n=8) o la prueba cervical comparativa (n=15) representados como círculos blancos, o negros, respectivamente (*P < 0.05) (PC: Prueba caudal; PCC: Prueba cervical comparativa) (Tomado y modificado de Coad et al., 2010).

La prueba de IFN- γ se usa en paralelo con la prueba intradérmica con el objetivo de identificar a una mayor proporción de animales infectados que escapan a la identificación con la prueba intradérmica, y que pueden permanecer en el hato siendo una fuente de infección para otros animales. De la misma forma, esta prueba se utiliza en algunos países como una alternativa a la prueba cervical comparativa para esclarecer el resultado de los animales reactivos a la prueba caudal. No obstante, la exposición a micobacterias ambientales compromete la especificidad de ambas pruebas, y tienen la desventaja de que no pueden detectar animales infectados en un estado de depresión de la respuesta inmune celular.

4.5.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral

4.5.2.1. Prueba de inmuno-adsorción ligado a enzimas (ELISA)

Debido al espectro de la respuesta inmune en la tuberculosis bovina (Figura 4), los animales anérgicos que no son identificados con los métodos diagnósticos que evalúan la respuesta celular tienen una mayor probabilidad de presentar una enfermedad

generalizada y ser altamente infectivos, aunque una cierta proporción de estos animales pueden ser detectados por ensayos serológicos, debido principalmente al desarrollo tardío e irregular de la respuesta inmune humoral durante la enfermedad (Lyashchenko et al., 1998).

A pesar de la baja sensibilidad de las pruebas serológicas, se ha observado un efecto anamnésico en el título de anticuerpos después de una prueba intradérmica, el cual está correlacionado con una mayor severidad de la enfermedad (Lyashchenko et al., 2004). Esto tiene relevancia en situaciones de prevalencia media o alta, en donde en una primera etapa se podrían seleccionar y eliminar los animales con enfermedad avanzada o anérgicos, que son la principal fuente de infección en el hato, y que pueden tener cantidades detectables de anticuerpos circulantes; y pueden no manifestar reacción a las pruebas de tipo celular.

Para la prueba de ELISA se han utilizado diferentes antígenos como el PPD, proteínas de secreción (filtrado de cultivo), así como antígenos purificados, ya sean nativos o recombinantes (Wood and Rothel, 1994; Rothel et al., 1990; Wood et al., 1992; Kwok et al., 2010; Ritacco et al., 1990). El uso de antígenos sero-dominantes como MPB70 y MPB83 han mejorado la especificidad de la prueba, pero no la sensibilidad (Wood et al., 1992; Harboe et al., 1990; McNair et al., 2001). No obstante, ha habido varios avances en el desarrollo de nuevas técnicas, principalmente basadas en el uso de cócteles proteicos; algunos de ellos son: MAPIA, (por su sigla en inglés, multi-antigen print immunoassay) el cual es una herramienta muy eficiente para la detección de anticuerpos a gran escala, así como para la caracterización de la respuesta serológica en el ganado y otras especies infectadas con *M. bovis* (Lyashchenko et al., 2000), fluorescencia polarizada (Jolley et al., 2007), inmunoensayo de quimioluminiscencia en placas de 96 pozos (Whelan et al., 2008) o en plataforma (Green et al., 2009), que permiten la detección de anticuerpos 2 semanas después de la infección (Waters et al., 2006).

Las pruebas serológicas pueden detectar anticuerpos contra *M. bovis*, aunque relativamente baratas y simples de realizar, actualmente no son una alternativa a las pruebas establecidas para evaluar la respuesta inmune celular; sin embargo, pueden ser auxiliares para identificar infecciones crónicas.

4.5.3. Identificación del agente

4.5.3.1. Inspección sanitaria e histopatología

En áreas endémicas o de alta prevalencia se puede realizar un diagnóstico presuntivo de la enfermedad después de encontrar las lesiones sugestivas de tuberculosis bovina durante la necropsia; sin embargo, en áreas de baja prevalencia es necesario realizar una inspección detallada, junto con la colección de tejidos para su análisis histopatológico y aislamiento bacteriano.

La búsqueda de las lesiones idealmente debería realizarse en todos los tejidos listados en el Cuadro 2-2 ya que la distribución de las lesiones es muy amplia, y en zonas de baja prevalencia el 66% de los animales pueden tener una sola lesión (Corner et al., 1990).

Esto puede ser una de las causas de encontrar animales reactivos a la prueba de la tuberculina sin lesiones visibles, o quizá el animal está en una etapa temprana de la infección y las lesiones son muy pequeñas para ser observadas a simple vista. Además se debe considerar que la sensibilidad de la técnica de necropsia depende del tiempo y cuidado de la persona que realiza la inspección, la cual puede ser del 28.5% como es indicada en un estudio realizado en los Estados Unidos (Corner, 1994; Schiller et al., 2010).

Cuadro 2-2. Distribución de los granulomas en bovinos infectados con tuberculosis bovina.¹

Tejido	% lesión
Linfonodos retrofaríngeos	29.4
Linfonodos mediastínicos	28.2
Linfonodos bronquial	18
Pulmón	9.8
Linfonodos mesentéricos	2.9
Linfonodos parotídeos	2.4
Linfonodos cervicales profundos	2.4
Linfonodos inguinales superficiales	1.2

¹Tomado y modificado de Corner et al., 1990.

La presencia de bacterias ácido alcohol resistentes puede demostrarse microscópicamente en frotis directos de muestras clínicas y en materiales tisulares preparados. La resistencia al ácido hidroclicórico-etanol se puede demostrar con la tinción clásica de Ziehl-Neelsen, aunque también puede utilizarse la tinción fluorescente de auramina-rodamina (Barrera, 2007). El diagnóstico preliminar se puede hacer si el tejido muestra lesiones histológicas sugestivas, un centro formado por macrófagos infectados rodeados de células gigantes vacuoladas o macrófagos espumosos, los linfocitos delimitan la periferia de la estructura, la cual puede estar rodeada de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (Russell, 2007).

4.5.3.2. Aislamiento bacteriano

La prueba definitiva para confirmar la infección por *M. bovis* es su aislamiento y tipificación; sin embargo, hay varios factores que influyen en el éxito del mismo, como la conservación del tejido, el procedimiento de descontaminación, el medio de cultivo y las condiciones de incubación. Para preservar los tejidos y evitar su contaminación se utiliza borato de sodio; sin embargo, el tejido no debe permanecer más de 10 semanas en esta solución y de preferencia deber ser mantenido a 6°C, ya que a mayor tiempo la viabilidad de las micobacterias disminuye (NOM-031-ZOO-1995; Corner, 1994). El proceso de descontaminación generalmente se hace con un ácido o un álcali, el reactivo ideal debe mostrar una mínima toxicidad hacia *M. bovis* pero máxima hacia otros organismos contaminantes; sin embargo, el descontaminante tradicionalmente usado, el hidróxido de sodio al 2% tiene el mayor nivel de toxicidad comparado con otros reactivos como el ácido oxálico, o el cloruro de hexadecilpiridinio, lo que puede afectar el aislamiento de la micobacteria (Corner et al., 1995)

Las micobacterias requieren medios enriquecidos para crecer, los medios usados tradicionalmente son: Stonebrink y Lowenstein-Jensen, los cuales contienen verde de malaquita al 2% para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, para diferenciar los medios, al medio Stonebrink también se le agrega cristal violeta (Collins and Grange, 1983). Ambos medios de cultivo tienen la misma composición, a excepción que el glicerol es remplazada por 0.5% de piruvato de sodio en el medio Stonebrink (Keating et al., 2005); esto permite realizar una diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, ya

que este último es incapaz de usar el glicerol como fuente de carbono, debido a la falta de una piruvato kinasa funcional, por lo que *M. bovis* generalmente no crece en medio Lowenstein-Jensen que solamente contiene glicerol como fuente de carbono. Los medios Middlebrook 7H10 o 7H11 muestran una tasa de crecimiento más rápida, de 28 días, a diferencia de los 36 días con medio Stonebrink; sin embargo, estos medios son más caros y susceptibles al crecimiento de microorganismos contaminantes (Corner, 1994). El intervalo generacional de *M. bovis* es de 16-20 horas, por lo que los cultivos se deben incubar durante 8 semanas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. En la última década ha habido un gran avance en el desarrollo de otros métodos de cultivo, el sistema BACTEC 460 fue el primer sistema semi-automático en ser comercializado, posteriormente se desarrolló un sistema totalmente automático BACTEC-MGIT960, estos sistemas tienen una mayor sensibilidad que los medios sólidos y un período de detección de cultivos positivos más corto (13-15 días) y son una alternativa para el aislamiento de *M. bovis*; pero, estos métodos requieren el empleo de lectores y sistemas de incubación especializados, lo que eleva su costo (Barrera, 2007; Rodrigues et al., 2007; Hines et al., 2006). Una vez que se ha obtenido el aislado, se pueden utilizar varias técnicas para confirmar la identidad del aislamiento basadas en la morfología de la colonia y en pruebas bioquímicas, las cuales pueden tomar hasta 4 semanas en completarse (Cuadro 2-3).

Cuadro 2-3. Características bioquímicas de algunas especies del complejo *M. tuberculosis*¹

Prueba	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>
Morfología	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Rugosa	Lisa
Piruvato como fuente de carbono	-	+	+	-	-
Pirazinamidasas	+	-	-	+	+
Niacina	+	-	-	+/-	+
Nitrato	+	-	-	+/-	-
Ureasa	+/-	-	+	+/-	+/-
Susceptibilidad a THC	R	S	S	S	S

¹Tomado y modificado de Barrera, 2007. R= Resistente S= Susceptible THC= Tiofeno-2-hidrazida del ácido carboxílico.

4.5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Actualmente, se a iniciado el empleo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en algunos laboratorios, con el objetivo de facilitar la identificación de las micobacterias y otros microorganismos. Hay varios protocolos publicados para la detección por PCR de micobacterias; no obstante, parece no haber consenso en cuanto a la extracción de ADN y al método de amplificación. Se han utilizado varios iniciadores, los más comunes incluyen secuencias que amplifican el ARNr 16S, la región intergénica del ARNr 16S-23S, las secuencias de inserción IS6110, IS1801, los genes *hsp65*, *rpoB*, *recA*, *dnaJ*, *sodA*, los genes que codifican para las proteínas de 32 kDa y *mpb70*; (Neonakis et al., 2008; Vitale et al., 1998; Zumárraga et al., 2005; Liébana et al., 1996) de la misma forma, se han desarrollado algunos sistemas que permiten una diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* como la amplificación de un producto de 500bp, la identificación de la región RD9, y la amplificación del gen *oxyR* y *pnc* (De los Monteros et al., 1998; Das et al., 2007)

La mayoría de los protocolos para la detección de *M. bovis* se basan en procedimientos desarrollados en laboratorios de investigación. Otras aplicaciones han tendido a la evaluación de kits comerciales más robustos y a veces excesivamente caros; por ejemplo, los sistemas AMPLIFIED MTD® (Gen-Probe, San Diego, Calif.) y Amplicor® (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ) que se basan en la detección del ARNr 16S. A pesar de ser sistemas que permiten la obtención de un diagnóstico más rápido, la variabilidad en la sensibilidad obtenida impide la sustitución de los métodos convencionales de aislamiento e identificación de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*, que aunque son lentos y engorrosos, siguen siendo la prueba de oro para la detección definitiva de estas bacterias.

Los factores que contribuyen a la reducción en la sensibilidad de los protocolos de amplificación actuales son en el bajo número de bacilos en las muestras clínicas, la eliminación intermitente de la bacteria, o una ineficiente extracción de ADN de la micobacteria, lo que puede ocasionar la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras (De la Rúa et al., 2006; Hosek et al., 2006).

4.6. Respuesta inmune contra *Mycobacterium bovis*

4.6.1. Respuesta inmune innata

La patogenia de la tuberculosis bovina empieza con la entrada de un pequeño número de bacilos a los pulmones por vía aérea. Una vez que el bacilo es inhalado se aloja en las vías primarias, es fagocitado por los macrófagos alveolares (Fenton and Vermeulen, 1996; Fenton et al., 2006; Keane et al., 1997).

En el espacio alveolar, los mecanismos innatos de defensa involucran a diferentes tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, células alveolares tipo I y II y factores solubles como mucina, defensina, lisozima, lactoferrina, proteínas surfactantes, fosfolipasa A₂, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio (Knowles, 2002).

La respuesta inmune innata ante infecciones por el género *Mycobacterium* comienza con el reconocimiento de diversas estructuras moleculares de origen micobacteriano por algunos receptores como los TLR (Toll Like Receptors), los cuales inducen la producción de TNF- α y óxido nítrico (ON) que directa o indirectamente contribuyen a la muerte de los microorganismos, además de inducir la activación y orientación de la respuesta inmune adquirida a través del reclutamiento de linfocitos T al sitio de la lesión; asimismo, se induce la activación de las células dendríticas, favoreciendo la producción de citocinas y quimiocinas (Vasselon and Detmers, 2002; Iwasaki and Medzhitov, 2004). Una vez que la micobacteria es degradada en su totalidad, entran en acción los mecanismos proteolíticos encargados de la generación y presentación de péptidos y otros antígenos (Korbel et al., 2008).

Posterior a la fagocitosis, la micobacteria es incluida en el fagosoma para formar el fagolisosoma donde, en un proceso dinámico, es destruida por los mecanismos bactericidas de los macrófagos que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno las cuales causan daños a las proteínas estructurales y de membrana, así como a los ácidos nucleicos, ocurriendo fragmentación de ADN e inactivación de enzimas etc.

Por otro lado, pueden intervenir especies reactivas de nitrógeno que por medio de la enzima óxido nítrico sintasa forman el óxido nítrico el cual debido su carácter inestable y junto con los radicales libres de oxígeno interaccionan ávidamente con un sinnúmero de grupos químicos presentes en muchas moléculas causando en ellas alteraciones estructurales y funcionales, como bloquear la respiración bacteriana, inhibir la síntesis de ADN, ocasionar la pérdida de bases, y la desaminación de la citocina en uracilo causando mutaciones al momento de la replicación y la ruptura de una o las dos hebras del ADN (Kwon, 1997). Por otro lado la micobacteria tiene la capacidad de producir cantidades significativas de amoníaco y así evadir el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal, reduciendo la potencia de las enzimas intralisosomales vía alcalinización; enzimas como la glutamino-sintetasa y la ureasa micobacteriana, inhiben la fusión fago-lisosomal promoviendo la supervivencia de ésta.

4.6.2. Respuesta inmune adquirida

El proceso de presentación de antígenos constituye un paso importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares. El control inmunológico de la infección por *Mycobacterium* está basado en la respuesta inmune de tipo celular caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas como: IL-12, IFN- γ , IL-18, TNF- α , RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-18. Las diferentes poblaciones celulares y mediadores solubles en su conjunto forman una compleja red de señales que participan en el control de la enfermedad. También puede aparecer una respuesta no proinflamatoria caracterizada por la producción de citocinas Th2 como: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β , que antagonizan la respuesta inmune celular, y como consecuencia, no hay un buen control de la infección favoreciendo la enfermedad.

Algunos componentes de la micobacteria como el LAM, la lipoproteína 19 kDa y algunas glicoproteínas, inducen la producción de moléculas como IL-1, TNF- α y ON, la unión de estas tres activa diferentes vías de señalización que tienen en común el factor nuclear κ B (NF- κ B), induciéndose la expresión de citocinas y proteínas involucradas en la respuesta inmune para favorecer la eliminación o inhibición del crecimiento

micobacteriano o servir como switch entre la respuesta inmune innata y la adquirida (López-Marín et al., 2003).

Los linfocitos T participan en la respuesta inmune adquirida con dos funciones fundamentales, una de ellas es la producción de citocinas como el IFN- γ el cual activa las funciones efectoras por parte del macrófago, y es producido por todas las células T: como CD4⁺, CD8⁺, T $\gamma\delta$. De igual forma, las células T tienen actividad citolítica sobre células infectadas, aunque la lisis de los macrófagos infectados no elimina completamente a la micobacteria (Flesch et al., 2005).

Durante la fase de estimulación de la respuesta inmune los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas del Complejo de Histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y presentados por los macrófagos a los linfocitos T CD8⁺, los cuales tienen capacidad de producir IFN- γ , reconocer antígenos proteicos y glicolípidos micobacterianos acoplados a moléculas del MHC I o CD1. Dichas células poseen funciones citotóxicas para lisar a las células infectadas a través de un mecanismo dependiente de granulinas, el cual implica un reconocimiento entre las células presentadoras de antígenos (CPA) y los linfocitos T CD8⁺ (Flynn and Chan, 2001).

Asimismo, los antígenos proteicos pueden ser acoplados a moléculas del Complejo de Histocompatibilidad tipo II (MCHII) y presentados a los linfocitos TCD4⁺, que los reconocerán e iniciarán la producción de IFN- γ , cuya acción mantendrá la activación de macrófagos. Por su parte el macrófago tiene la capacidad de producir IL-1 e IL-2 citocinas que promueven la expansión clonal de los linfocitos T CD4⁺ y su activación lo que resultará en una mayor producción de IFN- γ .

Por otro lado, los antígenos de naturaleza glicolípida (fosfatidil manósidos, lipoarabinomananas, ácidos micólicos y hexosil-1-fosfoisoprenoides) son reconocidos por moléculas CD1 y presentados a linfocitos TCD8⁺ y linfocitos T dobles negativos (CD4⁻CD8⁻) (Schluger, 2001).

Otra población importante de linfocitos son los T $\gamma\delta$ los cuales desempeñan un papel importante en la infección ya que son las primeras células reclutadas hacia el sitio de infección donde secretan citocinas y quimiocinas que tienen la capacidad de eliminar macrófagos infectados mediante un mecanismo de citotoxicidad dependiente de gránulos, similar al de los linfocitos CD8⁺.

Las infecciones por microorganismos que producen una reacción granulomatosa crónica son el mejor ejemplo de la falta de eficiencia de los mecanismos bactericidas en la defensa del huésped o una pobre respuesta por parte del sistema inmune. Las razones son múltiples e incluyen un defecto en la activación por parte de los macrófagos, que es secundario a la fagocitosis mediada por receptores que no activan el mecanismo productor de reactivos intermediarios de oxígeno (ROI), aunque también existe una resistencia intrínseca de la micobacteria a dichos compuestos y es necesario que se combinen con los reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI) para aumentar significativamente la capacidad micobactericida (Yang et al., 2005).

4.7. Tipos de activación celular del macrófago

4.7.1. Activación clásica del macrófago

Se sabe que la activación “clásica” de los macrófagos, es conocida desde los estudios realizados por Mackaness et al, (Mackaness, 1964) quienes demostraron que la infección de ratones con *Mycobacterium bovis* BCG o *Listeria monocytogenes* aumentaba la actividad microbicida de los macrófagos de manera estímulo-dependiente pero no antígeno-específica (Gordon, 1999; Hamilton, 2002).

La activación de los macrófagos permite la erradicación de estas bacterias y ocurre cuando diversos mediadores solubles (citocinas) producidas por los linfocitos T, potencializan los mecanismos bactericidas de los macrófagos los cuales destruyen a los microorganismos través de mecanismos dependientes e independientes del oxígeno.

La función bactericida de los macrófagos se fundamenta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROI) y del nitrógeno (RNI) a través del estallido respiratorio, los primeros incluyen la participación de los radicales libres del oxígeno (ROI) generados por el sistema de la NADPH-oxidasa al transformar al oxígeno molecular en anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Walter, 1981).

Algunas citocinas involucradas y que modulan la activación clásica de los macrófagos como el $IFN-\gamma$ y otras como el Factor de Necrosis Tumoral alfa ($TNF-\alpha$), la interleucina-1 e interleucina-6 las cuales son producidas por los mismos macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (a excepción del $IFN-\gamma$) y por linfocitos expuestos a productos micobacterianos, ejerciendo efectos inmunorreguladores y mediando muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis. El $IFN-\gamma$ es clave en el control de infecciones por especies del género *Mycobacterium*, es producido por células T $CD4^+$, $CD8^+$ y $T\gamma\delta$ así como también por células NK. Asimismo, se cree que podría estar involucrado en un aumento en la presentación de antígenos, reclutamiento de linfocitos T $CD4^+$ y/o linfocitos T citotóxicos, los cuales podrían participar en la eliminación de la infección. Si bien la sola producción de $IFN-\gamma$ es ineficiente en el control de la infección por *Mycobacterium*, éste es requerido para una adecuada respuesta protectora hacia el patógeno. Aunque la producción de $IFN-\gamma$, esta principalmente limitada a las células T y

a las células NK, también se ha comprobado su producción por macrófagos alveolares de humanos tras la infección por *M. tuberculosis* (Fenton and Vermeulen, 1996; Fenton and Savedra, 1996). Por otra parte, se ha demostrado que la 1,25 Dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃), sola o en combinación con IFN- γ y/o TNF- α es capaz de activar a los macrófagos para inhibir el crecimiento o eliminar a *M. tuberculosis* (Denis, 1991). En conclusión, la actividad conjunta de los ROI, el ON y los componentes lisosomales, son la principal causa de muerte del microorganismo ingerido.

4.7.1. Activación alterna del macrófago

Gordon (2003) define a la activación alterna como la activación de los macrófagos inducida por IL-4 e IL-13, citocinas que son producidas generalmente por una respuesta tipo Th₂, inhibiendo la respuesta Th₁ por antagonismo con el IFN- γ , este fenómeno se ha asociado particularmente a procesos alérgicos, respuesta humoral y celular a parásitos y patógenos extracelulares

Mantovani (2004) menciona que la IL-4 e IL-13 son más que simples inhibidores de la activación del macrófago, e inducen una activación diferente refiriéndose a ella como una activación alternativa, la cual es inducida por las citocinas antes mencionadas y caracterizada por la presencia de receptores no-opsónicos, bajos niveles de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; NOS₂), así como una marcada disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias como es la IL-1, TNF- α e IL-6.

Estudios recientes agrupan los efectos de estas citocinas sobre los macrófagos junto con los efectos de la interleucina 10, (IL-10) como “desactivadores ” de los macrófagos, aunque ya es sabido que estos efectos son producidos por la IL-4 e IL13, la cuales inducen cambios fenotípicos en la superficie celular distintos a los inducidos por el IFN- γ y la IL-10 (la cual desactiva el mecanismo de estallido respiratorio y la producción de citocinas inflamatorias, particularmente el TNF- α por los macrófagos). La IL-4 e IL-13 aumentan la expresión de moléculas del MHC II por parte de los macrófagos, lo cual estimula la endocitosis y el aumento en la expresión de los receptores de manosa (MR) y, por lo tanto, el flujo de ligandos dentro de los lisosomas, de igual manera se favorece el incremento de la presentación de antígenos e inducción en la expresión de

quimiocinas selectivas como es la quimosina derivada del macrófago (MDC), también conocida como CCL22, y la quimosina reguladora de activación y timo (TARC) o CCL17; este tipo de activación por parte del macrófago favorece la producción de la L-arginina como precursor en la biosíntesis de prolina y poliamina, promueve el crecimiento celular, formación de colágeno y reparación del tejido, todo esto implicado en la formación y funcionalidad del granuloma (Hesse et al., 2001). Además, se sabe que la IL-4 y otras citocinas del tipo Th2 incrementan el metabolismo de la L-arginina por parte del macrófago vía la enzima arginasa, lo cual produce ornitina y urea (Munder et al., 1999).

Mooser (2003) menciona que este tipo de activación está dada por la exposición de los macrófagos hacia la IL-4 o glucocorticoides lo que induce a la sobrerregulación de receptores fagocíticos, pero tiene fallas en la producción de radicales de nitrógeno, que da como resultado una pobre eliminación de patógenos intracelulares (Modolell et al., 1995), y parece estar más involucrada en procesos de inmunosupresión y reparación de tejidos. La actividad supresora de este tipo de macrófagos influye sobre células T activadas por mitógenos los cuales muestran una significativa reducción en sus capacidades secretoras y proliferativas, donde hay un aumento en la producción de IL-10 y del receptor antagonista de la IL-1 (IL-1R α) (Goerdts et al., 1999).

Estudios recientes mencionan que los macrófagos activados de forma alterna muestran un aumento en la producción de componentes involucrados en la síntesis de la matriz extracelular como el β IG-H3 que promueve la fibrogénesis por medio de células fibroblastoides, así como altos niveles de fibronectina (Gratchev et al., 2001; Song et al., 2003), e induce la expresión de moléculas del MHC II, matriz metaloproteínasa-12 (MMP-12) y receptores de transferrina (TfR) (Antje et al., 2006).

También se ha encontrado evidencia que los macrófagos responden diferencialmente a los estímulos de citocinas Th1 y Th2, por ejemplo, los macrófagos asociados a estímulos Th1 son activados de una forma más temprana para producir ON en comparación con macrófagos asociados a Th2, los cuales no solo no producen ON, sino que incrementan el metabolismo de la L-arginina, lo cual sugiere que la influencia inmune de las citocinas ya sean Th1 o Th2 van en caminos opuestos (Nathan, 1991; Williams-Ashman and Canellakis, 1979). Los mecanismos que un animal puede utilizar para resistir la

enfermedad se dividen en mecanismos inmunes y no inmunes. Dentro de estos últimos, los macrófagos son considerados como uno de los elementos más importantes en este proceso. Diferentes estudios utilizando macrófagos de origen bovino han demostrado que la condición genética del ganado asociada a la resistencia natural a patógenos intracelulares es muy importante en el resultado final de la interacción microorganismo-huésped (Gutierrez-Pabello and Gary-Adams, 2003).

4.8 Resistencia natural del ganado a patógenos intracelulares

El termino resistencia natural a las enfermedades se refiere a “la capacidad heredable de un animal de evitar el desarrollo de una enfermedad cuando se expone al agente causal que la provoca, pero sin haber tenido previa exposición o haber sido inmunizado” (Hutt, 1958). Bajo estas condiciones se presenta una falta de susceptibilidad al proceso de enfermedad, aún si existe contacto entre el huésped y el agente infeccioso debido a que el agente patógeno no puede desarrollarse a causa de a una incompatibilidad de tipo estructural o fisiológico con el huésped (Skamene, 1983).

Prueba de ello, son los resultados de algunos estudios que se han realizado en el modelo bovino; por ejemplo, Qureshi et al. (1995) demostraron que los macrófagos de ganado **resistente** fueron significativamente superiores en el control del crecimiento intracelular de varios patógenos como *B. abortus*, *M. bovis* BCG, *Salmonella dublin* aunque no así para la especie *Salmonella typhimurium*, en comparación con macrófagos de animales **susceptibles**.

De acuerdo con los resultados de Qureshi, los criterios para realizar la clasificación de los animales en resistentes o en susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos, se basan en la capacidad de los macrófagos para permitir el crecimiento bacteriano; cuando dicho crecimiento sea superior en un 65% se consideraran como susceptibles y los que logren reducir el crecimiento bacteriano a 65% o menos, se designarán como resistentes. Al respecto, se han realizado estudios que evalúan el crecimiento intracelular de *M. bovis* virulento, multiplicación bacteriana e índice de fagocitosis en macrófagos derivados de monocitos provenientes de ganado genéticamente resistente y susceptible a parásitos intracelulares, a las 0 y 24 hrs. con una MOI de 10:1, donde se reportó que la

proporción de fagocitosis bacteriana fue de 1.4 ± 0.17 y 2.1 ± 0.54 bacterias/macrófago, la multiplicación bacteriana fue de 165% y 263% en macrófagos de ganado resistente y susceptible, respectivamente, mencionando que los macrófagos de animales resistentes y susceptibles difieren en el control intracelular de la multiplicación de *M. bovis* (Gutierrez-Pabello and Gary-Adams, 2003).

Por otra parte, Esquivel (Esquivel, 2003) realizó un estudio de inducción de apoptosis en macrófagos en reposo y activados de animales resistentes y susceptibles desafiados con una cepa patógena (*M. bovis* 9926) y una cepa atenuada (*M. bovis* BCG) a una MOI de 10:1, donde se estudiaron la variables de condensación de cromatina y fragmentación del ADN. Los resultados de este estudio concluyen que los macrófagos de animales resistentes presentan mayor índice de apoptosis con ambas cepas de *M. bovis* que los macrófagos de animales susceptibles y que la cepa patógena induce mayor apoptosis que la cepa atenuada. Adicionalmente, se identificó que la activación clásica de los macrófagos incrementa el porcentaje de apoptosis conservando la misma relación descrita con células en reposo, lo cual sugiere que el fenómeno de apoptosis juega un papel importante en la patogenia de la tuberculosis.

Cuadro 2-4. Características de macrófagos, linfocitos T y respuesta a anticuerpos en ganado naturalmente resistente y susceptible a patógenos intracelulares¹

Características.	Naturalmente Resistente.	Naturalmente Susceptible.
Crecimiento intracelular in vitro	Restringido	Permisivo
% fusión fago-lisosomal	Incrementado	Reducido.
Producción de ROI	Alta	Baja
ON producido por LPS o IFN- γ	Alta	Baja
Respuesta a anticuerpos	Masiva y prolongada	Mínima y poca duración

Tomado de Adamns G.L 1998

Justificación

La importancia de la tuberculosis bovina radica en las pérdidas económicas que ocasiona a la ganadería, en el riesgo que ocasiona para la salud pública y su papel como barrera no arancelaria para la exportación del ganado. La prevalencia y la distribución de la tuberculosis en México no son bien conocidas, y es necesaria una buena planeación en el uso de los recursos para su control y eliminación.

La tuberculosis bovina es una enfermedad causada por *Mycobacterium bovis*, que es una micobacteria que afecta principalmente el aparato respiratorio y que se manifiesta en forma crónica. La tuberculosis se caracteriza por el desarrollo de granulomas o tubérculos en los pulmones, linfonodos y otros órganos, estas lesiones son con frecuencia las causas de decomiso o desecho de las canales. Esta enfermedad es la causante de cuantiosas pérdidas económicas, en México se han estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan solo por el desecho del ganado enfermo, se estima además que la tuberculosis disminuye la producción láctea en un 17%, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia hasta un 15% y la fertilidad en un 6% (WHO).

La movilización y comercialización de los animales y sus productos también se ven limitados por la Tuberculosis, la regionalización del país de acuerdo a los avances de campaña y a la reducción de la prevalencia imposibilita la libre movilización de los animales entre regiones lo que impacta negativamente en los canales tradicionales de comercialización, dado que las enfermedades se han convertido en las principales barreras al libre comercio entre países y la tuberculosis es una de las más importantes en este aspecto.

La defensa efectiva del huésped contra la infección micobacteriana depende del rápido reconocimiento y eliminación del patógeno, seguida por la inducción apropiada de las respuestas inmunes innata y adquirida, se sabe que los macrófagos juegan un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis bovina, debido a que estos son la primer línea celular de ataque, actúan como hospederos y son la principal línea de control.

Creemos que los animales resistentes montan una mejor respuesta inmune contra la tuberculosis bovina ya que son capaces de disminuir la viabilidad de la micobacteria

dentro de las células del hospedero. Deseamos entender la plasticidad de los macrófagos activados de forma alterna como una herramienta del sistema inmune en el control de *M. bovis*, y como las vías de señalización a nivel intracelular modifican la respuesta dada por la producción de citocinas y quimiocinas orientadas a la resolución de la enfermedad.

Reportes recientes han demostrado que diferentes lípidos provenientes de la pared celular están implicados en algunos de los mecanismos de evasión e inhibición al sistema inmune del hospedero (Kaur et al., 2006). En los últimos años, varios de estos lípidos se han convertido en moléculas diana para el desarrollo de nuevas vacunas debido a que han sido identificadas células $T\alpha/\beta$ humanas que responden a antígenos lipídicos o glicolipídicos de micobacteria que son presentados por diferentes moléculas CD1, las cuales son no polimórficas (Grant et al., 1999). Por esta razón, los lípidos de micobacteria han sido empleados como constituyentes de adyuvantes y en inmunoterapias antitumorales, además de que se ha evidenciado en modelo experimental de curiel (Curiel et al., 2004), que la inmunización con formulaciones que contienen lípidos de micobacteria disminuyen la aparición de lesiones a nivel pulmonar. Los lípidos de *M. tuberculosis* son importantes factores de virulencia, (Saavedra et al., 2006) de manera que una buena estrategia consiste en desarrollar una respuesta inmune que los neutralice.

La erradicación de esta enfermedad es necesaria para evitar a la población humana el riesgo de contraerla, mejorar la productividad de los bovinos, evitar las pérdidas económicas y las restricciones a la movilización de animales, tanto nacional como internacionalmente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó con bovinos sanos, provenientes de un hato libre de tuberculosis y brucelosis bovina. Los animales pertenecen al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en el Municipio de General Marín, Nuevo León, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL.

5.1 Tamaño de muestra

Se estimó el tamaño de muestra adecuado al experimento, y que representara a la población de la cual se extrajo mediante la siguiente fórmula:

$$* n = 3.84 p (1 - p) / T^2 \text{ donde:}$$

p = frecuencia del fenómeno estudiado (Resistencia a parásitos intracelulares bacterianos) en la población, cuando se desconoce este valor, el tamaño de muestra más conservador es el mayor, el cual se obtiene asignándole el valor de 50 %. Dado que la proporción de animales fenotípicamente resistentes en este hato era desconocida, se optó por asignar un valor a p de 50 %.

T = grado de precisión de la estimación (20 %: P+/- 10 %).

3.84 = valor de Z^2 para $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza de 95 %).

$$\text{Sustituyendo: } n = 3.84 (0.5) (0.5) / (0.2)^2$$

Por lo tanto: n = 24 animales. (Millan, 2000)

De cada uno de los 32 animales fueron tomadas las muestras hemáticas con forme a la disponibilidad de los mismos.

5.2 Cepas bacterianas

Los ensayos bactericidas se realizaron con las siguientes cepas:

5.2.1 Mycobacterium bovis BCG subcepa Danesa, amablemente donada por la Dra. Iris Estrada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Se utilizó para identificar a los animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.

5.2.2. Mycobacterium bovis 9926. Esta cepa llegó para tipificación al laboratorio de Diagnóstico bacteriológico del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM en Enero de 1999, procedente de Acatic, Jalisco. Fue aislada de un bovino hembra, criollo, de 8 años de edad; sacrificado en Septiembre de 1998, el cual presentó lesiones tuberculosas. Fue empleada para evaluar el crecimiento intracelular una cepa patógena e interpretarlo como un fenómeno condicionado por la actividad microbicida de los macrófagos.

De cada una de las dos cepas de *M. bovis* se hizo una cinética de crecimiento bacteriano. Para establecer el día en el cual se alcanzaría la fase logarítmica intermedia. Las cepas se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H11 (Bacto® Mycobacteria 7H11 agar, Difco Laboratorios, Detroit MI USA) con enriquecimiento OADC (BBLMT Middlebrook OADC Enrichment, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA), cuando las colonias fueron visibles se tomaron 5 de ellas y sembraron en 30 mL de medio Middlebrook 7H9 (BBL® Middlebrook 7H9 Broth base, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD USA) con enriquecimiento OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA), se incubaron por 8 días a 37 ° C con agitación constante de 100 revoluciones por minuto (r.p.m.). El cultivo obtenido se transfirió a 270 mL de medio Middlebrook 7H9 con enriquecimiento OADC y 0.5 g/L de Tween 80, se incubó en las condiciones antes descritas. A partir de este momento se considera el tiempo inicial, cada 24 h se determinó la absorbancia a 650 nm de longitud

de onda en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Baush & Lomb) por un período de 3 semanas. Se graficó el logaritmo de cada una de las lecturas de la absorbancia obtenidas.

5.2.3. Preparación de inóculos

Las cepas se crecieron hasta alcanzar la fase logarítmica intermedia y se procedió a cosecharlas. El cultivo bacteriano se centrifugó a 2500 x g por 15 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 15 mL de CRPMI (Royal Park Medicine Institute RPMI 1640; Seromed, Berlin, Germany) complementado con 10 % SFB (L-Glutamina 2 mM, MEM aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio 20 mM, suero fetal bovino 10 % (Gibco™ Invitrogen Corporation Grand Island N.Y. USA)) y se centrifugó en las condiciones antes descritas por 10 min. Este procedimiento fue repetido dos veces más. Del último lavado se retiró el sobrenadante y resuspendió en CRPMI 12 % SFB. Para dispersar los agregados de bacterias, se pasó dos veces la suspensión de bacterias a través de una jeringa con una aguja 27G x 13 mm. La suspensión obtenida se transfirió en cantidades de 1 mL a tubos con capacidad de 1.5 mL (Eppendorf, Brinkman Instruments, Inc. Westbury NY USA), se guardaron por 12 h a -20° C y posteriormente el lote de inóculos se almacenó a -80°C hasta su uso en un ultracongelador (Ultra Freezers, Nuaire, Plymouth, Minnesota USA).

5.2.3.1 Determinación de unidades formadoras colonias (UFC) del inóculo

Para determinar la cantidad de bacterias contenidas en 1 mL de suspensión bacteriana congelada, se retiró un tubo del congelador y se incubó por 60 min a 37 ° C en baño María. Posterior a esto, se colocaron 500 µL de la suspensión de bacterias en un tubo (Elkay Products, Inc. Boston Turnpike Shrewsbury, MA USA) con 4500 µL de PBS (NaCl 1.5 mM, NaH₂PO₄ 9.1 mM, Na₂HPO₄ 1.25 mM, pH 7.4 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)), se mezcló perfectamente, se tomó de este tubo 50 µL, agregó a otro tubo con 450 µL de PBS. Se siguió esta serie de diluciones decuples por 8 tubos. De las diluciones realizadas, se procedió a sembrar 100 µL de cada uno de los tubos, por

duplicado, en placas de agar Middlebrook 7H10 con enriquecimiento OADC. Las placas inoculadas se incubaron por un período de 2 a 3 semanas hasta hacerse visible el crecimiento, se contó el número de colonias, y multiplicó por el factor de multiplicación correspondiente a esa dilución. De esta forma se obtuvo la concentración del inóculo. De acuerdo a la cantidad de bacterias, se calculó el factor de dilución para alcanzar una concentración de 2×10^7 bacterias/mL, de la cual tomamos 5 μ L para infectar a 1×10^4 macrófagos.

5.3. Obtención de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica

Se colectó la muestra hemática en la forma más aséptica posible, de la vena yugular de cada uno de los 24 animales que conformaron la muestra. Para impedir la coagulación de la sangre, esta se mezcló con la solución ácido cítrico-dextrosa (ACD) ($C_6H_5Na_3 \cdot 2H_2O$ 75.5 mM, $C_6H_8O_7$ 41.6 mM, $C_6H_{12}O_6$ 135 mM, pH 5.0 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)), previamente colocada en una jeringa (Terumo Medical Corporation, Elkton, MD USA), en una proporción de 4 mL de ACD por 30 mL de sangre. En el laboratorio, se mezclaron 15 mL de la muestra de sangre con 15 mL de solución salina de fosfatos-citrato (PBS-Citrato) ($NaCl$ 1.5 mM, NaH_2PO_4 9.1 mM, Na_2HPO_4 1.25 mM, $C_6H_5Na_3 \cdot 2H_2O$ 12.5 mM, pH 7.4 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)). En 2 tubos de 50 mL (Nalge Nunc Internacional Corp., Naperville, IL USA) se colocaron 15 mL de la suspensión de trabajo de Percoll (Percoll® Amersham Biosciences AB Uppsala Sweden) (Ver anexo 1), a estos se les adicionaron los 30 mL de la sangre-PBS-Citrato, con cuidado de no mezclar ambas sustancias, para mantener dos fases; la suspensión de Percoll de trabajo en la parte inferior del tubo y sobre esta la sangre mezclada con el PBS-Citrato. Los tubos así preparados se centrifugaron a $1000 \times g$ por 20 min a temperatura ambiente. Al finalizar la centrifugación, se forman 3 fases: en la parte inferior del tubo el agregado de eritrocitos y suspensión de Percoll de trabajo, la fase intermedia leucocitos más plasma, y la fase superior plasma. De los tubos se colectó el plasma y se colocó en un tubo nuevo, el plasma se utilizó para realizar lavados a las células blancas obtenidas. Se transfirió la interfase donde estaban suspendidas las células blancas a un tubo de 50 mL, se le agregó PBS-Citrato hasta completar 50 mL. Este tubo

se centrifugó a 300 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 10 mL de plasma autólogo con una pipeta de transferencia y se adicionó hasta alcanzar 50 mL PBS-Citrato. Se volvió a centrifugar a 300 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se repitió en la misma forma una vez más el lavado de las células.

La pastilla formada del último lavado se resuspendió en 8 mL de CRPMI con 10 % de suero autólogo, esta suspensión se transfirió a un matraz de Teflón con capacidad de 50 mL, el cual se le agregó 12 mL de CRPMI sin suero, así el porcentaje de suero se redujo a 4 %, lo que facilitó la adherencia de los monocitos a la superficie del matraz. Los matraces con la suspensión de células se incubaron por 24 h a 37°C con humedad y 5 % de CO₂, al concluir la incubación, se realizó un lavado suave de la superficie del matraz con una pipeta de transferencia y se retiró del medio de cultivo, esto para desechar las células no adheridas. Se agregaron de 12 a 15 mL de CRPMI 10 % de suero autólogo, se monitorearon los matraces diariamente, si el medio tornara a color amarillento se procedía a retirar la mayor parte del medio de cultivo y agregar medio de cultivo fresco. Una vez transcurrido un período 14 días, en el cual han madurado a macrófagos, se hizo la cosecha de las células. Para ello, los matraces se colocaron en un recipiente al que se le agregó hielo hasta cubrir 2 terceras partes de los matraces, en esta condición se dejaron por un periodo de 35 min. Luego de esto, los matraces se golpearon para desprender las células. El contenido del matraz se transfirió a un tubo de 15 mL, se realizó el conteo de las células en un hemocitómetro (Neubauer, Boeco, Western Germany), en forma simultánea se centrifugó el tubo a 300 x g por 10 min a temperatura ambiente. Al terminar la centrifugación, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en una cantidad de CRPMI 10 % de suero autólogo tal que la concentración de células por 1 mL fuera de 1×10^6 células. De esta suspensión con 1×10^6 células por mL se colocaron 10 µL en 3 pozos de cada una de 4 placas de cultivo celular (HLA plates) (NuncTM, NuncTM Brand Products, Denmark), además en cada una de las esquinas de las placas se agregó una gota de agua destilada estéril para evitar la desecación de los pozos con las células. Se incubaron estas placas por 12 h a 37°C con humedad y 5% de CO₂.

5.3.1. Desarrollo del ensayo bactericida

Dos placas de cultivo celular a las cuales se les colocó en 3 pozos 10 μL de una suspensión de macrófagos con una concentración de 1×10^6 células/mL, es decir 1×10^4 células/pozo y se dejaron en incubación por 12 h a 37°C , con humedad y 5% de CO_2 ; se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos y fue sustituido por 5 μL de medio de cultivo celular con una concentración de bacterias de 2×10^7 bacterias/mL. Se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Se colocó en un pozo en el que no había células de cada una de las placas la misma cantidad de bacterias más 5 μL de medio de cultivo celular, esto sirvió como control para cada uno de los tiempos. Este procedimiento se aplicó en forma similar para las dos cepas utilizadas; *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926. Las placas se incubaron por 4 h en las condiciones antes mencionadas, antes de introducirlas a la incubadora se revisó si las gotas de agua colocadas en las esquinas no se habían secado; de ser así, se volvió a colocar más agua. Mientras tanto, se verificó la concentración del inóculo utilizado. Se agregaron 5 μL de la suspensión de bacterias a 195 μL de PBS, a partir de este tubo se realizó una serie de 3 diluciones decuples. De las diluciones se sembraron 100 μL en placas de agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC, se dispersó este volumen por toda la superficie de la placa e incubó por 2 a 3 semanas a 37°C . Una vez transcurridas las cuatro horas de incubación (Tiempo 0), a cada uno de los pozos con bacterias y células de ambas placas de cada una de las cepas de *M. bovis* se les retiró el medio con bacterias, excepto en donde no había células. Los pozos se lavaron 5 veces con 10 μL de medio de cultivo celular fresco. A los pozos de una de las cajas se le agregó de nuevo 10 μL de medio de cultivo celular. Esta caja se volvió a colocar en la incubadora por un período de 24 h, esta fue la caja de nuestro tiempo 1 (T1). Antes introducirla se observó si aún había agua en sus esquinas. En los pozos de la caja (T0), a los que no se les había colocado nada, se adicionó 10 μL de la solución de lisis (Tween 20 al 0.5 % (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA) y se dejó actuar por 10 min a temperatura ambiente. Mientras transcurrían los 10 min, del pozo donde solo había bacterias, estas se tomaron y adicionaron en un tubo en el que previamente se colocó 170 μL de PBS, se hicieron dos lavados con 10 μL de medio de cultivo celular, los cuales también fueron colocados en el mismo tubo. A partir

de este tubo se realizaron 3 diluciones decuples. De cada una de las diluciones se tomaron 100 μ L, los cuales fueron sembrados en placas de agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC. Transcurrido los 10 min, de cada uno de los tres pozos se tomaron los 10 μ L del lisado y se transfirieron a tres tubos respectivamente, cada tubo se le había colocado 170 μ L de PBS, de la misma forma que en el control, se hicieron dos lavados con 10 μ L de medio de cultivo celular. Con el procedimiento antes descrito se realizó una serie de 2 diluciones decuples de cada pozo y se sembró un volumen igual de cada una de las diluciones de los tres pozos en placas agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC, las cuales se incubaron por el mismo período de tiempo. Transcurridas las 24 h de incubación, de los pozos con células más bacterias, se tomó el medio y adicionó a tres tubos respectivamente, en los cuales se había colocado un volumen de 160 μ L de PBS. Las células de estos pozos fueron lisadas con 10 μ L de la solución de lisis por un período de 10 min. Mientras tanto se realizaron en la forma antes descrita la recuperación, dilución y siembra de las bacterias del pozo control de cada una de las dos cepas. Pasados los 10 min del período de lisis de las células, se recuperó el lisado de cada uno de los pozos y adicionó a cada uno de los tres tubos respectivos en los que se había colocado con anterioridad el medio de cultivo celular. Se hicieron los dos lavados y la serie de 2 diluciones decuples correspondientes a cada uno de los tres pozos. Se sembraron 100 μ L de cada una de las diluciones de las tres series y se incubaron. Transcurridos 21 días de incubación de las placas inoculadas se realizó el conteo de las UFC's de cada una de las cepas. Los datos obtenidos fueron capturados en una hoja de cálculo diseñada para el análisis del porcentaje de crecimiento intracelular para cada una de las cepas a las 24 h PI (Ver anexo 3).

5.3.2. Clasificación fenotípica de los animales con *M. bovis* BCG y evaluación del crecimiento intracelular de *M. bovis* patógeno

De acuerdo a los resultados de Qureshi et al. (1995) para realizar la clasificación de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos; los macrófagos que permitan el crecimiento de *M. bovis* BCG en un porcentaje superior a 65% se consideran susceptibles y los que logren reducir el crecimiento bacteriano a 65% o menos se designan como resistentes.

En el caso particular de la cepa patógena de *M. bovis*, en primera instancia se midió el porcentaje de crecimiento intracelular y posteriormente se verificó la existencia de diferencia estadística en el nivel de crecimiento intracelular de la bacteria entre macrófagos de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares con la prueba estadística de Mann-Whitney. Esta prueba es utilizada para detectar diferencias estadísticas entre dos poblaciones del mismo tamaño o diferentes, en las que el fenómeno a describir tenga como variable explicativa, una variable categórica de dos niveles (Resistentes o Susceptibles) y una variable de respuesta de tipo numérica (Porcentaje de crecimiento intracelular de la bacteria). Otro punto a mencionar es que este tipo de pruebas estadísticas no paramétricas son recomendadas en el caso que se desconoce si la media del fenómeno medido se distribuye normalmente (Spiegel et al., 2000).

5.3.3. Infección de macrófagos

5.3.3.1. Infección para extracción de ARN para medición de transcritos y obtención de sobrenadante para detección ON y arginasa

Una alícuota de 3.5×10^6 macrófagos fueron infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 usando una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Posteriormente las cajas de cultivo (cajas de 25 cm²) conteniendo a las células, se centrifugaron a 200 x g por 10 min e incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 4 h. Después de que transcurriera el tiempo necesario para la fagocitosis, las células se lavaron con PBS 1x para remover las bacterias extracelulares. Se utilizaron como controles, macrófagos sin infectar y sin estimular. Estos macrófagos fueron tratados de la misma manera para poder mantener comparaciones válidas. La obtención y la infección de los macrófagos se realizaron por triplicado de forma independiente.

5.3.3.2. Infección para realización de ensayo bactericida y supervivencia intracelular

En placas de Terasaky se colocaron por triplicado 10 µL de una suspensión de macrófagos a una concentración de 1×10^4 células/pozo, el medio se retiró a cada uno de los pozos y fue sustituido por medio de cultivo celular conteniendo 10 ng/mL de rbIL-4 durante 22 h, al término de este tiempo se volvió a sustituir el medio por medio de cultivo celular con una concentración de bacterias de 2×10^7 bacterias/mL. Se utilizó una MOI de 10:1 como control, se colocaron en un pozo sin células de cada una de las placas la misma cantidad de bacterias más 5 µL de medio de cultivo celular. Este procedimiento se utilizó de forma similar para cada una de las cepas utilizadas, *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926.

* Los macrófagos fueron estimulados por 22 h de preinfección y el tratamiento se mantuvo durante la infección.

5.4. Tratamientos

- NI (No infectados y No estimulados).
- IL-4
- LPS+IFN- γ
- IL-4 + M. bovis BCG
- IL-4 + M. bovis 9926.
- LPS + IFN- γ + M. bovis BCG
- LPS + IFN- γ + M. bovis 9926

5.5. Extracción de ARN

Variación del método de paso simple (Chomczynski, 1993).

Se decantó el medio de cultivo (Caja de cultivo de 25 cm²), y se agregaron 3ml del reactivo de lisis celular TriPure (Boehringer Mannheim) (1 ml de TriPure/10 cm²) homogenizándose con una pipeta de transferencia estéril, se depositó 1 ml del lisado en tres microtubos de 1.5 ml dejándose incubar durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TriPure mezclándose vigorosamente y se dejó incubar de 5 a 15 min, se centrifugó la muestra a 12000 X g durante 15 min; se transfirió la fase acuosa alrededor de 0.7 ml en cada uno de los microtubos nuevos, se agregaron 0.5 ml de isopropanol a la fase acuosa y se mezcló invirtiendo el tubo, se incubó por 5-10 min. a temperatura ambiente para permitir la precipitación y se volvió a centrifugar a 12000 X g durante 10 min a 4°C. Se observó la presencia de un botón blanco en el fondo del tubo al finalizar la centrifugación, se decantó el sobrenadante con cuidado de no perder la pastilla de ARN y se lavó con etanol al 75%, invirtiendo el tubo o mediante vórtex, se repitió una centrifugación a 7500 X g durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante eliminando el exceso de etanol y se dejó secar al aire, ya por último se resuspendió el pellet en agua libre de nucleasas, se dejó incubar la muestra a 60 °C durante 10-15 min y se cuantificó la pureza y concentración por espectrofotometría mediante el uso de nanodrop 1000 (Fisher Thermo Scientific Millcreek Road Marieta Ohio 45750 EUA), la muestra se mantuvo a -80 °C en alícuotas de 1-2 μ g de ARN hasta su uso.

5.5.1. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado usando 4 U de enzima transcriptasa reversa Omniscript® (QIAGEN® Valencia, CA USA) en un volumen final de 20 µl conteniendo Buffer RT (1x), mezcla de dNTPs (0.5 mM cada uno), iniciador oligo-dT (1µM), templete de ARN (1µg) y agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen necesario. La mezcla fue incubada durante 60 min a 37°C y la enzima inactivada a 95°C durante 5 min. El volumen final se ajustó a 400 µl con agua libre de nucleasas y fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

5.5.2. Cuantificación de ARNm de citocinas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-PCR)

Para la detección de las citocinas se diseñaron los iniciadores específicos (ver tabla 1) y para el control interno en el programa IDT's PrimerQuestSM desarrollado por Whitehead Institute for Biomedical Research. El PCR en tiempo real se realizó en un equipo Applied Biosystems 7300 Real-time PCR usando SYBR® Green I (10,000X Cambrex Bio Science Rockland Inc USA) como sistema de detección. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl los cuales contenían SYBR® Green I (0.165X), Buffer PCR 1X (20 mM Tris-HCL pH 8.4 y 50 mM KCl), MgCl₂ (4 mM), dNTPs (200 µM cada uno), iniciadores (0.5 nM de cada uno), Platinum® Taq ADN polimerasa (1.25 U) (InvitrogenTM São Paulo, SP Brasil) y 5 µl del ADNc diluido. Se colocaron en placas ópticas de 96 pozos (MicroAmpTM Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1-mL) después de una activación de la enzima a 95°C por 10 min bajo las siguientes, extensión a 72°C por 40 s; al final de los 35 ciclos se dio una extensión de 5 min a 72°C. Finalizado el PCR, la temperatura fue incrementando de 60°C a 95°C para construir una curva de disociación. Se colocó una reacción control sin templete de ADNc (NTC) en cada placa y cada muestra se ejecutó por triplicado, utilizando los juegos de iniciadores mostrados en la Tabla 1.

5.5.3. Método de cuantificación

Existen dos métodos para la cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real, cuantificación absoluta y cuantificación relativa. El método de cuantificación relativa fue el empleado en esta investigación, éste consiste en comparar el (threshold cycle o ciclo umbral) C_T de la muestra desconocida con una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestras provenientes de células no infectadas no estimuladas). Todas las cuantificaciones, también fueron normalizadas con un control endógeno, en este caso β -actina, para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de ARN y la eficiencia de reacción en la transcripción reversa. Este método fue seleccionado debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido.

Primero, el C_T de la muestra (C_T) y del control interno β -actina (C_T β -actina) son determinados para cada muestra. La diferencia que resulta de C_T de la muestra y C_T de la β -actina es llamada ΔC_T ; y se calcula para normalizar las diferencias en la extracción de ARN y en la eficiencia de la reacción de síntesis de ADNc.

Tabla 1. Secuencia de Iniciadores

Sentido.	Antisentido.
G3PDH 5'-CAT GTT TGT GAT GGG CGT GAA CCA-3'	3'-TAA GTC CCT CCA CGA TGC CAA AGT-5'
B-actina 5'- TGT AAA GCG GCC TTG GAG TGT GTA-3'	3'- TGC AAA GAA CAC GGC TAA GTG TGC -5'
Ínterleucina-1 β : 5'-CTA GCC CAT GTG TGC TGA AG-3'	3'-CCA CTT CTC GGT TCA TTT CC-5'
Ínterleucina-6: 5'-GCC TGA GAG CTA TTC GGA TG-3'	3'-TGC CCA GGA ACT ACC ACA AT-5'
Ínterleucina 10: 5'-ACT CTG TTG CCT GGT CTT CC-3'	3'-GAC AGG GTG CTC GCA TCT-5'
Ínterleucina 12p40: 5'-TTG CTC TCA GCA GAG AAG GTC-3'	3'-CTG CCC TCC TGA CAC TCC-5'
Ínterleucina-18: 5'-CAC GTT TCC TCT CCT AAG AAG C-3'	3'-TAC TTG TTC TGC AGC CAT CTT T-5'
Óxido Nítrico Sintaza Inducible: 5'-CCA TGG AAC ATC CCA GGT A-3'	3'-GCA GGG CGT ACC ACT TGA-5'
Proteína Quimiotáctica de Macrófago-1: 5'-CCA GAT GCA ATT AAC TCC CAA G-3'	3'-GCA TGG AGA TCT TCT TAC TGT TGA-5'
Proteína Quimiotáctica de Macrófago-2:	

5'-AAG CAG AAG TGG GTC CAG ACT-3'	3'-CTT CGG TGT TCG GGA CTT T-5'
Proteína inflamatoria de Macrófago-1: 5'- ACC ATT TGG CGC TGA CAC-3'	3'-CGA TTT TGC GAG AAA GCT G-5'
Proteína inflamatoria de Macrófago-3: 5'- GCA AGT CAG AAG CAA GCA ACT-3'	3'-TGG GGT GAA GTA TTC GTT CTG-5'
Factor Transformante de crecimiento- β : 5'- CCG AAC CTG TGT TGC TCT CT-3'	3'-CGT GCT GCT CCA CTT TTA ACT-5'
Factor de Necrosis Tumoral- α : 5'- GTG TGA AGC TGG AAG ACA ACC-3'	3'-CCC TGA AGA GGA CCT GTG AG-5'
Molécula señalizadora y act. de linfocitos 5'-AGG GGA CCA CGT GAC TTA CA-3'	3'-AGC TAT TGG TGG GAC TCA GC-5'
Receptor de manosa del macrófago 5'-GCT CAT GTC AAC TGC ATT CAA-3'	3'- GGT AAC AAG TCT TTG GAA TCT CCT-5'
Receptor scavenger 1 del macrófago 5'-TCT GTG AAG TTC GAT GCT CGC TCA-3'	3'- TTT CAG GAG CTG AGC TGC CAC TAT-5'
Receptor tipo Toll-2 5'- TCC ACG GAC TGT GGT ACA TGA AGA-3'	3'-GCT TAA AGG GAG GGT TGA AGT GCT-5'
Receptor tipo Toll-4 5'- TCA GAG TTT CCT GCA GTG GGT CAA-3'	3'-ACT AAG CAC TGG CAT GTC CTC CAT-5'

El ΔC_T de cada muestra es restado del ΔC_T del calibrador. Esta diferencia es llamada $\Delta\Delta C_T$. Por último, la expresión de la proteína en cuestión es normalizada con el control interno (β -actina) y relativa al calibrador, se calcula por $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Así, la diferencia en la expresión de la muestra se expresa como n-veces relativa al calibrador (Applied Biosystems).

Las ecuaciones para calcular $\Delta\Delta C_T$ para el método de cuantificación relativa son:

$$C_T \text{ de la muestra} - C_T \beta\text{-actina} = \Delta C_T.$$

$$\Delta C_T \text{ de la muestra} - \Delta C_T \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_T.$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}.$$

5.6. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado y de forma independiente, los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. Se utilizó la prueba de t de Student como prueba paramétrica y ANOVA de dos colas como prueba no paramétrica seguida de la prueba estadística de Bonferroni.

6. RESULTADOS

6.1. Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento mostraron que *M. bovis* BCG alcanzó su fase logarítmica intermedia de crecimiento a los 7-8 días de incubación y *M. bovis* 9926 a los 13-14 días. Se tomó la decisión de preparar los inóculos bacterianos en la fase logarítmica intermedia alcanzada en los periodos de crecimiento ya referidos para cada una de las cepas, con el objeto de tener ambos inóculos en similares condiciones de crecimiento, sin embargo, la cantidad de bacterias estimadas por UFC, obtenidas por mL de cultivo, fue menor para *M. bovis* 9926 (Figura 6).

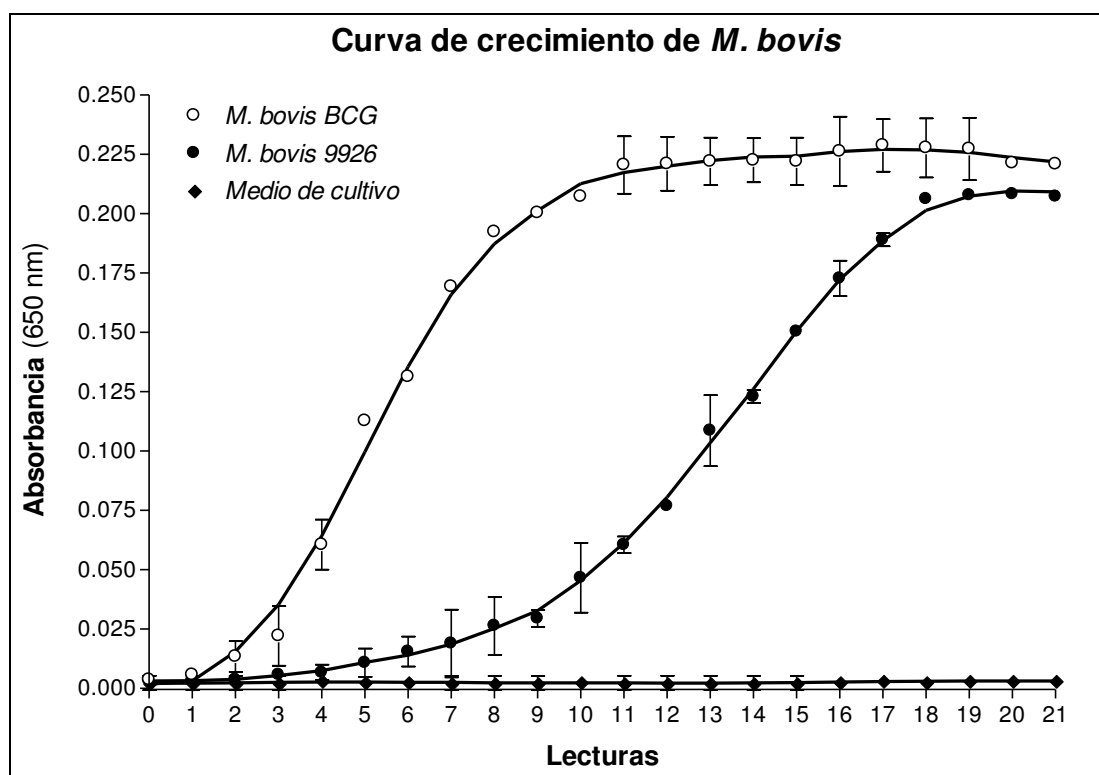


Figura 6. Cinética de crecimiento de *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926. Ambas cepas fueron crecidas en medio Middlebrook 7H9 (BBL® Middlebrook 7H9 Broth base, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD USA) con enriquecimiento OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA), incubadas a 37°C con agitación (100 rpm). Se determinó la absorbancia (650 nm) cada 24 h durante 21 días. Se graficaron los resultados de dos repeticiones, la línea de tendencia para cada una de las cepas y el control (medio de cultivo).

6.2. Macrófagos derivados de monocitos de bovino (MDMB)

Se obtuvieron macrófagos derivados de monocitos (MDM-B) de un bovino fenotípicamente resistente (MDMB-R) a patógenos intracelulares, que permitió el crecimiento de *M. bovis* BCG en el macrófago cercano al 64% y de un bovino fenotípicamente susceptible (MDMB-S), que permitió el crecimiento intracelular del bacilo más allá de 100%. La viabilidad de los macrófagos fue mayor al 90%, confirmado por la exclusión del azul de Tripán. Las características morfológicas de los macrófagos y los niveles de producción de óxido nítrico (ON) detectadas en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos, correspondieron al estado de reposo.

6.2.1. Identificación de animales naturalmente resistentes o susceptibles a parásitos bacterianos intracelulares

El objetivo de este trabajo fue lograr la identificación de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares, de acuerdo a lo descrito por Qureshi et al. (1995), para lo cual se utilizó *M. bovis* BCG subcepa Danesa como inóculo de infección de los macrófagos a una MOI 10:1, y evaluación del crecimiento intracelular a las 24 h postinfección. De los 24 animales evaluados solo los macrófagos de 3 bovinos mostraron un comportamiento que los clasifica como resistentes, es decir, permitieron un crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG menor o igual al 65%, punto de corte para la clasificación fenotípica. El resto, 21 animales se comportaron como susceptibles, lo que representa un 87.4 % de susceptibles y un 12.6 % de animales resistentes a parásitos intracelulares bacterianos (Figura 7).

6.2.2. Crecimiento intracelular de *M. bovis* patógeno en macrófagos de bovinos resistentes o susceptibles a parásitos bacterianos intracelulares

Una vez clasificados los animales fenotípicamente de acuerdo al comportamiento con *M. bovis* BCG y mensurado el crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 a las 24 h PI. Se realizó análisis estadístico del crecimiento permitido por los macrófagos de animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y una significancia de $p \leq 0.05$ (Figura 8).

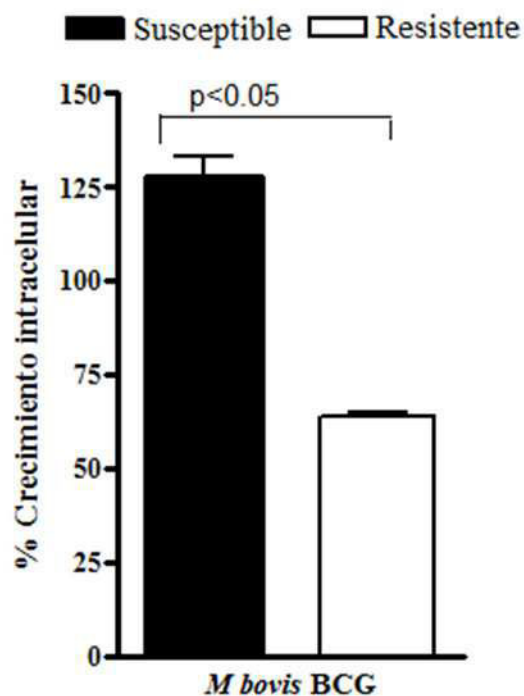


Figura 7. Porcentaje de crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG en macrófagos bovinos a las 24 h PI. De acuerdo al punto de corte de 65%, solo tres animales muestran un fenotipo resistente el resto un fenotipo susceptible.

Los resultados demuestran una diferencia estadísticamente significativa del crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 entre macrófagos de animales resistentes y susceptibles ($p \leq 0.05$). Los macrófagos de animales resistentes demostraron tener una mayor eficiencia en su actividad bactericida contra *M. bovis* patógeno en comparación a los macrófagos de animales susceptibles. Es decir, los mismos 3 animales que fueron

capaces de controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG en un porcentaje igual o menor al punto de corte para clasificarlos como resistentes a parásitos intracelulares bacterianos mantuvieron esta misma capacidad contra *M. bovis* 9926 (Figuras 7 y 8). Estos resultados sugieren que el comportamiento de los macrófagos contra *M. bovis* BCG se conserva aún, contra *M. bovis* patógeno, pero no al mismo nivel, como resultado de la participación de la virulencia de la bacteria.

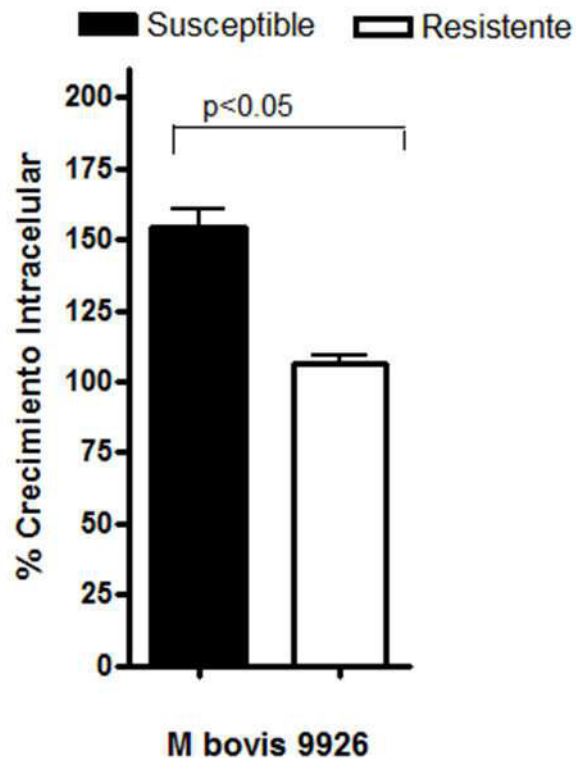


Figura 8. Evaluación del crecimiento intracelular diferencial de *M. bovis* 9926 en macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 entre macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles ($p \leq 0.05$).

La cepa patógena de *M. bovis* 9926 fue capaz de sobrevivir en un porcentaje mayor en los macrófagos de animales resistentes y susceptibles ($p \leq 0.05$) (Figura 9). A la observación microscópica de los macrófagos infectados con *M. bovis* 9926 fue más evidente la retracción de la membrana citoplásmica (4 h PI) y en casos extremos el desprendimiento de células a las 24 h PI, al comparar con lo sucedido a los macrófagos infectados con *M. bovis* BCG.

6.2.3. Inducción “in vitro” de la activación clásica de macrófagos

Las concentraciones de nitrito (NO₂) en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos, además del agrandamiento, la elongación de pseudópodos y la incrementada granularidad intra-citoplásmica de los macrófagos estimulados con las concentraciones de 1.0, 10.0 y 100.0 ng/mL de IFN- γ + LPS, mostraron diferencias significativas entre sí a partir de las 12 h de incubación y asimismo, con respecto a los macrófagos sin estimulación.

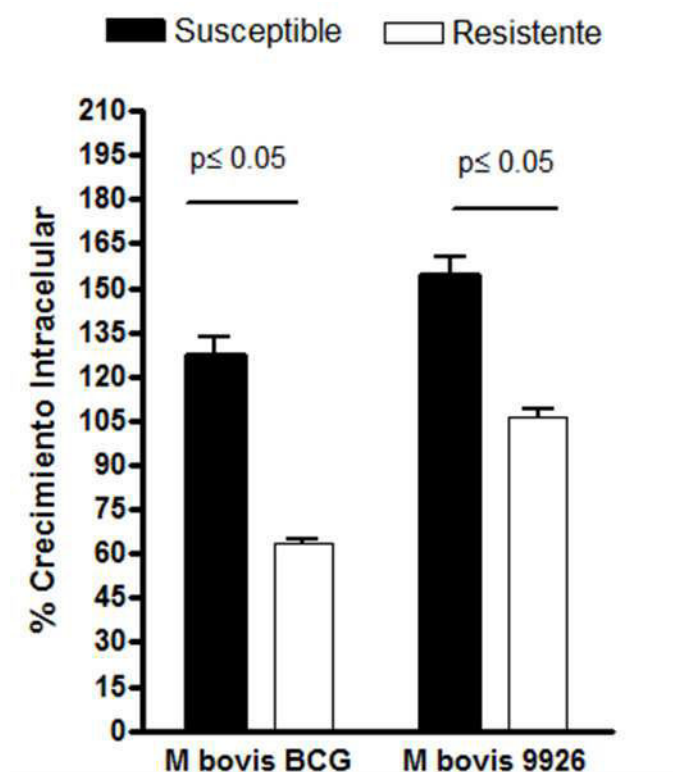


Figura 9. Comparación del crecimiento intracelular diferencial de *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 en macrófagos de bovinos a las 24 h PI. Se encontró diferencia estadística del crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 tanto en macrófagos de bovinos resistentes como susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos ($p \leq 0.05$) con respecto al mostrado por *M. bovis* BCG.

La concentración de NO₂ incrementó hacia las 24 h de cultivo de macrófagos con el IFN- γ + LPS, siendo aún más significativas las diferencias encontradas. En consecuencia, se estableció la concentración mínima de 50 ng/mL de extracto puro de LPS+ 100 ng/mL de IFN- γ , durante 22 h de cultivo para la activación de los MDMB (Figura 10).

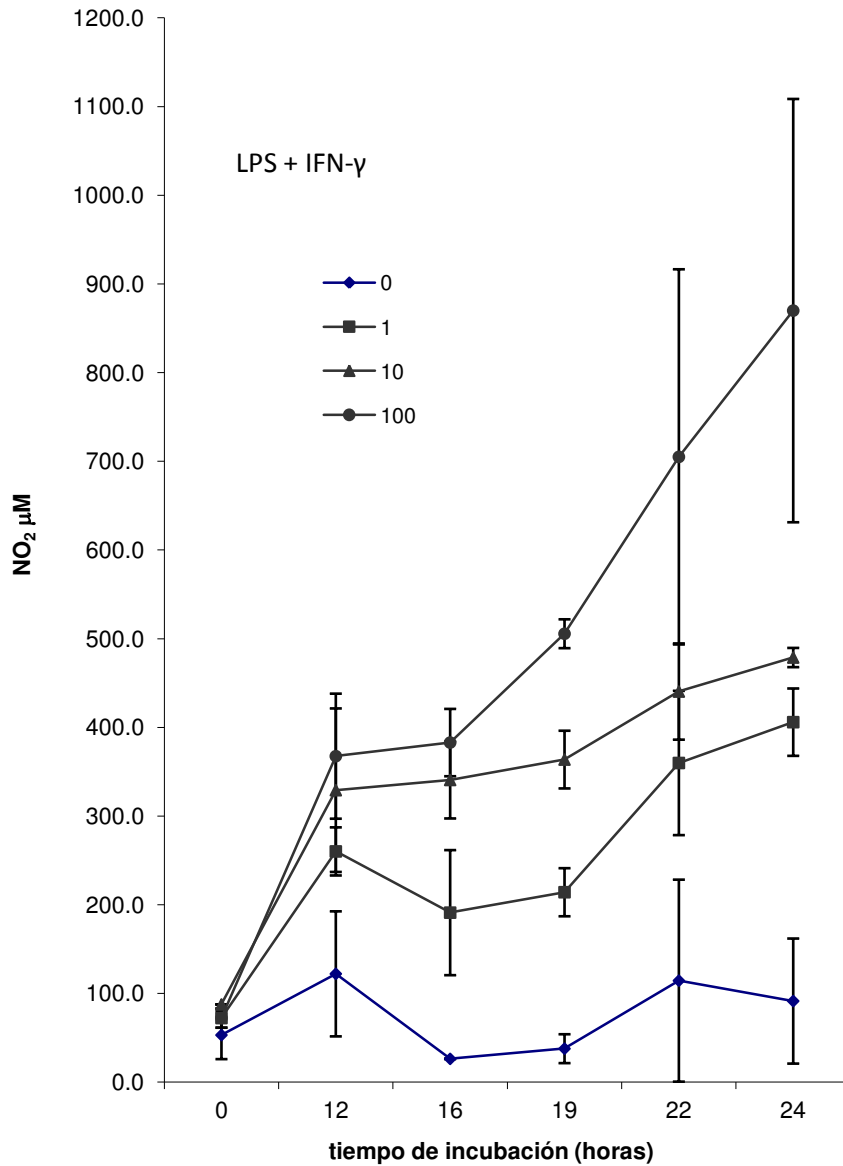


Figura 10. Efectos de estimulación de macrófagos derivados de monocitos de bovino con IFN- γ + LPS. Niveles de óxido nítrico en sobrenadante de cultivos de macrófagos de bovino a diferentes tiempos de incubación con LPS. Se incubaron las células con LPS purificado de *E. coli* O26:B6 y de Interferón gama a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 ng/mL) y un testigo sin tratamiento y se midieron las concentraciones de nitrito a diferentes tiempos por medio del ensayo de Griess. Cada punto es la media \pm error estándar de un experimento por triplicado representativo de tres independientes con resultados similares.

6.2.4. Inducción “in vitro” de la activación alterna de macrófagos.

Los macrófagos una vez cosechados en la forma antes descrita fueron depositados en cajas de cultivo celular de 25 cm² a una concentración de 3.5 X 10⁶ células y tratados con una dosis de 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml de IL-4 recombinante bovina (rbIL-4) (R&D Systems 614 MacKinley place N.E. Minneapolis, MN 55413-2610) como inductor de activación alterna, otra alícuota de macrófagos fue incubada con LPS de E. coli 026:B6 (Sigma-Aldrich CO: St. Louis MO USA) a una concentración de 50 ng/ml, otro grupo fue tratado con IFN- γ recombinante bovino a una concentración de 100 ng/ml (R&D Systems 614 MacKinley place N.E. Minneapolis, MN 55413-2610) y finalmente otro grupo con las mismas características pero sin ningún tratamiento como testigo.

Todos los tratamientos se dejaron incubando durante 22 h y al término se obtuvo sobrenadante del medio de cultivo para cuantificar la producción de óxido nítrico por medio de un kit comercial (Reactivo de Griess, Promega).

6.3. Producción de óxido nítrico (ON)

La producción de óxido nítrico (ON) se midió como indicador de activación de los macrófagos. Diferentes monocapas de macrófagos se incubaron con 25 μ g/ml de LPS e 100 μ g/ml rbIFN- γ para verificar la producción in vitro de Óxido Nítrico como indicador de activación clásica de los macrófagos, así mismo se utilizó 10 ng/ml de rbIL-4 como indicador de activación alterna (Castillo et al., 2010). Después de 22 h de incubación con 25ng/ml de LPS la concentración de óxido nítrico (ON) fue de 21.97 \pm 0.44 nM de nitritos para las células resistentes y 10.51 \pm 0.071 nM para los susceptibles mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$) entre los fenotipos y ($p \leq 0.05$) con respecto al control de no estimulados, siendo que los macrófagos de animales resistentes producen 53% y 66.9% más ON con respecto a los susceptibles y al control de no estimulados respectivamente, otro cultivo de macrófagos se incubó con la rbIL-4 donde la producción de ON fue similar sin diferencias estadísticas con respecto al control produciendo 6.58 \pm 0.58 nM de nitritos para los susceptibles y 7.56 \pm 1.03 para los resistentes, estos datos sugieren que los macrófagos de ambos fenotipos no se ven

afectados en su producción de ON por efecto de la vía alterna de activación celular. Un tercer grupo de células se incubó con 100 $\mu\text{g/ml}$ rbIFN- γ , después de las 22 h de incubación se produjeron 8.28 ± 0.071 nM de nitritos para susceptibles y de 8.13 ± 0.01 para resistentes sin diferencias estadísticas entre grupos y tampoco respecto al control. Para realizar un efecto de activación clásica lo más cercano a las condiciones naturales de infección se realizó la combinación del LPS y del rbIFN- γ , realizándose dos combinaciones una donde se utilizaba como priming el LPS y 22 h después se añadió el IFN- γ , observando que los macrófagos de animales susceptibles mostraban poca o nula producción de ON (9.70 ± 0.124) sin diferencias con respecto a los no estimulados y que los resistentes produjeron 18.48 ± 0.21 nM de nitritos mostrando diferencias altamente significativas ($p\leq 0.01$) con respecto al control y de igual manera con respecto a macrófagos de animales susceptibles produciendo 60% más ON en relación con el control y 47.5% más en comparación con los susceptibles, la otra combinación fue aquella donde se utilizó el IFN- γ como priming y 22 h después se añadió LPS encontrando diferencias muy significativas ($p\leq 0.01$) de ambos fenotipos con respecto al control y aun entre fenotipos se mantuvieron dichas proporciones siendo que los animales susceptibles produjeron 14.90 ± 0.18 nM de nitritos (52.5% más de ON en relación a los no estimulas) y los resistentes 23.23 ± 0.25 nM de nitritos (68.7% más que los no estimulados) y mostrando una $p\leq 0.01$ en relación a los susceptibles teniendo una proporción de 35.8% más. Para verificar como la IL-4 disminuye la producción de ON por competencia con la iNOS por el sustrato (L-arginina) se utilizó un grupo donde se incubo la monocapa de macrófagos con un cocktail de LPS, IFN- γ e rbIL-4 después del tiempo de incubación con los tres activadores se obtuvo el sobrenadante y se midió la producción del ON sin observarse diferencias entre los fenotipos siendo el mismo fenómeno para el control de no estimulación, este dato es interesante al observar que la presencia de la rbIL-4 disminuye o inhibe la producción de nitritos dado que el tratamiento donde no se incluyó la rbIL-4, mostró un aumento del 56.2% más de ON en animales resistentes en comparación con este tratamiento que si la contiene, aunque en dicho incidente solo se observó diferencia estadística en resistentes, sin cambios estadísticos entre susceptibles, por último se realizó un último ensayo donde se utilizó el IFN- γ como priming 22 h después se adicionó el LPS y la rbIL-4, observándose

diferencias estadísticas con respecto al control sin estimulación y entre grupos ($p \leq 0.01$) entre los grupos las diferencias entre la producción fue de 11.68 ± 0.99 para susceptibles y de 15.10 ± 0.18 nM de nitritos para resistentes con una diferencia del 22% entre grupos y de 39% de macrófagos de animales susceptibles y del 51.8% con respecto a los controles sin estimulación. Estos datos sugieren que el tipo de activación, el orden en los que se dé la estimulación del macrófago y el fenotipo animal inciden en la producción del ON y que dichas diferencias se acentúan más entre fenotipos, siendo los macrófagos de animales resistentes los que adoptan el tipo de activación dependiendo del ambiente de citocinas que se encuentre en el sitio de infección (Figura 11).

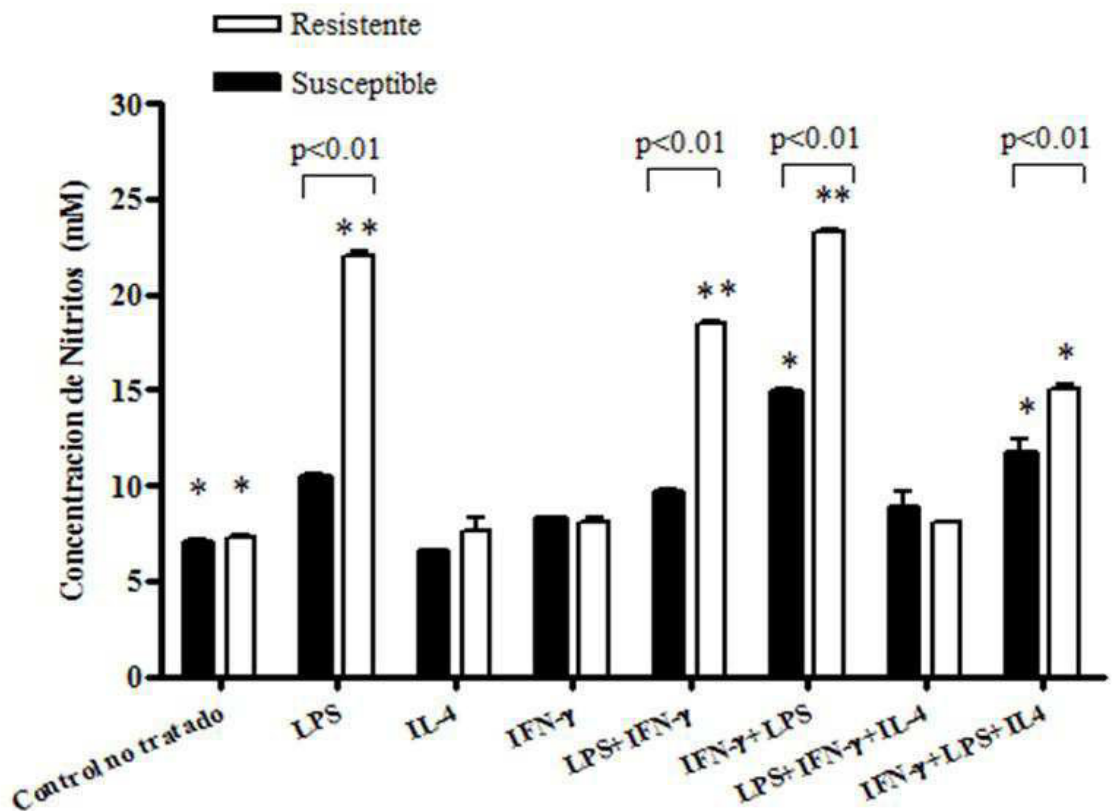


Figura 11. Producción de NO de macrófagos R y S bajo los diferentes activadores celulares de macrófagos derivados de monocitos (MDM). Los MDM se cultivaron en medio RPMI complementado + SFB10% a 37°C y CO₂ al 5% y estimulados con IFN-γ (100ug), LPS (25UG) e IL-4 (10 ug) y combinaciones de estos. Después de 22 h se colectaron los sobrenadantes para medir los niveles de nitrito producidos, como se explica en el texto, se midió NO₂ por medio del reactivo de Griess y se evaluó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm OD. Los datos representan la media + SD de las determinaciones por triplicado a partir de tres experimentos independientes. ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ en comparación con el control.

Una vez que se demostró que los macrófagos resistentes producían cantidades superiores de ON comparados con los susceptibles, se procedió a activarlos por la vía alterna mediante la incubación con Interleucina recombinante bovina (rbIL-4). La disminución en la producción de ON se utilizó como indicador de activación alterna de los macrófagos. Se tituló la concentración óptima de rbIL-4 que indujera este fenómeno. La incubación con rbIL-4 disminuyó un 20% la producción del ON en el caso de macrófagos estimulados con LPS y en un 33% en donde se combinó con el IFN- γ utilizado como inductor de activación clásica, siendo este efecto más evidente en macrófagos de animales resistentes comparados con el control negativo, lo cual evidenció la activación alterna de los macrófagos en una forma independiente al tipo de activador. Inicialmente, se utilizó una concentración de 50 ng/ml de rbIL-4 para verificar si existían diferencias en la producción de ON dadas por los diferentes tratamientos de los macrófagos (LPS, IFN- γ e rbIL-4) (Figura 11).

Una vez que se verificó que la rbIL-4 disminuía la producción de ON ($p \leq 0.0001$) se procedió a verificar cuál era la mejor concentración de rbIL-4 y que produjera el mismo efecto. La incubación con diferentes concentraciones de rbIL-4 a 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml a las 24 h demostró que no había diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas por lo que se seleccionó 10 ng/ml de rbIL-4 como la concentración de trabajo.

Por otra parte, se midió la actividad de la enzima arginasa en los sobrenadantes de los macrófagos tratados con la rbIL-4 para identificar su uso como marcador de activación alterna, sin embargo dicha producción (20 y 22 μ moles de L-arginina para macrófagos resistentes y susceptibles respectivamente) no mostró diferencias estadísticas, lo cual sugiere al menos en el modelo bovino no se podría considerar como un marcador específico de activación alterna como se ha mencionado en el modelo de ratón (Mantovanni, 2004) o bien que pudiera ser una enzima con actividad a largo plazo bajo las condiciones de activación alterna.

6.5. Índice de fagocitosis de *M. bovis* en macrófagos bovinos procedentes de bovinos resistentes y susceptibles activados por las diferentes vías de activación celular

La incubación de macrófagos bovinos con los diferentes activadores como el rbIFN- γ + LPS para la activación clásica y con rbIL-4 para activación alterna y desafiados con las diferentes cepas de *M. bovis* (BCG y la cepa 9926) mostraron diferencias en el índice fagocítico en ambos fenotipos y con ambas cepas con respecto al control aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, solamente en el tratamiento donde se activó de forma clásica y se desafió con la cepa no virulenta logro observarse una diferencia estadística baja ($p \leq 0.05$) entre fenotipos, pero no respecto al control, mostrando los macrófagos de animales resistentes un 65% más de bacterias fagocitadas en relación a los susceptibles (Figura 12).

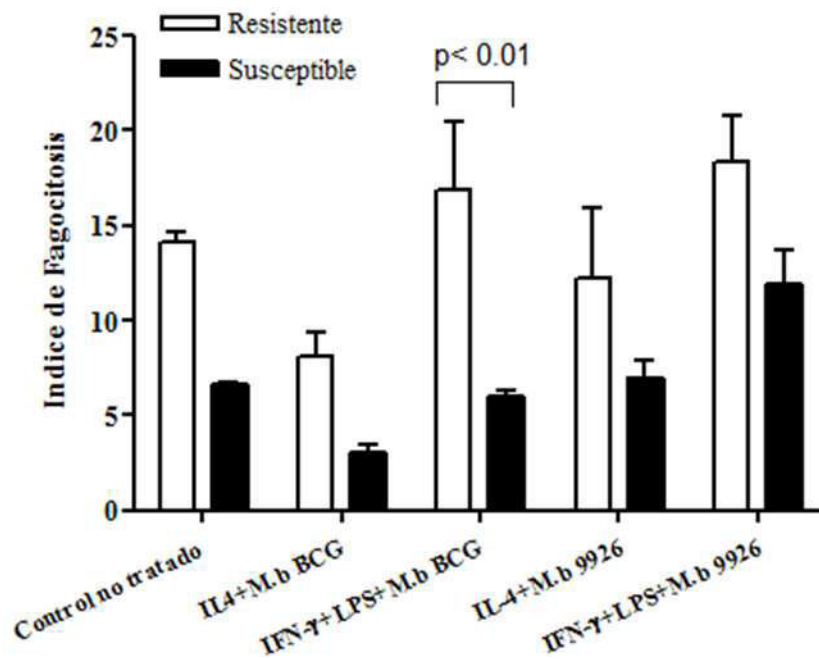


Figura 12. Índice de fagocitosis de *M. bovis* en macrófagos bovinos procedentes de bovinos resistentes y susceptibles activados por las diferentes vías de activación celular.

La incubación de los macrófagos bovinos con los diferentes activadores como el rbIFN- γ + LPS para la activación clásica y con rbIL-4 para activación alterna y desafiados con las diferentes cepas de *M. bovis* (BCG y la cepa 9926) mostraron diferencias en el índice fagocítico en ambos fenotipos y con ambas cepas con respecto al control aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, solamente en el tratamiento donde se activó de forma clásica y se desafió con la cepa no virulenta logro observarse una diferencia estadística baja ($p \leq 0.05$) entre fenotipos, pero no respecto al control, mostrando los macrófagos de animales resistentes un 65% más de bacterias fagocitadas en relación a los susceptibles. Los datos representan la media + SD de las determinaciones por triplicado a partir de tres experimentos independientes. ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$ en comparación con el control.

6.6. Índice de Supervivencia intracelular de M. bovis en macrófagos bovinos procedentes de bovinos resistentes y susceptibles activados por las diferentes vías de activación celular

Se incubaron diferentes monocapas de macrófagos de animales resistentes y susceptibles con los diferentes activadores, para la activación clásica por medio de IFN- γ y el LPS y a través de la rbIL-4 la activación alterna, se mantuvieron en incubación por un periodo de 22 h y se desafiaron con las dos cepas de M. bovis a una multiplicidad de infección de 10:1 (bacterias: macrófagos). Después de una incubación de 4 h para permitir la fagocitosis de la bacteria las monocapa de macrófagos fueron lavadas para eliminar las bacterias extracelulares y se incubaron de nuevo durante 24 h para permitir la replicación de la micobacteria y se cosecharon usando una solución de PBS-Tween 20 al 0,5%. El crecimiento bacteriano se calculó como la relación del número total de bacterias intracelulares al final del ensayo entre el número total de bacterias fagocitadas al inicio del ensayo expresándose como el porcentaje de bacterias que lograron su supervivencia. Los resultados demostraron una diferencia estadísticamente significativa del crecimiento intracelular de M. bovis 9926 entre macrófagos de animales resistentes y susceptibles ($p \leq 0.05$) sin ningún tipo de activador celular siendo este tratamiento utilizado como control de las replicación de la micobacteria, mostrando una permisividad del 177.6% para macrófagos de animales resistentes y de 246.1% para animales susceptibles. En el grupo experimental se indujeron a una activación clásica y se desafiaron con la cepa no virulenta obteniéndose una diferencia significativa $p \leq 0.01$ con respecto al control en monocitos derivados de animales resistentes y una diferencia de $p \leq 0.05$ para monocitos de animales susceptibles en comparación con el control, de igual forma se observó una diferencia de $p \leq 0.01$ entre fenotipos, con un 35% de permisividad en resistentes y de 136% para susceptibles siendo 3.8 veces mayor la permisividad de los susceptibles comparados con los resistentes, un grupo similar que se desafío con la cepa virulenta (M. bovis 9926) no se observaron diferencias significativas con respecto al control aunque si se mantuvieron las diferencias entre fenotipos con una $p \leq 0.01$, con una permisividad de 147.5% para resistentes y de 287.6% para susceptibles, siendo 0.9 veces más la proporción de la permisividad de los susceptibles,

al desafiar a los macrófagos activados de forma alterna con las diferentes cepas se observó que donde se utilizó la cepa no virulenta no se logró determinar diferencia estadísticamente significativa entre resistentes con respecto al control, dicha diferencia solo se manifestó con una $p \leq 0.01$ para susceptibles (100.3% de permisividad) y el control (246.1% de crecimiento intracelular) mostrando una proporción de 2.4 veces más del control con respecto a este tratamiento, pero al comparar entre fenotipos no se localizaron dichas diferencias, al desafiar con la cepa virulenta bajo este mismo esquema de activación, se presentó una diferencia de $p \leq 0.01$ entre fenotipos (114% para resistentes y 250.2% para susceptibles), de igual manera solo el grupo de macrófagos resistentes exhibió una diferencia de $p \leq 0.05$ con respecto a su control. Estos resultados sugieren que el comportamiento de los macrófagos contra *M. bovis* se conserva aún con la cepa virulenta, pero no al mismo nivel y que el tipo de activación celular tiene un peso preponderante en estos mecanismos de control intracelular. La cepa patógena de *M. bovis* 9926 fue capaz de sobrevivir en un porcentaje mayor en los macrófagos de animales resistentes y susceptibles, aunque los macrófagos de animales resistentes demostraron tener una mayor eficiencia en su actividad bactericida contra *M. bovis* independientemente a la virulencia o en comparación a los macrófagos de animales susceptibles (Figura 13).

6.7. Expresión de transcritos asociados a la respuesta contra *M. bovis*

Al medir la expresión de transcritos involucrados en una respuesta de tipo inflamatoria entre animales resistentes y susceptibles activados por vía alterna y clásica se encontró que para el gen de la enzima iNOS los macrófagos resistentes bajo una AC, expresaron 2702 veces más con la cepa virulenta en comparación con los activados de forma alterna mientras que estos mismo macrófagos expresaron 528 veces en relación a los susceptibles con esta vía de activación y la cepa de *M. bovis* 9926, al ser desafiados con la cepa de *M. bovis* BCG y bajo AC expresaron 51.3 veces más con respecto a los susceptibles, y una diferencia de 4.8 veces más entre macrófagos de susceptibles bajo la AA (Tabla 2).

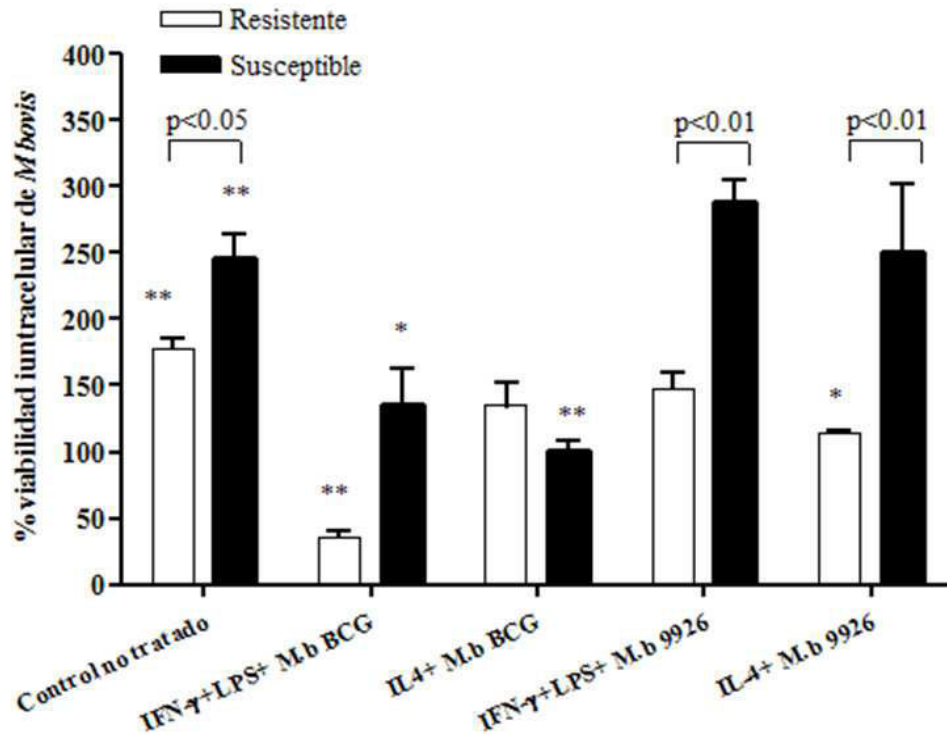


Figura 13. Índice de supervivencia intracelular de *M. bovis* en macrófagos bovinos procedentes de bovinos resistentes y susceptibles activados por las diferentes vías de activación celular. Un segundo conjunto de células se trató como se ha descrito previamente. Después de 4 h se lavaron las monocapas de macrófagos para eliminar las bacterias extracelulares y se incubaron de nuevo durante 24 h y se cosecharon usando Tween 20 al 0.5%. El crecimiento bacteriano se calculó como la relación del número total de bacterias intracelulares al final del ensayo entre el número total de bacterias en el inicio del ensayo expresado como porcentaje. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los tratamientos $p \leq 0,05$. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

En el caso del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), se encontró que bajo una AC los R expresan 7.4 veces más con la cepa de *M. bovis* 9926 y de 5 veces más con la cepa BCG, bajo un esquema de AA los resistentes expresaron 16 veces más este gen con relación a los susceptibles para la cepa virulenta, aunque bajo este esquema de activación (AA) los susceptibles expresaron 11 veces más respecto a los resistentes con la cepa no patógena, al comparar entre los diferentes tipos de activación se encontró que los R bajo una AC expresan 1.6 veces más el gen en comparación con R bajo la AA desafiados con la cepa virulenta y 28 veces más para la no virulenta, mientras que los S

con la AC expresaron 9 menos que con la AA para la cepa BCG y 3.6 veces más para la cepa virulenta.

Tabla 2. Unidades Relativas de Expresión (URE) de citosinas y quimiocinas asociadas a la respuesta inmune en macrófagos Resistentes y Susceptibles activados por las diferentes vías de activación celular y desafiados con la cepa no patógena de M bovis BCG y la cepa virulenta de M bovis 9926 a una multiplicidad de infección de 10:1.

Cepa	Activación Clásica				Activación alterna			
	M bovis 9926		M bovis BCG		M bovis 9926		M bovis BCG	
Fenotipo	Resistentes	Susceptibles	Resistentes	Susceptibles.	Resistentes.	Susceptibles.	Resistentes.	Susceptibles.
iNOS	2702.15	5.11	6055.39	118.20	0.77	0.92	0.82	3.94
IL-1 β	10974.19	27.37	19135.92	152.43	4.51	22.92	3.60	17.35
ARG II	1246.09	1.16	1558.35	2.82	1.04	8.87	7.88	84.07
TNF- α	43.88	5.93	202.32	40.39	26.16	1.63	7.03	78.03
TGF- β	1.93	3.52	1.09	9.05	0.76	0.50	4.81	0.82
MIP-1	101.14	2.82	195.37	2.68	3.21	3.58	284.89	11.35
MIP-3	863.75	464.85	1168.03	270.58	3.47	14.01	0.80	1.35

Para el gen de la IL-1 β se encontró que bajo una AC los R expresan 400 veces más con la cepa de M. bovis 9926 y de 125 veces más con la cepa BCG, bajo un esquema de AA los susceptibles expresaron 5 veces más este gen con relación a los resistentes para la cepa virulenta y 4.8 veces más con la cepa no patógena, al comparar entre los diferentes tipos de activación se encontró que los R bajo una AC expresan 2433 veces más el gen en comparación con R bajo la AA desafiados con la cepa virulenta y 5315 veces más para la no virulenta, mientras que los S con la AC expresaron 9 veces más este transcrito en comparación con los activados de forma alterna desafiados con la cepa BCG sin diferencias entre ellos con la cepa de M. bovis 9926 (Figuras 14, 15 y 16).

Así mismo se cuantificó la expresión de ARNm de citocinas involucradas en procesos anti-inflamatorios como es el factor del crecimiento transformante beta (TGF- β) expresándose 2.5 veces más entre R desafiados con la cepa virulentas y de 2.5 veces menos con la cepa BCG mientras que los susceptibles expresaron 7 veces más con la cepa de M. bovis 9926 y 11 veces más para la cepa BCG bajos los diferentes tipos de activación celular, ya dentro del mismo tipo de activación celular es decir la activación clásica los S expresaron 1.8 veces más respecto a los R para la cepa virulenta y 8.3 veces

más para la cepa BCG, mientras que bajo un esquema de Ac Alternativa los R expresaron 5.8 veces los R en comparación con los susceptibles para la cepa de M. bovis BCG, sin diferencias con la cepa virulenta.

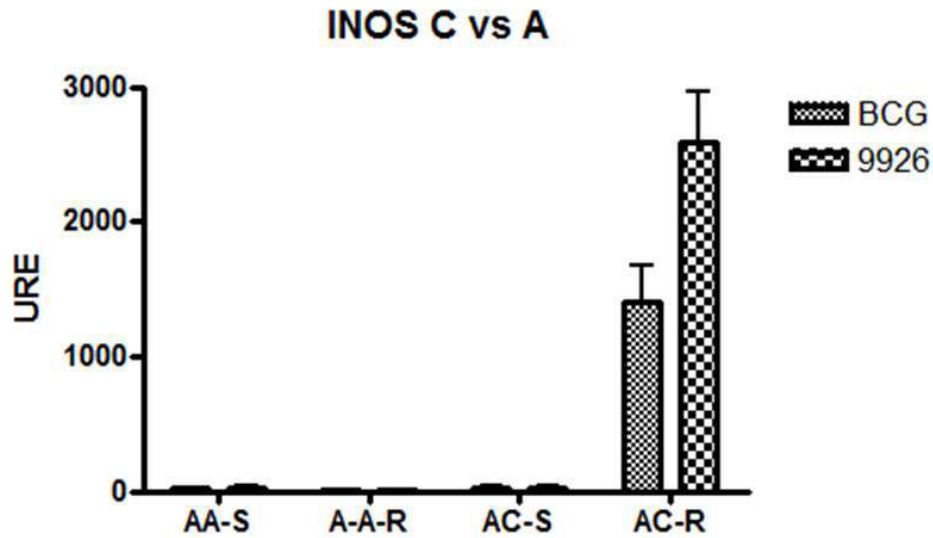


Figura 14. Expresión diferencial de la enzima Oxido Nítrico Sintaza inducible (iNOS II) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de M. bovis (8 horas de incubación). AC= activación clásica, AA=activación alterna, R= Resistente, S= susceptible.

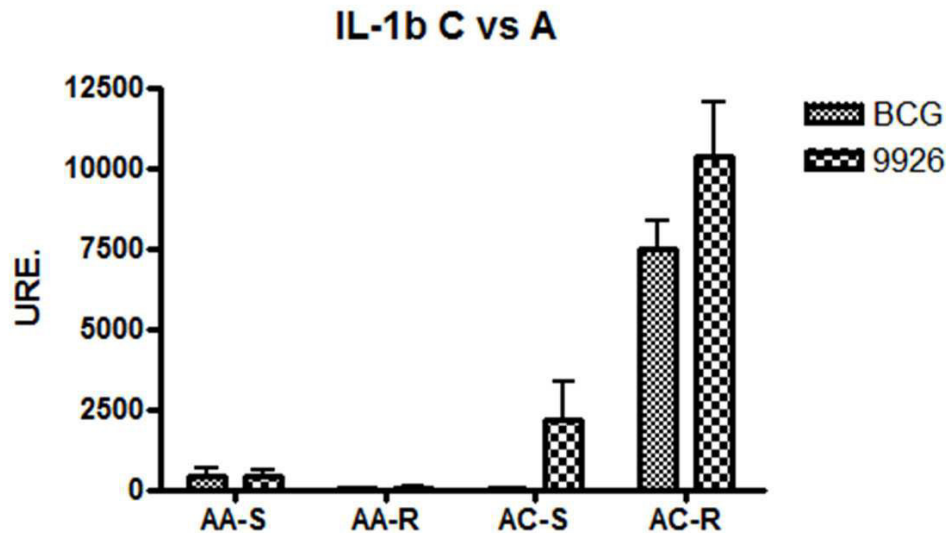


Figura 15. Expresión diferencial de la Interleucina 1 beta (IL-1 β) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de M. bovis (8 horas de incubación). AC= activación clásica, AA=activación alterna, R= Resistente, S= susceptible.

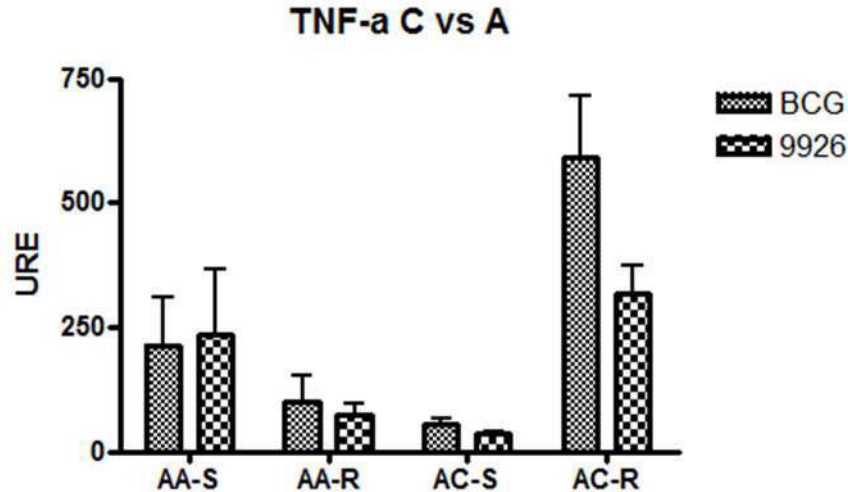


Figura 16. Expresión diferencial del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de *M. bovis* (8 horas de incubación). AC= activación clásica, AA=activación alterna, R= Resistente, S= susceptible

También se cuantificó la expresión de la enzima Arginasa II como precursor de moléculas involucradas en reparación celular y competidor por el sustrato con la iNOS, observándose que mediante la vía clásica los R expresaron el gen 1074 y 552 veces más en comparación con los susceptibles al ser desafiados con la cepa de *M. bovis* 9926 y *M. bovis* BCG respectivamente. Bajo un esquema de activación alterna se obtuvo que los S expresaron 8.5 y 11 veces más con la cepa 9926 y BCG respectivamente con relación a los Resistentes, al comparar entre fenotipos se encontró que los R expresaron 1198 veces y 8.5 veces menos con la activación clásica y la alterna respectivamente al ser desafiados con la cepa virulenta, y 552 más con la activación Clásica y 10.6 veces menos bajo la Ac alterna con la cepa BCG. Y los susceptibles 7.6 y 29.8 veces más con la cepa virulenta entre la activación Clásica y la Alterna respectivamente al ser desafiados con la cepa BCG, al comparar con la cepa virulenta se encontraron diferencias en la expresión de 2.4 y de 9.4 entre la activación clásica y la alterna (Figuras 17 y 18).

De igual forma se pondero la expresión de quimiocinas, por parte del macrófago para el caso de la proteína inflamatoria del macrófago 1 (MIP-1), se encontró que los R bajo un esquema de activación clásica expresaron 35.8 y 72.8 veces más en comparación con los susceptibles desafiados con la cepa virulenta y la no virulenta respectivamente, de igual

forma bajo un esquema de Ac alterna solo se observó una diferencia en la cepa BCG entre resistentes y susceptibles de 25 veces más entre estos.

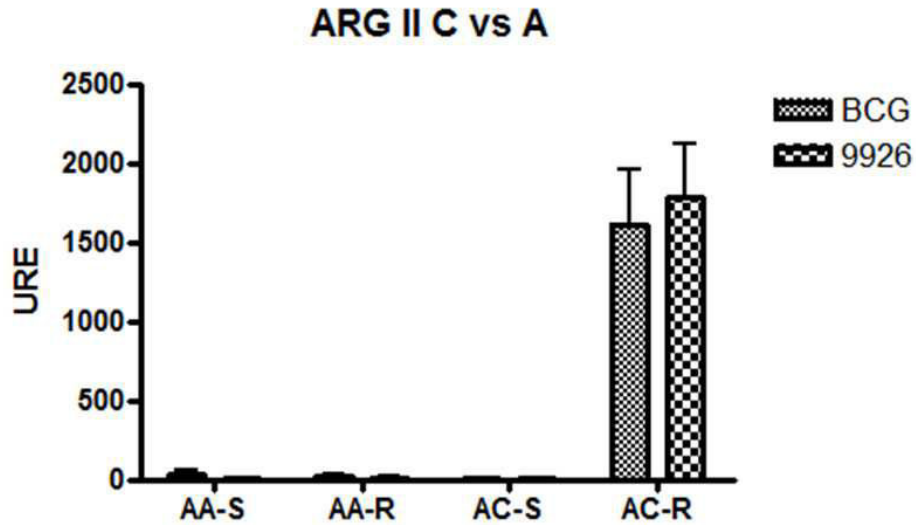


Figura 17. Expresión diferencial de la enzima Arginasa II (ARG II) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de *M. bovis* (8 horas de incubación). AC= activación clásica, AA=activación alterna, R= Resistente, S= susceptible.

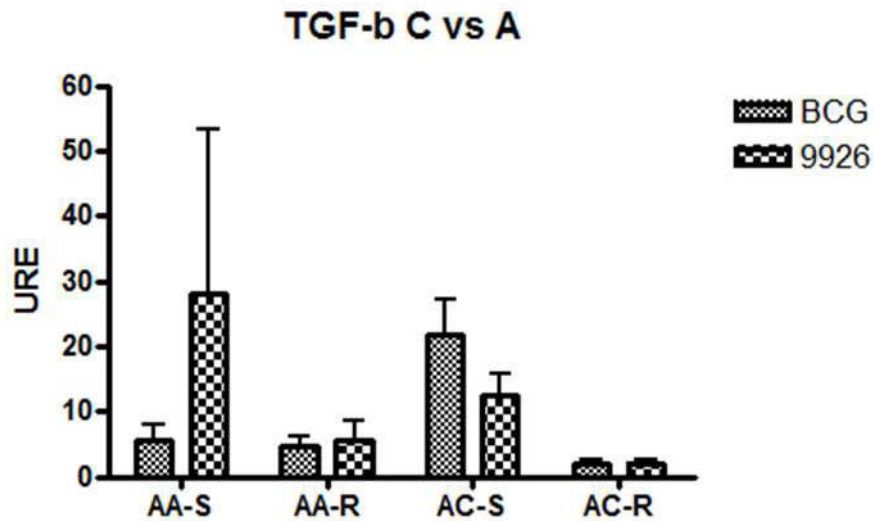


Figura 18. Expresión diferencial del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de *M. bovis* (8 horas de incubación). AC= activación clásica, AA=activación alterna, R= Resistente, S= susceptible.

Al comparar entre tipos de activación se obtuvo que los Resistentes bajo la activación clásica y desafiados con la cepa virulenta expresaron 31.5 veces más que en la activación Alterna y para la cepa BCG mostraron 1.4 veces menos por efecto del tipo de activación, y los susceptibles solo en la activación alterna desafiados con la cepa BCG mostraron un aumento de 4.2 veces más que los estimulados por vía clásica, sin diferencias en la activación clásica, mientras que para la Proteína Inflamatoria del Macrófago 3 (MIP-3), se observó que los Resistentes activados de forma clásica exhiben 1.8 y 4.3 veces más en comparación con los susceptibles desafiados con la cepa virulenta y la no virulenta respectivamente, sin embargo al ser estimulados por vía alterna solo se observó un aumento con la cepa virulenta de 4 veces más respecto a los susceptibles sin diferencias con la cepa BCG. Al comparar entre tipos de activación se encontró que los R desafiados con la cepa virulenta y estimulados de forma clásica expresaron 248 veces más que estimulados por vía alterna observándose una proporción de 83 veces más con la cepa BCG en la activación Clásica respecto a la alterna, y los susceptibles expresaron 33 más con la cepa virulenta entre el tipo de activación clásica y alterna y 200 veces con la cepa de *M. bovis* BCG (Figura 19 y Tabla 2).

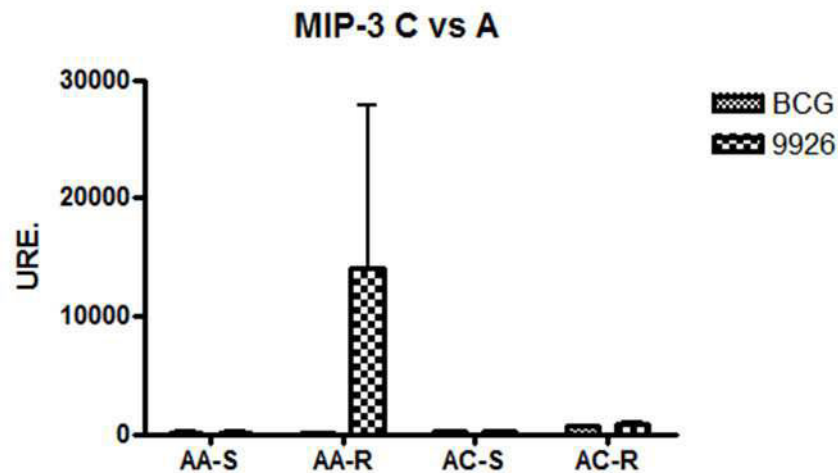


Figura 19. Expresión diferencial de la quimosina Proteína Inflamatoria del Macrófago 3 (MIP-3) entre animales susceptibles y resistentes bajo los diferentes esquemas de activación celular desafiados con las diferentes cepas de *M. bovis* (8 horas de incubación). AC= activación clásica, AA=activación alterna, R= Resistente, S= susceptible

7. DISCUSIÓN

La metodología del ensayo bactericida permitió identificar en forma genotípica la resistencia o susceptibilidad a parásitos intracelulares bacterianos. Sin embargo, este ensayo está sujeto a la influencia de una serie de variables que afectan los resultados. Por un lado se observó que el inoculo bacteriano almacenado en la forma descrita pierde viabilidad, por lo que la cantidad de bacterias que son contabilizadas en los controles del inoculo de cada ensayo se reduce paulatinamente. Esto genera diferencias en las MOI entre ensayos; una forma de corregir dicho problema es la cuantificación continua cada 6 a 8 semanas del inoculo bacteriano. Durante el ensayo el procedimiento más crítico son los lavados para retirar las bacterias no fagocitadas. La posibilidad de dejar bacterias viables adheridas a las células es mayor cuando se realizan solo lavados, que cuando se trata a las bacterias extracelulares con un antibiótico al que son susceptibles, sin embargo, el largo tiempo de incubación requerido con el antibiótico y su posible ingreso a la célula hacen poco factible su uso en este ensayo (Parish and Stoker, 1998; Clark and Bavoil, 1997; Desjardin et al., 1999). Dada esta condición de no discriminar a las bacterias adheridas de las fagocitadas, las primeras fueron consideradas como bacterias intracelulares en este ensayo. Otro punto a considerar es la necesidad de una estandarización suficiente de la repetibilidad entre e intraensayos. Una amplia ventaja de este ensayo, al compararlo con otros modelos de evaluación de resistencia en donde se desafía al animal con cepas virulentas de microorganismos, es que en este solo utiliza una fracción del individuo lo que hace más practica la evolución y de menor riesgo al poder ser manejada en áreas exclusivas para el manejo de agentes infecciosos; sin embargo, el costo y el tiempo son factores que hacen poco práctico la aplicación del ensayo a poblaciones amplias de bovinos. Se hace necesario encontrar una metodología más rápida y en lo posible más económica para la identificación fenotípica del ganado. Una alternativa es generar bacterias con genes reporteros como el de la proteína verde fluorescente que permitan contabilizar en forma más rápida a través de microscopia de fluorescencia o cartometría de flujo la cantidad de bacterias fagocitadas, así como el número de las mismas que permitan los macrófagos su crecimiento a las 24 h PI. Una ventaja adicional es la menor manipulación de bacterias vivas, puesto que en ambas metodologías se puede utilizar células y bacterias ya fijadas, implicando un nulo riesgo

de infección durante la lectura del ensayo. Uno de los posibles inconvenientes es el requerimiento de una mayor cantidad de células para este ensayo; esto se puede solucionar con la previa centrifugación de la sangre colectada con la solución ACD y recuperación de la capa flogística para ser sometida a la centrifugación isopícnica. De esta forma, es mayor la cantidad de células obtenidas con un menor uso de material y soluciones. Por otro lado, la cantidad de ensayos será mayor por el lapso de tiempo en comparación al utilizar el plaqueo como metodología para contabilizar las bacterias. Esto conlleva poder aplicar este ensayo a poblaciones más grandes de bovinos con el fin de identificar en manera fenotípica la resistencia a parásitos intracelulares bacterianos.

El ensayo bactericida con *M. bovis* BCG subcepa Danesa logró identificar en esta muestra de 24 animales tomados de acuerdo a la disponibilidad de los mismos para su uso en el experimento, resistencia a parásitos intracelulares bacterianos. De los 24 animales evaluados, solo en 3 de ellos se encontró un comportamiento de sus macrófagos que los clasifiqué como resistentes a parásitos intracelulares (Figura 7). En forma estadística el tamaño de la muestra es representativa del hato de donde se extrajo, sin embargo, los animales no fueron tomados al azar lo cual puede inducir cierto grado de tendencia de los resultados, en los que se muestra que los resistentes representan el 12.6% de la población, se refiere que en una población que no ha sido sometida a selección intencionada para la resistencia a intracelulares es posible encontrar un 20 % de animales resistentes (Feng, 1999).

La subcepa de *M. bovis* BCG utilizada en este trabajo es una variable que puede explicar la no coincidencia de lo obtenido con lo previamente reportado. *M. bovis* BCG en sus diferentes subcepas es capaz de mostrar comportamiento variable que tienen como origen la pérdida en algunas de ellas de regiones de ADN genómico (Mahairas et al., 1996; Behr and Small, 1999; Behr, 2001).

Otro factor que puede hacer variar la proporción resistentes-susceptibles es la presencia o ausencia de la enfermedad en el hato, factor que no ha sido evaluado y que puede explicar una proporción menor de resistentes en un hato libre de tuberculosis y brucelosis bovina, ya que la presencia del agente patógeno en una población induce una presión de selección que genera la permanencia de los individuos mejor capacitados para resistir la infección (Bellamy, 2003).

Los porcentajes de crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 a las 24 h PI en los animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares demostraron diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Los macrófagos obtenidos de animales resistentes permitieron la sobrevivencia y crecimiento intracelular de *M. bovis* patógeno en un porcentaje menor que los susceptibles. La actividad bactericida de los macrófagos de los animales resistentes se conserva aún contra la bacteria patógena (Figura 8). Sin embargo, al comparar los porcentajes de crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 se denota que la cepa patógena tiene mayor capacidad de sobrevivir a los mecanismos bactericidas de los macrófagos, capacidad previamente observada por Aldwel et al. (2001) en macrófagos derivados de pulmón y en la observación microscópica de las células infectadas se encontró mayor número de macrófagos con morfología redondeada al ser infectadas con *M. bovis* 9926. Estos datos sugieren la posibilidad de utilizar el ensayo bactericida con esta cepa patógena para identificar la resistencia a *M. bovis*. No sin antes establecer un punto de corte mayor al establecido para la cepa de *M. bovis* BCG, que permita clasificar resistencia o susceptibilidad a *M. bovis* patógeno, ya que estos resultados concuerdan con lo ya previamente observado; en donde se muestra que existe diferencia en el crecimiento intracelular de *M. bovis* patógeno en macrófagos de animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos (Gutiérrez-Pabello and Adams, 2003).

Se sabe que el macrófago puede adoptar un fenotipo de activación alterna así como de activación clásica bajo condiciones naturales dependiendo el tipo de célula presentadora de antígeno que se trate, influyendo entre otros factores el ambiente de las citocinas que se esté dando en el momento de la infección, dicho fenotipo de activación puede estar siendo afectado por el tipo de antígeno o patógeno, la regulación mediada por citocinas a partir de células T diferenciadas, la concentración del antígeno y la afinidad por el receptor de la célula T y el nivel de señales co-estimuladoras liberadas por la interacción de la célula presentadora de antígeno y el linfocito T, que como consecuencia resultará en la regulación mediada por el sistema inmune.

La importancia del tipo de activación del macrófago radica en que de ella dependerá el tipo de respuesta que se montará ante la infección, por una parte una activación clásica proveerá de una respuesta netamente pro-inflamatoria con la producción de citocinas del

tipo Th1 encaminadas a la activación del sistema inmune para eliminar o controlar la infección y por otro lado se podría dar una respuesta de activación alterna con citocinas del tipo Th2, la cual estará encaminada a la reparación de tejido, delimitación del daño causado por la respuesta inflamatoria, adicionalmente algunos autores han mencionado que puede actuar en la contención de la infección ya proporciona un mayor soporte a los granulomas ya formados.

Aunque no se conoce a ciencia cierta la función de algunos genes que regulan esta polarización en el macrófago debido a que las investigaciones están más orientadas a la diferenciación a nivel de linfocitos, se podría hipotetizar que dichos genes actúan de manera similar tanto en el linfocito, como en el macrófago. En primer lugar va a depender del estímulo que se dé a la célula presentadora de antígeno, por un lado un estímulo dado por el IFN- γ , la IL-12 o por LPS y por otro lado un estímulo derivado de la IL-4 o IL-13.

De este tipo de estímulos van a depender los factores transcripcionales que regulen la señalización intracelular y por lo tanto los genes que se transcriban modificando el fenotipo que adoptara el macrófago. Por un lado la activación clásica influenciada por el efecto de la IL-12 mediante la activación de stat4, que a su vez activara la producción de IFN- γ el cual induce a través de la vía de stat1 para activar al factor de activación t-bet que se asocia con el factor de transcripción HLX, para incrementar la expresión de IFN- γ y de la subunidad $\beta 2$ del receptor de IL-12. A su vez el ON también induce esta diferenciación ya que estimula la expresión de IL-12R $\beta 2$ el cual favorece la producción de IL-12 y por lo tanto la expresión de t-bet formándose una retroalimentación positiva, desencadenando la subsecuente translocación del factor nuclear $\kappa\beta$ al núcleo y finalmente la activación de genes pro-inflamatorios.

Una activación alterna está dada por la señalización vía stat6 activando al factor regulador 4 del IFN- γ (IRF4), dichos factores regulan la expresión del factor GATA-3 que es indispensable para promover cambios a nivel de la cromatina y la subsecuente activación de factores nucleares como es c-MAF y NFAT1 (Lohoff et al., 2005; Glimcher and Murphy, 2000; Van Ginderachter et al., 2006). Dichos eventos sugieren que en el macrófago se da una regulación transcripcional similar al dado por el efecto de

las citocinas que estimulan al macrófago, ya que dependiendo del estímulo será el fenotipo celular que desencadenará el macrófago.

El primer paso en esta investigación fue inducir el efecto de la activación alterna en los macrófagos; esto se logró por medio de la rbIL-4 utilizando como marcador de activación la producción de ON en el sobrenadante de las células en monocapas. Diferentes estudios han reportado la competencia por la L-arginina entre la enzima iNOS y la enzima arginasa disminuyendo en una activación alterna la producción del ON y la expresión de receptores de superficie celular como el MMR y el MSR (Mosser, 2003; Gordon, 1999; Mantovani et al., 2004; Goerdts et al., 1994).

La incubación con rbIL-4 disminuyó la producción de ON inducida por el LPS bacteriano a nivel basal. De igual forma sucedió al utilizar el rbIFN- γ y la combinación del LPS con el rbIFN- γ , este efecto de antemano se esperaba por la competencia que hay por el sustrato que utiliza el macrófago entre la enzima arginasa y la óxido nítrico sintasa inducible en este caso la L-arginina, dado que dicho sustrato es utilizado por ambas enzimas. En el caso de la activación alterna dicho sustrato es requerido para la producción de poliaminas y prolina como precursor de colágena, así como la producción de proteínas de matriz extracelular como es MMP-9, MMP12, β IG-H3 las cuales están relacionadas con eventos de reparación celular y formación de tejido de reparación. Por otra parte en la activación clásica, la iNOS utiliza el mismo sustrato para la formación de ON, el cual es de suma importancia en la eliminación de patógenos intracelulares y la promoción de una respuesta inmune de tipo Th1.

Un aumento en la producción de arginasa también se ha reconocido como un indicador de activación alterna en el modelo murino, no obstante, bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación no se encontraron cambios en la concentración de dicha enzima. Esto podría deberse a la poca duración de nuestros experimentos, la baja concentración de ésta en el sobrenadante o al método de detección (Kit comercial), aunque a nivel de transcritos se encontraron diferencias a nivel de expresión de dicha enzima bajo el esquema de activación alterna con diferencias entre los fenotipos con un promedio de 12 veces más expresión en macrófagos de animales resistentes sobre macrófagos de animales susceptibles aunque esto sólo a nivel de expresión de ARNm. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que en el modelo

bovino la producción de arginasa no podría ser considerada como marcador específico de activación alterna o al menos a nivel de proteína.

En cuanto a la expresión de citocinas se manifestó la formación de patrones expresados por el puro efecto de la estimulación con rbIL-4, tal es el caso de la ARG II, MIP-1 y MCP-1 en ambos fenotipos, que en animales resistentes la expresión fue superior en comparación a los susceptibles. En cuanto a la expresión de otros patrones, se observó que el efecto dado por la presencia de la micobacteria aumentó la expresión de citocinas pro-inflamatorias, donde se preestimuló y se enfrentó a *M. bovis* BCG y se produjo una alta expresión de IL-1b, TNF- α e iNOS, expresándose las mismas citocinas con la cepa de *M. bovis* 9926, siendo menor esta expresión en animales resistentes con respecto a lo mostrados por animales susceptibles.

Esto sugiere que los macrófagos de los animales resistentes montan una mejor respuesta ante diferentes estímulos, en este caso sería activación alterna o clásica, basándonos en resultados anteriores (Aranday, comunicación personal) donde se ha logrado observar que cuando se les estimula de forma clásica la expresión es mayor en macrófagos de animales resistentes, y que bajo condiciones de activación alterna no se muestra una expresión de las proteínas inflamatorias del macrófago (MIP-1 y MIP-3) e IL-12p40 las cuales solo se observan en presencia de la cepa virulenta no así para la cepa de *M. bovis* BCG sugiriendo que dicha expresión podría depender de factores de virulencia que solo están en la cepa de *M. bovis* 9926 o que dicha virulencia favorece una respuesta inmune del tipo pro-inflamatorio.

También se logró observar una disminución en la expresión de todas las citocinas y quimiocinas asociadas a procesos inflamatorios donde se mantuvo la estimulación con la rbIL-4, los macrófagos infectados con la cepa virulenta aumentaron la expresión del TNF- α , IL-1b, iNOS y de manera específica la IL-12p40, siendo estos procesos más significativos en animales resistentes que en susceptibles. Estos datos obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Aldwell (2001) donde muestran diferencias en la expresión relacionada a la virulencia de la cepa utilizada siendo que la IL-1, TNF- α e IL-6 se expresan solo con cepas vivas mientras que la cepa virulenta aumenta esta expresión en comparación con la cepa de *M. bovis* BCG, sin diferencias en la supervivencia entre cepas a las 24 h de infección aunque a las 72 y 96 h la cepa

virulenta muestra una mayor replicación intracelular, evaluando la viabilidad del macrófago sin encontrar diferencias entre cepas ni entre MOI's a las 24 h de infección. Estos resultados parecieran apoyar los obtenidos en el presente trabajo donde observamos que bajo el tipo de activación alterna las diferencias en cuanto a expresión, supervivencia intracelular y apoptosis a tiempos tempranos de infección no son tan evidentes como los mostrados por otros autores (Aldwell, 2001) sugieren que muchos de los eventos que estudiamos no muestran resultados significativos a tiempos tempranos dado que en el presente trabajo se manejaron tiempos máximos de 24 h de infección, siendo que posiblemente no se dio el tiempo suficiente para evidenciar dichos eventos, aun así, se mantienen las diferencias entre fenotipos y el mantener la estimulación aumenta dichos mecanismos.

Otros autores ya han mencionado de igual manera que las cepas virulentas aumentan la expresión de citocinas y quimiocinas aunque no mencionan diferencias en cuanto al tipo de activación o fenotipo de resistencia. Wedlock (Wedlock, 2006) menciona que las cepas virulentas manifiestan una replicación intracelular superior a la cepa BCG y que la regulación a nivel de citocinas es diferente entre rumiantes y otros modelos como el murino y en el humano.

Un ejemplo de regulación a nivel de citocinas y su interacción en los macrófagos bajo un desafío con *M. bovis*, se observa en el trabajo de Boddu-Jasmine quienes a diferentes MOI's mencionan que citocinas como IFN- γ y TNF- α aumentan el nivel de expresión de forma MOI dependiente, aunque otras como IL-4 e IL-10 también aumentan y en esa medida los niveles de TNF- α disminuyen, al ser controlados por las citocinas anti-inflamatorias (Boddu-Jasmine, 2008).

En el presente trabajo no fue posible determinar ese efecto ya que las diferencias dadas por el fenotipo de resistencia fueron muy evidentes, lo cual muestra que de alguna manera el fenotipo modifica la regulación entre citocinas, ya que citocinas que actúan como anti-inflamatorias en el modelo murino no parecieran funcionar de igual forma en el bovino. Por otro lado algunos autores han demostrado que en los macrófagos pre-estimulados con antígenos específicos de la micobacteria en especial las proteínas de secreción ESAT-6 y CFP-10 muestran una respuesta inmune más específica, es decir, un efecto inflamatorio específico dado por la estimulación con dichas proteínas y que los

niveles de citocinas expresados bajo este esquema son menores en comparación con los observados donde se pre-estimula con el PPD bovino el cual contiene un gran número de péptidos que desencadenan una respuesta inespecífica, mencionando que los niveles de TNF- α , iNOS e IL-10 son superiores cuando se enfrentan al PPD-B bajo un esquema de vacunación in vivo, sugiriendo que dichos niveles de expresión aumentan en etapas tardías de infección.

Los resultados mostrados por estos autores difieren a los nuestros basados en el hecho de que fue llevado a cabo estimulando con fracciones proteicas, las cuales no estimulan una respuesta inmune como se observaría en presencia de la micobacteria completa o que algunos componentes celulares de la bacteria podrían modificar o manipular al macrófago, por lo tanto, el mecanismo de acción es diferente, resultando en una expresión a nivel de citocinas diferente en comparación con nuestro trabajo, el cual se llevó a cabo a tiempos tempranos de infección bajo condiciones in vitro y con bacterias vivas.

Thacker et al, (2007) mencionan que en los bovinos no infectados, las citocinas como IFN- γ , iNOS, TNF- α , IL-10 y MIP-1 presentan una expresión génica inferior que en aquellos bovinos que fueron desafiados sin pre-estimulación, mostrando una clara patología asociada a la infección, mientras que animales no infectados muestran una expresión mayor de IL-4 con una patología menor, lo cual de alguna forma apoya la hipótesis de que la IL-4 podría actuar como mediador de la respuesta inflamatoria disminuyendo la severidad de la respuesta inmune hacia la micobacteria, esta hipótesis podría ajustarse a lo mostrado en nuestros resultados ya que al estimular con la rbIL-4 los niveles de citocinas inflamatorias y producción de ON fueron disminuidos en gran medida.

Otros autores utilizan macrófagos de animales estimulados previamente con *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) y desafiados con *M. avium* los cuales muestran una menor expresión de citocinas inflamatorias como IFN- γ , IL-1 α e IL-6, mientras que al ser solo desafiados con *M. avium avium* aumentan la expresión de IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-10 sugiriendo que la presencia de la micobacteria disminuye la expresión de citocinas Th1, aumentando así la expresión de IL-10 como citocina anti-inflamatoria (Coussens et al., 2004); tales resultados están relacionados con nuestra

investigación ya que al estimular con la rbIL-4, la expresión de citocinas inflamatorias disminuye de manera significativa, aunque al estar en contacto con la cepa virulenta aumenta la expresión y en menor medida en presencia de *M. bovis* BCG.

Un estudio donde trabajaron con bovinos de la raza Nelore y fenotipo de resistencia y susceptibilidad en base al nivel de nematodos o huevos del nematodo eliminados en heces, mostraron una mayor expresión de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 por parte de animales resistentes mientras que los animales susceptibles una mayor expresión de citocinas Th1 como IL-2, IL-12p35, IFN- α y MIP-1, concluyendo que la respuesta inmune contra el parásito podría estar dado en animales resistentes por una respuesta Th2 y en susceptibles por una respuesta Th1 (Bricarello et al., 2008).

Por lo tanto, se propone que la virulencia de *M. bovis*, la resistencia natural del hospedero a la infección y el tipo de activación de los macrófagos participan dinámicamente en la apoptosis, siendo mayor en los macrófagos de bovinos resistentes que en los macrófagos de bovinos susceptibles.

Cabe señalar que los eventos de regulación inmunológica varían entre las especies, ya que hay esquemas muy bien definidos en el modelo murino, pero que al ser comparados con el modelo bovino no cumple con lo propuesto por los autores que los describen (Ma, 2003; Kanher et al., 2006; Mooser, 2003; Gratchev et al., 2001; Mills, 2000; Mantovani, 2004; Gordon, 2003).

Por ejemplo la expresión aumentada de la enzima arginasa que es inducida por efecto de la IL-4, siendo que esta enzima en el modelo bovino esta se expresa solo en etapas tardías de infección (30 días), (Vordermeier et al., 2008) y que la producción de ON no es dependiente del estímulo de el IFN- γ como se ha demostrado en el modelo de ratón, (Barletta and Thoen, 2006) la presencia de clonas co-expresando IL-4 e IFN- γ al mismo tiempo siendo estas antígeno-específicas y pueden coexistir sin mantener una polarización establecida a diferencia del modelo de ratón y en el humano, esto observado en infecciones con diferentes patógenos como *Babesia bovis* donde observan que el 68% de las clonas expresan ambas citocinas, *B. bigemina* un 63%, *F. hepatica* un 94% y *Mycobacterium bovis* un 25% de clonas co-expresando ambas citocinas.

Esto reportes sugieren que en el bovino la polarización no es tan estricta como en otros modelos y que esta depende de otros factores intrínsecos del modelo donde se incluye:

(i) el tipo de célula presentadora de antígeno (ii) el ambiente de las citocinas que se esté dando en el momento de la infección ya que puede estar siendo afectado por el tipo de antígeno o patógeno (iii) regulación mediada por citocinas a partir de células T diferenciadas (iv) la concentración del antígeno y la afinidad por el receptor de la célula T (v) el nivel de señales co-estimuladoras liberadas por la interacción de la CPA y el Linfocito T, ya que de esto dependerá la regulación mediada por citocinas (vi) la eliminación de la respuesta específica de células T y B a través de la muerte celular mediada por Fas y su ligando factores que en el modelo bovino influyen de manera significativa (Brown, 1998).

En el humano se ha mencionado que las células secretoras de IL-4 están fuertemente asociadas con lesiones de cavitación aunque raramente son altas las concentraciones como para ser detectadas en el suero y esto solo en pacientes con desórdenes asociados a una respuesta Th2, como en los casos de asma atópica, aunque se ha encontrado una alta expresión de IL-4 en pacientes con tuberculosis progresiva, a estos pacientes se les midió el nivel de IL-4 y observaron que aquellos donde disminuía el nivel de IL-4 también aumentaba el nivel de una variante de splicing de esta misma citocina (IL-4 δ 2) mencionando que esta variante podría estar asociada a un efecto protector, sugiriendo que bloquea la señalización dada por la IL-4 (Gilleece et al., 1992).

Este mismo efecto ha sido observado por otros autores que reportan que los individuos con infección crónica pero con un menor grado de lesiones muestran una expresión mayor de esta variante IL-4 δ 2 con un rol protector al inhibir la polarización a una respuesta Th2 permitiendo un ambiente Th1 (Huang-Pin et al., 2007).

Otro autor propone que la micobacteria podría desencadenar la producción de IL-4 y que el organismo en respuesta produce la variante como medida de control para asegurar un ambiente Th1 ya que miden la expresión de ambas variantes IL-4 δ 2 e IL-4 δ 3, en células de lavado broncoalveolar y de sangre periférica observando que pacientes con tuberculosis crónica manifiestan una expresión superior de la variante IL-4 δ 2 en comparación con los controles sin infección, tanto en macrófagos de sangre periférica como en los de lavado broncoalveolar (Dheda et al., 2005).

Otro grupo de investigación demostró que los bovinos desafiados con la micobacteria muestran una mayor expresión del variante de splicing pero esta vez de la IL-4 δ 3 y

menor grado de patología asociada a la infección, bajo diferentes esquemas de desafío (Rhodes et al., 2007). Del mismo modo Waldvogel (2004) encontró que aquellos animales con niveles altos de IFN- γ mostraban niveles superiores de las variantes de IL-4 (IL-4 δ 2 e IL-4 δ 3), sin diferencias significativas entre ambas variantes, aunque los niveles de IL-4 completa disminuían, por lo cual, dichas variantes se han propuesto como inhibidores competitivos de la IL-4 permitiendo una respuesta Th1 dada por efecto del IFN- γ (Waldvogel, 2004). Del mismo modo en ratones infectados a bajas dosis de *M. tuberculosis* presentan una fuerte respuesta Th1 y a dosis altas predomina una respuesta Th2 con una alta expresión de IL-4 (Rook-Graham, 2007).

En el modelo murino se han realizado experimentos donde se demuestra que la utilización de anticuerpos contra la forma completa de la IL-4 reduce significativamente la replicación intracelular de la micobacteria tanto en fases tempranas, como en fases tardías de infección, por lo cual el autor propone que el suprimir la actividad de la IL-4 puede ser una arma importante del sistema inmune en contra de la infección (Roy et al., 2008).

En el presente trabajo demostramos la plasticidad de los macrófagos de origen bovino, los cuales pueden adoptar un estado de activación alterna dado por la estimulación con la rbIL-4; dicho estado de activación muestra diferencias con la activación clásica y a nivel de producción de ON encontramos una disminución por efecto de la rbIL-4, un aumento en la expresión de receptores de superficie a nivel de transcritos. Una vez que dichos macrófagos fueron estimulados con la rbIL-4 y desafiados con cepas de *Mycobacterium* se observó que los animales resistentes disminuían su capacidad inflamatoria, reflejándose en una disminución en la expresión de citocinas inflamatorias por ejemplo IL-1 β , TNF- α , IL-12p40 e iNOS las cuales son necesarias para el óptimo control de la infección.

También se determinó el porcentaje de fagocitosis y supervivencia intracelular de *M. bovis* en los macrófagos bajo condiciones de activación alterna siendo estos porcentajes superiores con los observados bajo condiciones de activación clásica; ya que al mantener el estímulo con la rbIL-4 disminuye la supervivencia intracelular.

Perspectivas.

En un futuro será de sumo interés establecer si la condición de resistencia a *M. bovis* patógeno es un fenómeno que se conserva ante diversos aislados de *M. bovis* patógeno, de ser así, se estará en condiciones para sugerir la selección de animales con mayor capacidad para resistir la infección por *M. bovis*.

8. CONCLUSIONES.

- Se logró identificar 3 animales con fenotipo resistentes a parásitos intracelulares bacterianos mediante el ensayo bactericida con *M. bovis* BCG subcepa Danesa.
- Al evaluar el comportamiento de los macrófagos de los animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos contra una cepa patógena de *M. bovis*, se demostró que los macrófagos de animales resistentes controlan con mayor efectividad el crecimiento intracelular de *M. bovis* independientemente a la virulencia de la cepa ($p < 0.05$), pero no al mismo nivel mostrado contra *M. bovis* BCG.
- Los macrófagos bovinos adoptan un fenotipo de activación alterna y clásica por efecto de los activadores celulares siendo este efecto más evidente en macrófagos procedentes de animales resistentes.
 - La *rbIL-4* reduce la producción de ON por efecto del LPS y del $IFN-\gamma$, mientras que el LPS y el $IFN-\gamma$ aumenta dicha producción.
 - Aumenta la expresión a nivel de transcritos de citosinas y quimocinas siendo ambos efectos más evidentes en macrófagos resistentes
- La activación alterna:
 - Induce la disminución en la producción de ON y Arginasa bajo condiciones de infección, siendo mayor el efecto en macrófagos de animales resistentes.
 - Provoca la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias en comparación con la vía clásica, con un mayor efecto en macrófagos de animales resistentes, aunque la presencia de la micobacteria estimula la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias.
- Los macrófagos de animales resistentes muestran un índice de fagocitosis superior con ambas vías de activación celular.

- Se observó un mejor control de la proliferación micobacteriana con la estimulación con IFN- γ + LPS, ya que al mantener la estimulación con estos activadores los animales susceptibles aumentaron el control en la proliferación bacteriana con un fenómeno similar al de los animales resistentes.

9. APÉNDICES

ANEXO 1:

9.1. Preparación de la suspensión de percoll® de trabajo

Para la recuperación de los monocitos por centrifugación isopícnica, se requiere que la suspensión a preparar de Percoll posea una gravedad específica similar a la de las células a separar.^{69, 89}

En este caso la gravedad específica (SG) de la suspensión de Percoll que se utilizó fue de 1.0770. Para alcanzar esta gravedad específica se hizo necesario adicionar al “Percoll stock” una serie de soluciones en volúmenes variables de acuerdo a la gravedad específica que posea cada uno de ellos y la del “Percoll stock”.

Percoll stock (Percoll):

10 volúmenes de Percoll (Percoll^{MT} Amersham Biosciences AB Uppsala Sweden)

1 volumen de NaCl 1.5 M, NaH₂PO₄ 100 mM (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO USA)

Se midió su índice de refracción (RI), el cual puede ser de: RI = 1.3530 a 1.3531

Para calcular la SG del Percoll, se utilizó esta fórmula: $SG\text{-Percoll} = (RI - 1.1814) / 0.1523$

Albúmina sérica bovina 5 % (BSA):

5 g de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich)

cbp 100 mL de H₂O destilada, se esterilizó por filtración.

Se midió su índice de refracción (RI), el cual fue de: RI = 1.3415

Se calculó la SG de la BSA, con esta fórmula: $SG\text{-BSA} = (RI - 0.63727) / 0.69336$

Citrato de sodio 130 mM (Citrato):

19.11 g Citrato trisódico (Sigma-Aldrich)

cbp 500 mL de H₂O destilada, se filtró para esterilizar.

Su índice de refracción (RI) fue medido, el cual fue de: RI = 1.3388

Para calcular la SG del Citrato, se utilizó esta fórmula: $SG\text{-Citrato} = (RI - 1.0918) / 0.24129$

Solución balanceada de fosfatos (PBS):

87.7 g de NaCl (Sigma-Aldrich)

13.0 g de Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich)

1.5 g de NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich)

cbp 1000 mL de H₂O destilada, se ajustó pH a 7.4 y fue esterilizado por filtración

Se midió su índice de refracción (RI), el cual fue de: RI = 1.3349

Fue calculada la SG del PBS, con esta fórmula: SG-PBS = (RI – 1.0918)/ 0.24129

Para calcular los volúmenes de cada una de las anteriores soluciones que se adicionaron para preparar 30 mL de la suspensión de Percoll de trabajo, se hizo necesario resolver la siguiente ecuación:

$$X(a) + 0.1(b) + 0.1(c) + (0.8-X)(d) = 1.077 - 1 \quad \text{donde:}$$

$$* a = \text{SG-PBS} - 1$$

$$b = \text{SG-BSA} - 1$$

$$c = \text{SG-Citrato} - 1$$

$$d = \text{SG-Percoll} - 1$$

Se encontró el valor de X.

Se resolvieron cada una de las siguientes ecuaciones para determinar los volúmenes de:

$$\text{Volumen PBS (mL)} = (X)(30 \text{ mL})$$

$$\text{Volumen BSA (mL)} = 0.1(30 \text{ mL})$$

$$\text{Volumen Citrato (mL)} = 0.1(30 \text{ mL})$$

$$\text{Volumen Percoll (mL)} = (0.8 - X)(30 \text{ mL})$$

Todas las mediciones de índice de refracción y el cálculo de los volúmenes de las soluciones a agregar para preparar la suspensión de Percoll de trabajo se realizaron el mismo día que se utilizaron.

Tabla VII Representación gráfica del método de cuantificación.

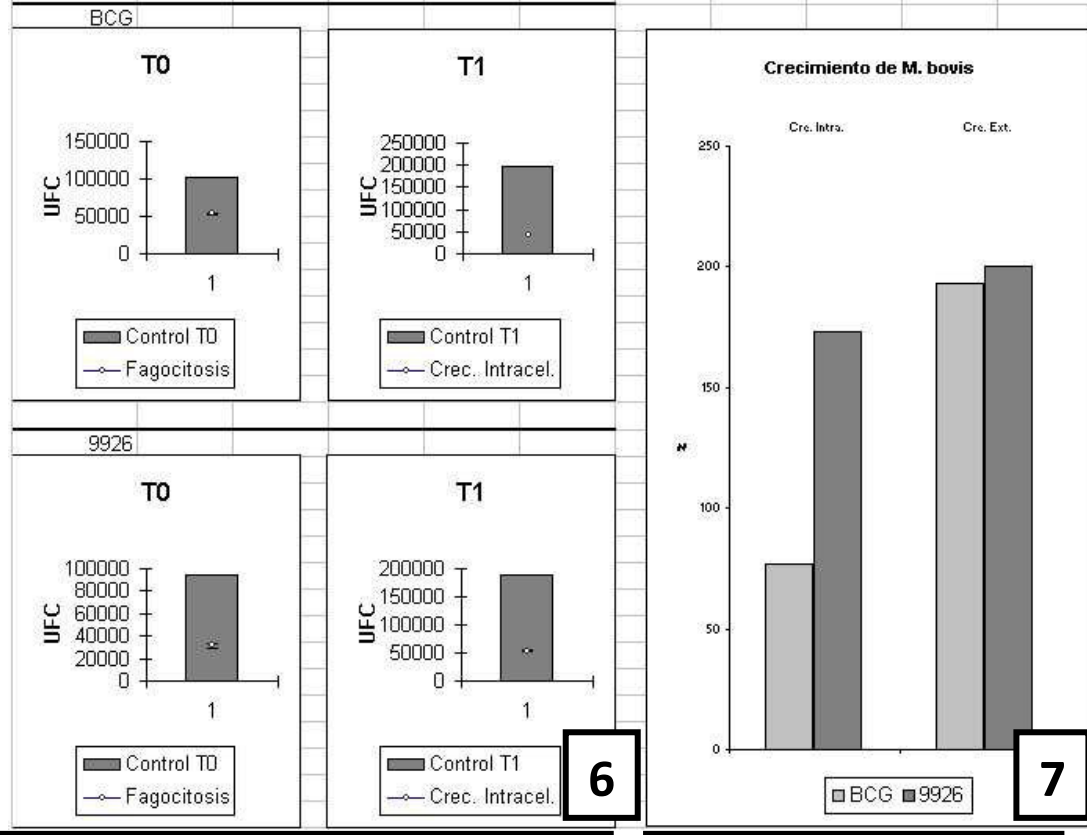
Preparación de suspensión de trabajo de Percoll.			
Elementos:	RI:	SG:	Volumén
Albumina	1.341	1.014956	3
Citrato	1.3380	1.020349	3
PBS	1.334	1.003771	5.840017
Percoll	1.352	1.120158	18.159983
1	Vol. final	30	3
	SG	1.0770	
	X =	0.19466724	4
*Solo introducir valores de RI (Índice de refracción) en los cuadros indicados para Albumina, Citrato, PBS, Percoll y el volumén final requerido de la suspensión de trabajo de Percoll.			
**No cambiar los datos en los otros cuadros.			

Dónde:

1. Celdas donde se colocan los valores de las lecturas de índice de refracción (RI) de cada una de las soluciones.
2. Valores de la gravedad específica (SG) de las soluciones calculados en forma automática por la hoja.
3. Volumen de calculado en forma automática de acuerdo al volumen indicado de solución de trabajo a preparar.
4. Celda donde se coloca el valor del volumen a preparar (mL). Valor la gravedad específica deseada para la solución de trabajo y valor de la incógnita X, utilizada para calcular los volúmenes de las soluciones a mezclar para la solución de trabajo de Percoll®.

Tabla VIII calculo de índice de índice de fagocitosis y supervivencia intracelular.

Vaca:	13	1									
Cepa:	BCG										
	Inóculo	Tiempo 0		Control 0		Tiempo 1		Control 1			
	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total		
Fact. Diluc.		200	200	200	200	200	200	200	200		
P1	503	100600	270	54000	508	101600	210	42000	982	196400	
P2			263	52600			207	41400			3
P3			268	53600			201	40200			
Promedio			267	53400			206	41200			
Des. Est.			3.605551	1700.98			4.582576	916.5151			
Cepa:		9926									
	Inóculo	Tiempo 0		Control 0		Tiempo 1		Control 1			
	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total	UFC cont. UFC total		
Fact. Diluc.		200	200	200	200	200	200	200	200		
P1	480	96000	156	31200	470	94000	281	56200	941	188200	
P2			148	29600			271	54200			4
P3			165	33000			259	51800			
Promedio			156.3333	31266.67			270.3333	54066.67			
Des. Est.			8.504901	1700.98			11.01514	2203.028			
Cepa:	Fagoc.	Cre. Intra.	Cre. Ext.		Bac. Cel.						
BCG	53.08151	77.15356	193.3071	%	5.34						
9926	32.56944	172.9211	200.2128	%	3.126667						



Obteniendo:

1. Identificación de bovino y cepa de *M. bovis*.
2. Datos de conteo de las UFC de la dilución para el control de inóculo, de las tres serie de diluciones del tiempo cero y del control del tiempo cero.
3. Datos de conteo de las UFC de las tres serie de diluciones del tiempo uno y del control del tiempo uno.
4. Los valores de las UFC contadas para ambas cepas de *M. bovis*.
5. Valores de porcentaje de fagocitosis, crecimiento intracelular a las 24 h PI, crecimiento extracelular a las 24 h y número de bacterias fagocitadas por célula, calculados en forma automática por la hoja de cálculo para ambas cepas.
6. Gráfica de porcentaje de fagocitosis y crecimiento intracelular a las 24 h PI con sus respectivos controles de crecimiento extracelular en ambas cepas.
7. Gráfica de comparación entre el crecimiento intracelular y extracelular de ambas cepas a las 24 h PI.

10.-LITERATURA CITADA.

- Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Vallecillo AJ., Gutierrez-Pabello JA., Suarez- Güemes F., McNair J., Cataldi A., Espitia C., Andersen P., Pollock JM. 2006. Optimizing antigens cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:4326-4335.
- Adams GL 1988. Natural disease resistance in domestic animals with emphasis on intracellular bacterial disease: functional and genetics basis. *J Am Vet Med Assoc*. 192 (9):1306-1315.
- Aldwell FE, Wedlock DN, Slobbe LJ, Griffin JFT, Buddle BM, Buchan GS. 2001. In vitro control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. *Tuberculosis*. 81:115-123.
- Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini I. 2002. Use of recombinant proteins in antibody test for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 85 (4): 379-89.
- Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. 2000. Specific immune-bases diagnosis of tuberculosis. *The Lancet*. 356 (9239):1099-104.
- Andersen P, Weldingh K. 2008. ESAT-6/CFP10 Skin Test Predicts Disease in *M. tuberculosis*-Infected Guinea Pigs. *PLoS ONE*. 3 (4): e1978.
- Antje Kahnert, Seiler P, Stein M, Bandermann S, Hahnke K, Mollenkopf H, Kaufmann SH. 2006. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol*. 36 (3): 631-647.
- Bai Y, Xue Y, Gao H, Wang L, Ding T, Bai W, Fan A, Zhang J, Qunxing A, Xu Z. 2008. Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MP764 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model. *Protein Expression and Purification*. 58 (2): 189-96.
- Tohen, C. O., R. G. Barletta, Charles O. Thoen, James H. Steele, and Michael J. Gilsdorf. 2008 "Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*." *Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans, Second Edition*: 18-33.
- Barrera, Lucía. 2007 "The basics of clinical bacteriology." *Tuberculosis* 93-112.
- Behr, M. A., and P. M. Small. 1999 "A historical and molecular phylogeny of BCG strains." *Vaccine* 17 (7): 915-922.
- Behr, M. A. 2001 "Comparative genomics of BCG vaccines." *Tuberculosis* 81(1):165-168.
- Bellamy, R. 2003 "Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics." *Genes and immunity* 4 (1): 4-11.
- Berrington, William R., and Thomas R. Hawn. 2007 "*Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?." *Immunological reviews* 219 (1): 167-186.

- Biet, F., Boschioli, M. L., Thorel, M. F., & Guilloteau, L. A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary research*, 36 (3): 411-436.
- Boddu-Jasmine H.C. 2008. Cytokine mRNA expression in cattle infected with different dosages of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 88 (6): 610-615.
- Bricarello P.A., Zaros L.G., Coutinho L.L., Rocha R.A. 2008. Immunological response and cytokines gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. *Vet parasit.* 155 (1): 95-103.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Buchrieser P, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99 (6): 3684-3689.
- Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.* 9: (9) 452-458.
- Brown, David H., William P. Lafuse, and Bruce S. Zwillig. 1997 "Stabilized expression of mRNA is associated with mycobacterial resistance controlled by *Nrampl1*." *Infection and immunity* 65 (2): 597-603.
- Brown W.C. 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet immunol and immunopathol.* 63: (1) 45-55.
- Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. 1995. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*. 13 (12): 1123-1130.
- Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody KA, Andersen P. 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 6 (1):1-5.
- Campbell GA, Adams LG. 1992. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34 (3):291-305.
- Cassidy JP, Bryson DG, Neill SD. 1999a. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec.* 144 (6):139-142.
- Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans JT, Forster F, Neill SD. 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol.* 119(1):27-44.
- Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. 1999b. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. *Journal of Comparative Pathology*. 121 (4):321-37
- Castillo-Velazquez U, Aranday-Cortez A, Gutierrez-Pabello JA. 2010. Alternative activation modifies macrophage resistance to *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 151(1): 51-59.

- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3), 532.
- Clark, V. L., & Bavoil, P. M. 2002. *Bacterial Pathogenesis, Part C: Identification, Regulation and Function of Virulence Factors: Identification, Regulation and Function of Virulence Factors*. Academic Press.
- Coad M, Clifford D, Rhodes S, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan A. 2010. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Veterinary Research*. 41 (2): 14.
- Collins CH, Grange JM. 1983. The bovine tubercle bacillus. *Journal of Applied Bacteriology*. 55 (1): 13-29.
- Collins DM. 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81:97-102
- Corner LA, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood A, Rothel JS. 1990. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal*. 67 (11):389-92.
- Corner LA, Trajstman AC, Lund K. 1995. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zealand Veterinary Journal*. 43(4):129-35.
- Corner LA. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*. [Review]. 40 (1):53-63.
- Costello E, Doherty MI, Monaghan MI, Quigley FC, O'Reilly PF. 1998. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J*. 155 (3):245-250.
- Coussens P.M., Verman N., Coussens. M.A., Elfman M.D., McNulty A.M. 2004. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infection and immunity* 72(3):1409-1422.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P. & Zou, W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*, 10(9), 942-949.
- Daniel TM. 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. [Historical Review]. 100 (11):1862-70.
- Das S, Das SC, Verma R. 2007. Occurrence of RD9 Region and 500bp Fragment among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Microbiology and Immunology*. 51(2):231-234.
- De la Rua RD, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*. 81 (2):190-210.
- De los Monteros LEE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Marin JFG, Martin C, Domínguez L, de Rafael L, Banquero F, Gomez ME, Blazquez J. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *OxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from

- Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis* *pncA* sequence polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (1):239-42.
- Denis M. 1991. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis. *J Leukoc Biol*. 50(5):495-501.
- Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, Haun S, Teixeira L, Chen Y, Johnson JL, Ellner JJ, Dietze R, Bates J, Cave MD, Eisenach KD. 1999. Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 160 (1): 203-210.
- Dheda K, Jung-su Chang. 2005. In vivo and in Vitro Studies of novel cytokine, interleukine 4 δ 2, in pulmonar tuberculosis. *Am J. Respir. Crit. Care Med*. 172 (4):501-508.
- Doherty ML, Monaghan ML, Bassett H, Quinn PJ. 1995. Effect of a recent infection of purified protein derivative on diagnostic test for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science*. 58(3):217-21.
- Domenech P, Barry III CE, Cole ST. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Immunol*. 4 (1):28-34.
- Ernst DJ, Trevejo-Nuñez G, Banaiee N. 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*. 117(7):1738-45.
- Esquivel S.H. 2003. Apoptosis por *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino: efecto de la virulencia bacteriana y de la resistencia natural del hospedero (tesis de maestría) (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Feng, J. 1996. Isolation and Characterization of Bovine *Nramp1* and Bison *Nramp1*: A Major Candidate Gene for Natural Resistance to Brucellosis (Doctoral dissertation, Texas A & M University).
- Fenton MJ, Savedra R Jr, Delude RL, Ingalls RR, Golenbock DT. 1996. Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system. *J Immunol*. 157(6):2549-2554.
- Fenton MJ, Savedra R Jr. 1996. Delude RL, Ingalls RR, Golenbock DT Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system. *J Immunol*. 157(6):2549-2554.
- Fenton MJ, Vermeulen MW. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect. Immun*. 64 (3): 683-690.
- Flesch IE, Hess JH, Huang S, Aguet M, Rothe J, Bluethmann H, Kaufmann SH. 1995. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 181(5):1615-21.
- Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 19 (1):93-129.
- Flynn JL, Chan J. 2003. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Current Opinion in Immunology*. 15 (4):1-6.
- Flynn JL. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development *Tuberculosis*. 84 (1):93-101.

- Francis J, Choi CL, Frost AJ. 1973. The diagnosis of tuberculosis in cattle with special reference to bovine PPD tuberculin. *Australian Veterinary Journal*. 49(5):246-51.
- Francis J, Seiler RJ, Frost AJ. 1978a. The efficiency and dose of bovine purified protein derivative tuberculin. *Australian Veterinary Journal*. 54 (1):44-6.
- Francis J, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. 1978b. The sensitivity and specificity of various tuberculin test using bovine PPD and other tuberculins. *Veterinary Record*. 103 (109):420-35.
- Gilleece M. H., Scarffe J. H., Ghosh A., Heyworth C. M., Bonnem E., Testa N., Stern P., Dexter T. M. 1992. Recombinant human interleukin 4 (IL-4) given as daily subcutaneous injections: a Phase I dose toxicity trial. *Br J Cancer*. 66 (1): 204-210.
- Glickman SM, Jacobs Jr WR. 2001. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*. 104 (4):477-485.
- Glimcher, LH Murphy K.M. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and development*. 14 (14):1693-1711.
- Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodolja V, Orfanos CE. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology*; 67(5-6):222-226.
- Goerdts, S., Orfanos, C.E. 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*. 10 (2):137-142.
- Goodchild, T., Clifton-Hadley, R., Thoen, C. O., Steele, J. H., & Gilsdorf, M. J. (2008). The fall and rise of bovine tuberculosis in Great Britain. *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans, Second Edition*, 100-116.
- Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81 (1):23-41.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23-35.
- Gordon SV, Eiglmeier K, Gardnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrell B, Cole ST, Hewinson G. 2001. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81 (1):157-163.
- S Gordon, 1999 *Macrophages and the immune response*. Chapter 15. WE Paul (Ed.), *Fundamental Immunology*, fourth edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia pp. 535-545
- Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam® assay). *Veterinary Microbiology*. 112 (2):171-9.
- Gormley E, Doyle MB, McGill K, Costello E, Good M, Collins JD. 2004. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102(4):413-420.
- Govoni G, Vidal S, Gauthier S, Skaneme E, Malo D, Gros P. 1996. The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp1Gly169* allele. *Infect Immun*. 64 (8):2923-2929.

- Gradmann C. 2006. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes and Infection*. 8 (1):294-301.
- Grant EP, Degano M, Rosat JP, Stenger S, Modlin RL, Wilson IA, Porcelli SA, Brenner MB. 1999. Molecular recognition of lipid antigens by T cell receptors. *J Exp Med*. 189(1):195-205.
- Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, Goerdts S. 2001. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 14 (5): 272 -279.
- Green LR, Jones CC, Sherwood AL, Garkavi IV, Cangelosi GA, Thacker T, Palmer MV, Waters WR, Rathe V. 2009. Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16(9):1309-1313.
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med*. 185 (4):717-730.
- Gutierrez- Pabello JA, Gary-Adams L. 2003. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares. *Vet. Méx*; 43 (3): 277-281.
- Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W, Gruenheid S, Gros P, Grinstein S. 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med*; 188 (2):351-364.
- Hamilton, T. 2002. In *The Natural immune system: The Macrophage* 2nd ed (Burke, B. & Lewis, C. E. ed.) 73-102 (Oxford Univ. Press,).
- Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, García MM, Dukes TW, Brooks BW, Turcott C, Nagai S. 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (5):913-21.
- Herrera BMT, M. TR, Juárez CE, Sada DE. 2005. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 18(4):327-36.
- Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. 2001. Differential regulation of oxide nitric synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 167 (11):6533-6544.
- Hewinson RG, Vordermeier HM, Smith EG, Gordon SV. 2006. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. *Veterinary Microbiology*. 112 (2):127-139.
- Hines N, Payeur JB, Lorraine J, Hoffman LJ. 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 18 (3):243-50.

- Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. 2006. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinary Medicine*. 51(5):180-92.
- Huang Pin Wu , Wu CL, Yu CC, Liu YC, Chuang DY. 2007. Efficiency of interleukin-4 expression in patients with tuberculosis and nontubercular pneumonia. *Hum Immunol*. 68(10):832-838.
- Hutt Fb. 1958. Genetics resistance to disease in domestic animals. New York. Comstock Publishing Associates.
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 5(10):987-995.
- Jolley ME, Nasir MS, Surujballi OP, Romanowska A, Renteria TB, De la Mora A, Lim A, Bolin SR, Michel AL, Kostovic M, Corrigan EC. 2007. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Veterinary Microbiology*. 120(1-2):113-121.
- Kahnert A., Seiler P., Stein M., Bandermann S., Hahnke K., Mollenkopf H., Kaufmann SH. 2006. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. 36(3):631-647.
- Kaur D, Berg S, Dinadayala P, Gicquel B, Chatterjee D, McNeil MR, Vissa VD, Crick DC, Jackson M, Brennan PJ. 2006. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan: role of a branching mannosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U SA*. 12 103(37):13664-13669.
- Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*. 65(1):298-304.
- Keating LA, Wheeler PR, Mansoor H, Inwald J, Hewinson RG, Gordon SV. 2005. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vitro growth. *Molecular Microbiology*. 56(1):163-74.
- Knowles V. 2002. Tuberculosis: diagnosis and care. *Prof Nurse*. 18(4):193-194
- Korbel D.S., Schneider B.E., Schaible. U.E. 2008. Innate immunity in tuberculosis. myth and truth. *Microbes infect*. 10(9):995-1004.
- Kwok HF, Scott CJ, Snoddy P, Buick RJ, Johnston JA, Olwill SA. 2010. Expression and purification of diagnostically sensitive mycobacterial (*Mycobacterium bovis*) antigens and profiling of their humoral immune response in a rabbit model. *Research in Veterinary Science*. 89(1): 41-47.
- Kwon O.J. 1997. The role of nitric oxide in the immune response of tuberculosis. *J Korean Med Sci*. 12(6):481-487.
- Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(4):933-938.
- LoBue, P. A., Enarson, D. A., & Thoen, C. O. 2010. Tuberculosis in humans and animals: an overview [Serialised article. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and

- humans. Number 1 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14(9), 1075-1078.
- Lohoff M, Lohff M, Mak T.W. 2005. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper cell differentiation *Nature reviews. Immunology* 5 (2):125-135.
- López-Marín LM, Díaz Otero F, Vallecillo Maza AJ, Esquivel Solís H, Gutierrez-Pabello JA. 2006. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2):173-178.
- López-Marín LM, Segura E, Hermida-Escobedo C, Lemassu A, Salinas-Carmona MC. 2003. 6,6'-Dimycoloyl trehalose from a rapidly growing *Mycobacterium*: an alternative antigen for tuberculosis serodiagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 36(1-2):47-54.
- Lyashchenko KP, Manca C, Colangeli R, Heijbel A, Williams AM, Gennaro ML. 1998a. Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. *Infection and Immunity*. 66(8):3606-3610.
- Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML. 1998b. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*. 66(11):5344-5349.
- Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML. 2000. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *Journal of Immunological Methods*. 242(1-2):91-100.
- Lyashchenko KP, Whelan A, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2004. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infection and Immunity*. 72 (5):2462-2467.
- Ma J. 2003. Regulation of macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Science*. 60:2334-2346.
- Mackness G.B. 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. An early delineation of macrophage activation by intracellular infection. *J. Exp. Med*. 120(1): 105-120.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 178 (5): 1274-1282.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 25(12):677-86.
- Mantovani A. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 25(12):677-686.
- McIntosh CW, Konst H. 1947. Tuberculin. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 11(12):344-351.

- McIlroy SG, Neill SD, MacCracken RM. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec.* 118 (26):718-721.
- McNair J, Corbett DM, Girvin RM, Mackie DP, Pollock JM. 2001. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential *Scand. J Immunol.* 53(4):365-71.
- Milian, S. F. 2000. Manual para determinar tamaño de muestra para estudios de campo en medicina veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Programa Nacional de Epidemiología. Edit. Fundación Produce, Querétaro.
- Milián SF, Pérez GL, Arriaga DC, Escartín CM. 2010. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Preventive Veterinary Medicine.* 97(1) :37-44.
- Mills C.D. 2000. M-1/M-2 macrophage and the Th1/Th2 paradigm. *the Journal of immunology.* 164 (12):6166-6173.
- Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Diseases.* 77 (2):103-8.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 25(4):1101-1104.
- Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology.* 40 (1):114-24.
- Moosser D.M. 2003. The many faces of macrophage activation, *J. Leukoc. Biol* 73 (2):209–212.
- Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology.* 40 (1):153-77.
- Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. 2000. Genomic deletion suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis;* 186 (1):74-80.
- Mostowy S, Behr MA. 2005. The Origen and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in Chest Medicine.* 26 (2):207-16.
- Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 163(7):3771-3777.
- Nathan C. 1991. A commentary: inducible nitric oxide synthase. *Res Immunol.* 42(7):600-602.
- Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in the cattle. *Tuberculosis.* 81 (1):79-86.
- Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J. 1991. A mathematical model of *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet Microbiol.* 28 (1):103-109.
- Neill SD, O'Brien JJ, MacCracken RM. 1988. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet Rec.* 122 (8):184-186.

- Neill SD, Pollock JM, Bryson DG, Hanna J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*. 40 (1):41-52.
- Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA. 2008. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods*. 75 (1):1-11.
- NOM-031-ZOO-1995 NOM. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina.
- OIE. 2010. World Organization for Animal Health. Available from: http://www.oie.int/eng/en_index.htm.
- Palmer MV, Waters WR. 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*. [Review]. 112 (2):181-90.
- Parish T, Stoker DG. 1998. In *Mycobacteria: General Culture Methodology and Safety Considerations*. *Mycobacteria protocols. Methods in molecular biology*. New Jersey: 15-30: Humana Press Inc:
- Paulnock, D.M. 2000. *Macrophages. Practical approach*. Great Britain: Oxford University Press.
- Pérez GR, Milián SF, Arriaga DC, Romero TC, Escartín CM. 2008. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública de México*. 50(4):286-91.
- Phillips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Res Vet Sci*. 74 (1):1-15.
- Phillips CJC, Foster CRW, Morris RS, Teverson R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science*. [Review]. 74 (1):1-15.
- Pieterss J. 2008 *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host and Microbe*. 3 (6):399-407.
- Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin MR, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*; 81 (1):103-107.
- Pollock JM, Neill SD. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*. 163 (2):115-27.
- Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H Rosenkrands I, Andersen P. 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identity tuberculosis-infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(5):1856- 60.
- Qureshi T, Templeton JW, and Adams LG. 1995. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol*. 50 (1): 55-65.
- Rhodes. S.G Hewinson. G, Vordermeier M.H. 2007. Is interleukin-4 δ 3 splice variant expression in bovine tuberculosis a marker of protective immunity? *Infection and immunity*. 75 (6):3006-3013.

- Ritacco V, Lopez B, Barrera L, Nader A, Fliess E, Kantor IN. 1990. Further evaluation on an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 37(1):19-27.
- Rodrigues CS, Shenai SV, Almeida DVG, Sadani MA, Goyal N, Vadher C, Mehta AP. 2007. Use of BATEC 460 TB System in the diagnosis of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 25(1):32-36.
- Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. 2008. *Mycobacterium bovis* tuberculosis in binational communities. *Emerging Infectious Disease*. 14(6):1-16.
- Rook GAW, Hernandez-Pando R. 1996. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol*. 50 (1):259-284.
- Rook. Graham A.W. 2007. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Current molecular medicine*. 7 (3): 327-337.
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*. 67 (4):134-7.
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*. 69(1):1-4.
- Roy. E., Brennan. J., Jolles., Lowrie. D.B. 2008. Beneficial effect of anti-interleukin-4 antibody when administered in murine model of tuberculosis infection. *Tuberculosis*. 88 (3): 197-202.
- Russell DG. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews* 5 (1):39-47.
- Saavedra R, Segura E, Tenorio EP, López-Marín LM. 2006. Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T-cells. *Microbes Infect*. 8(2):533-40.
- Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris J, Orloski KA, Buddle BM, Thacker T, Lyashchenko KP, Waters WR. 2010a. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of the relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*. [Review]. 57 (4) :205-220.
- Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Whelan A, Coad M, Gormley E, Buddle BM, Palmer MV, Thacker T, McNair J, Welsh M, Hewinson RG, Oesch B. 2010b. Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. [Mini Review]. 136 (1-2) 1.
- Schluger NW, Rom WN. 1998. The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 157 (3):679-691.
- Schluger NW. 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res*. 2(3):157-163.
- Schroeder, E.C. & Cotton, W.E. 1907. The danger from tubercle bacilli in the environment of tuberculous cattle. U.S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry, Bulletin No. 99, 1-24.

- Sell, S., Max, E. E., & Berkower, I. 2001. Immunology, immunopathology, and immunity: 19-20. ASM press.
- SENASICA. 2010. Situación Actual de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina.; Available from: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>.
- Skamene, E. 1983. Genetic regulation of host resistance to bacterial infection. Review of Infectious Diseases, 5(Supplement 4), S823-S832.
- Song, R., Ning, W., Liu, F., Ameredes, B. T., Calhoun, W. J., Otterbein, L. E., & Choi, A. M. 2003. Regulation of IL-1 β -induced GM-CSF production in human airway smooth muscle cells by carbon monoxide. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 284(1): L50-L56.
- Spiegel, MR, Shiller JJ, Sirvasan RA. 2000. Probabilidad y estadística. 2nd ed. Colombia; Mc Graw-Hill.
- Thacker, T. C., Palmer, M. V., & Waters, W. R. 2007. Associations between cytokine gene expression and pathology in Mycobacterium bovis infected cattle. Veterinary immunology and immunopathology, 119(3), 204-213.
- Toen OC, Barletta RG. 2006. Pathogenesis of Mycobacterium bovis. In: Toen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA. Blackwell. pp. 18-29.
- Toen OC, Ebel ED. 2006. Diagnostic tests for bovine tuberculosis. In: Toen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA. Blacwells. pp. 49-53.
- Thom ML, Hope JC, McAulay M, Villareal-Ramos B, Coffey TJ, Stephens S, Vordermeier HM. 2006. The effect of tuberculin testing on the development of cell mediated immune responses during Mycobacterium bovis infection. Veterinary Immunology and Immunopathology. 114(1-2):25-36.
- Toledo OP, Milian SF, Santillán FM, Ramírez CIC. 1999. Aislamiento e Identificación de Mycobacterium bovis a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. Veterinaria México. 30 (3):227-229.
- Trejo-Márquez H, Gorocica P, Porras F, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. 2003. Bases moleculares de la interacción de Mycobacterium tuberculosis con los macrófagos. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 16 (1):41-47.
- Van Ginderachter J,A, Movahedi K, Hassanzadeh.G.G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. 2006. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. Immunobiology. 211 (6): 487-501
- Van Pinxteren LAH, Ravn Pernille, Agger Else Marie, Pollock JM, Andersen P. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 y CFP10. Clinical and Diagnostic Laboratoty Immunology 7 (2):155-160.
- Vasselon T, Detmers PA. 2002. Toll receptors: a central element in innate immune responses. Infect Immun. 70 (3):1033-1041.

- Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. 1998. Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(4):1050-5.
- Vordermeier M., Boddu-Jasmine HC., Witchell J., Wangoo A, Goyal M. 2008. Cytokine mRNA expression in cattle infected with different dosages of Mycobacterium bovis. *Tuberculosis*. 88(6):610-5.
- Waldvogel. A.S. 2004. Expression of interleukin-4, interleukin-4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with Fasciola hepatica. *Veterinary immunology and immunopathology*. 97 (1):52-63.
- Walter F, Malke H, Reichardt W, Hartmann M. 1981 Genetic study of plasmid-associated zonal resistance to lincomycin in Streptococcus pyogenes. *Antimicrob Agents Chemother* 19 (1):91-100
- Waters WR, Palmer MV, Thacker T, Bannantine JP, Vordermeier HM, Hewinson RG, Greenwald R, Esfandiari J, McNair J, Pollock JM, Andersen P, Yashchenko KP. 2006. Early antibody responses to experimental Mycobacterium bovis Infection in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13(6):648-54.
- Wedlock. D.N., Kawakami. R.P., Koach.J., Buddle.B.M., Collins. D.M. 2006. Differences of gene expression in bovine alveolar macrophages infected with virulent and attenuated isogenic strain of Mycobacterium bovis. *International Immunopharmacology*. 6 (6):957-961.
- Whelan A, Coad M, Peck ZA, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2004. Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Record*. 155 (7):204-206.
- Whelan A, Hope JC, Howard CJ, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2003. Modulation of the bovine delayed type-hypersensitivity responses to defined mycobacterial antigens by a synthetic bacterial lipopeptide. *infection and immunity*. 71 (11):6420-5.
- Whelan C, Shuralev E, O'Keeffe G, Hyland P, Kwok HF, Snoddy P, O'Brien A, Connolly M, Quinn PJ, Groll M, Watterson T, Call S, Kenny K, Duignan A, Hamilton MJ, Buddle BM, Johnston JA, Davis WC, Olwill SA, Clarke J. 2008. Multiplex Immunoassay for Serological Diagnosis of Mycobacterium bovis Infection in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15 (12):1834-1838.
- Whipple DL, Palmer MV, Slaughter RE, Jones SL. 2001. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13 (2):117-22.
- Williams-Ashman HG, Canellakis ZN. 1979. Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspect Biol Med*. Spring 22 (3):421-453.
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, De Witte K, Tolson J, Ryan TJ, Lisle GW, Cox JC, Jones SL. 1992. A field

- evaluation of serological and cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 31 (1):71-79.
- Wood PR, Rothel JS. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis *Veterinary Microbiology*. 40 (1):125-35.
- Xu DL, Goto Y, Endo F, Amoato KK, Shinjo T. 1997. The effect of Bcg gene on antigen presentation of spleen adherent cells and peritoneal macrophages from *Mycobacterium bovis* BCG-infected Bcgs and Bcgr mice. *Vet Microbiol*. 59 (1):67-78.
- Yang J, Kawamura I, Zhu H. 1995. Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG. Study of the mechanism of the different abilities of viable and killed. *BCG J Immunol*. 155 (12):5728-5735.
- Zumárraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, Cataldi A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17(3):232-238.

11. RESUMEN BIOGRAFICO

Uziel Castillo Velazquez

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

Tesis: “CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA ACTIVACIÓN CELULAR EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *Mycobacterium bovis*”

Campo de estudio. Inmunología

- Datos personales: Nacido el 04 de marzo de 1980 en el Distrito Federal, hijo de Guillermo Paredez Zarco y Rosalia Castillo Velázquez.
- Educación. **Médico Veterinario Zootecnista**. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Cédula profesional: 506971.
Título de tesis: “Hallazgos anatomopatológicos y bacteriológicos en mortalidad de bovinos asociados a paratuberculosis en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo.”
Maestro en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.
Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM Cédula profesional: 6414188
Título de Tesis: “Efecto de la resistencia natural a *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos de animales resistentes y susceptibles activados por la vía alterna.

Experiencia Profesional

- Ayudante de profesor (honorario) en la materia de bacteriología e inmunología ayudando en prácticas de las mismas de 2007-2008 en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Depto. de inmunología y bacteriología. UNAM.
- **Investigador asociado categoría C** en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Torreón Coahuila. Oct 2009 a feb 2010.
- Profesor Tiempo Completo Titular “A” de la cátedra de **Clínica de Bovinos** del 10º semestre, **Zootecnia de Bovinos de Leche** del 9º semestre, **Biología del Desarrollo** del 1º semestre y **Propedéutica Veterinaria** del 4º semestre de la carrera de

Médico Veterinario Zootecnista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de Nuevo León

- Profesor de Medio Tiempo de la Catedra de Inmunologia Veterinaria y Microbiologia Veterinaria del 3er semestre y Mejoramiento Genetico del 1er semestre, de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro de Estudios Profesionales Uniada Guadalupe.

Artículos Publicados.

- Castillo VU, Aranday CE, Gutiérrez-Pabello JA “Alternative activation modifies macrophage resistance to Mycobacterium bovis” journal of Veterinary Microbiology, 2011 Jul 5;151(1-2):51-9
- Silva AF, Rangel L, Ortiz CG, Morales E, Zanella EL, Castillo-Velázquez U, Gutierrez CG. Increased incidence of DNA amplification in follicular than in uterine and blood samples indicates possible tropism of Neospora caninum to the ovarian follicle Vet Parasitol. 2012 Aug 13;188(1-2):175-8.

Artículos en Proceso de Publicacion.

- **Castillo-Velázquez U^a, Gomez-Flores^{a*}, R. Tamez-Guerra^a, P. Tamez-Guerra^a and C. Rodríguez-Padilla. 2013** “Differential macrophage responses against Mycobacterium bovis under alternative and classical activation in resistant and susceptible bovines”
(Vet Immunol immunopathology)
- **Castillo-Velázquez U., Favila Humara LC., Tamez-Guerra P., Chavez Gris G., Maldonado Castro E., Gomez-Flores R. 2013** “Paratuberculosis as culling cause in bovines from Agropecuary Industrial Complex from Tizayuca, Hidalgo.”
(Veterinary Clinical Pathology)