

11674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD
ANIMAL

EXPRESION DE CITOCINAS DURANTE LAS DIFERENTES
ETAPAS DE INFECCION EN LA TUBERCULOSIS BOVINA.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
MARIA TERESA LUGO ARRIAGA

TUTOR: FERNANDO DIAZ OTERO

COMITE TUTORAL: GABRIELA BARCENAS MORALES

VICTOR TENORIO GUTIERREZ

MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

OFICIO/FES-C/CGPMYDCPySA/ST/CGEP/330/V/2003

ASUNTO: Designación de Jurado.

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DE POSGRADO
DE LA DIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
Presente.

El Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal autoriza a la alumna **MARIA TERESA LUGO ARRIAGA**, registrada con el número de cuenta 8407934-9, para presentar su examen de grado de la Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, con la tesis titulada "Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en la tuberculosis bovina" a quien se le ha designado el siguiente jurado:

Presidente:	DR. JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO
Vocal:	DR. VICTOR R. TENORIO GUTIERREZ
Secretario:	DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
Primer Suplente:	DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ
Segundo Suplente:	DR. FERNANDO DIAZ OTERO

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de mayo del 2003.

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
COORDINADOR GENERAL

C.c.p. Exp. de alumno
C.c.p. Archivo
FSG/HRA/mrc

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Av. 1º de mayo S/N, Campo 1, Edificio de Estudios de Posgrado,
Apartado Postal 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54700
Tel.: 5623-2018, Fax: 5868 2489





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
Presente

Me permito manifestar a usted que he estudiado la tesis que presenta para su examen de grado la alumna **M.V.Z. MARÍA TERESA LUGO ARRIAGA**, denominada: **“Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en la tuberculosis bovina”**.

Comentarios:

Le concedo mi aprobación sin modificaciones

().

No le concedo mi aprobación

().

Atentamente

DR. JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO
PRESIDENTE DEL JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
Presente

Me permito manifestar a usted que he estudiado la tesis que presenta para su examen de grado a la alumna **M.V.Z. MARÍA TERESA LUGO ARRIAGA**, denominada: **“Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en la tuberculosis bovina”**.

Comentarios:

Le concedo mi aprobación sin modificaciones ().

No le concedo mi aprobación ().

Atentamente

DR. VICTOR R. TENORIO GUTIÉRREZ
VOCAL DEL JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
Presente

Me permito manifestar a usted que he estudiado la tesis que presenta para su examen de grado a la alumna **M.V.Z. MARÍA TERESA LUGO ARRIAGA**, denominada: "Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en la tuberculosis bovina".

Comentarios:

el trabajo presenta algunas deficiencias
que han sido resueltas satisfactoriamente

Le concedo mi aprobación sin modificaciones (X).

No le concedo mi aprobación ().

Atentamente

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
SECRETARIO DEL JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
Presente

Me permito manifestar a usted que he estudiado la tesis que presenta para su examen de grado a la alumna **M.V.Z. MARÍA TERESA LUGO ARRIAGA**, denominada: "Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en la tuberculosis bovina".

Comentarios:

El trabajo es novedoso y cumple los requisitos de una Tesis de Maestría.

Le concedo mi aprobación sin modificaciones (X).

No le concedo mi aprobación ().

Atentamente

DRA. CAMILA ARRIAGA DÍAZ
PRIMER SUPLENTE DEL JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
Presente

Me permito manifestar a usted que he estudiado la tesis que presenta para su examen de grado a la alumna **M.V.Z. MARÍA TERESA LUGO ARRIAGA**, denominada: **"Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en la tuberculosis bovina"**.

Comentarios:

Le concedo mi aprobación sin modificaciones ().

No le concedo mi aprobación ().

Atentamente



DR. FERNANDO DÍAZ OTERO
SEGUNDO SUPLENTE DEL JURADO

Este trabajo se realizó en laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología) del INIFAP, como parte de las investigaciones que se llevan a cabo en el proyecto "Tuberculosis Bovina".

Trabajo parcialmente financiado por CONACYT. Proyecto N° 29137-B.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE GENERAL	I
Resumen	IV
Summary	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia	2
1.2. Etiología	4
1.3. Epidemiología	5
1.4. Diagnóstico	7
1.5. Prevención	8
1.6. Patogenia	10
1.7. Inmunidad de la tuberculosis	15
1.8. El papel de las citocinas en la tuberculosis	17
2. OBJETIVO GENERAL	20
3. OBJETIVOS PARTICULARES	20
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Animales de estudio (bovinos)	21
4.2. Obtención de muestras	21
4.3. Prueba de intradermorreacción (ID)	21
4.4. Prueba de interferón- γ (IFN- γ)	22
4.5. Prueba de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)	23
4.6. Extracción de DNA de hisopo nasal	24
4.7. Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
4.8. Conformación de grupos de animales de acuerdo a las pruebas establecidas	25
4.9. Optimización de tiempos y temperaturas para la PCR de las citocinas	26
4.10. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y condiciones de cultivo	26
4.11. Aislamiento de RNA. Técnica de TRIzol	29
4.12. Condiciones óptimas de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena	

de la polimerasa (RT-PCR)	29
5. RESULTADOS	
5.1. Animales de estudio (bovinos)	31
5.2. Optimización de la PCR	34
5.3. Expresión de citocinas por grupos	38
6. DISCUSIÓN	47
7. CONCLUSIONES	52
8. ABREVIATURAS	53
9. BIBLIOGRAFÍA	54
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	
FIGURAS	
Figura 5.1.1. Gráfica de resultados de IFN- γ	32
Figura 5.2.1. Gel de productos de amplificación de la PCR. β -actina	36
Figura 5.2.2. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-2	37
Figura 5.2.3. Gel de productos de amplificación de la PCR. IFN- γ	37
Figura 5.2.4. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-4	39
Figura 5.2.5. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-10	39
Figura 5.3.1. Resultados de RT-PCR para el grupo I	40
Figura 5.3.2. Resultados de RT-PCR para el grupo II	40
Figura 5.3.3. Resultados de RT-PCR para el grupo III	42
Figura 5.3.4. Resultados de RT-PCR para el grupo IV	42
Figura 5.3.5. Resultados de RT-PCR para el grupo V	45
Figura 5.3.6. Resultados de RT-PCR para el grupo VI	45
Figura 5.3.7. Resultados de RT-PCR para el grupo VII	46
CUADROS	
Cuadro 4.8.1. Selección de los grupos de acuerdo a las pruebas establecidas	27
Cuadro 4.9.1. Secuencia de iniciadores empleados	36
Cuadro 5.2.1. Optimización de tiempos y temperaturas para la amplificación de citocinas	36
Cuadro 5.1.1. Resultados de las pruebas de ID, IFN- γ , ELISA y PCR. Animales FES-C	32
Cuadro 5.1.2. Resultados de las pruebas de ID, IFN- γ , ELISA y PCR. Animales Tizayuca	33
Cuadro 5.1.3. Resultados de las pruebas de ID, IFN- γ , ELISA y PCR. Animales Tulancingo	33

Cuadro 5.1.4. Resultados de las pruebas de ID, IFN- γ , ELISA y PCR. Animales Xochimilco	35
Cuadro 5.1.5. Conformación grupos de acuerdo a los criterios establecidos en la tabla 1	35
APÉNDICE A	60
APÉNDICE B	60

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad zoonótica crónica que tiene como agente etiológico al *Mycobacterium bovis*. La TB constituye un serio problema de salud animal, causando pérdidas económicas debido a la baja producción de carne y leche, implicando además un peligro de transmisión al humano por productos contaminados de origen bovino. Las interacciones entre células inmunocompetentes, principalmente macrófagos / linfocitos T, caracterizan la respuesta inmune hacia tuberculosis como una inmunidad mediada por células (CMI). Los macrófagos presentan antígenos micobacterianos a las células T, los receptores de estas reconocen a los antígenos y responden produciendo ciertas citocinas que inducen la activación de otros macrófagos. La caracterización de células T cooperadoras en Th1, Th2 y Th0 en bovino, se basa en el patrón de secreción de citocinas. La cinética de transcripción de las citocinas provee una ventana dinámica para examinar la comunicación linfocítica durante el proceso de la TB. El Planteamiento de este trabajo fue establecer los patrones de expresión de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) por medio de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en bovinos. Se muestrearon 40 animales de hatos con diferentes prevalencias, a estos se les practicaron las pruebas de ID, IFN- γ , ELISA y PCR para establecer diferentes perfiles inmunes. Se obtuvo sangre con EDTA para separar leucocitos por gradiente, se ajustaron a 5×10^6 células y se estimularon con PPD bovino, PPD aviar, Con A y sin estimular, además se tomó suero para la prueba de ELISA, empleando como antígeno extracto protéico de filtrado de cultivo de *M. bovis* y *M. avium*. Para evaluar la expresión de las citocinas se emplearon iniciadores específicos para cada citocina, se usó un control positivo interno (β -actina). De acuerdo a los perfiles inmunes encontrados se conformaron 7 grupos. La expresión de las citocinas fue representada como la intensidad relativa de las bandas encontradas en los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio utilizando el software LabWorks 4.0. En este trabajo no existió una correlación en todos los grupos entre animales positivos a ID e IFN- γ con la expresión de IFN- γ e IL-2. En el grupo de animales ELISA positivos (grupo IV) se observó claramente que existe preferentemente expresión de IL-10.

SUMMARY

Bovine tuberculosis (BT) is a chronic zoonotic disease whose etiological agent is *Mycobacterium bovis*. It constitutes a serious animal health problem, causing economic losses due to decreased meat and milk production. The interaction between immunocompetent cells, principally macrophages/ T lymphocytes, they characterize the immune response to the tuberculosis like a cell mediated immune (CMI). The macrophages present mycobacterial antigens to T cells. The receptors of them producing certain cytokines that induce the activation of other macrophages. The characterization of T helper Th1, Th2 and Th0 cell subsets in bovine, is support on the secretion of cytokine pattern. Transcriptional cytokine kinetics provide a dynamic window to examine lymphocytic communication during the process of the BT. The proposition of this report was establish the pattern of cytokine expression (IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10) by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in bovine. Forty cows were examined with different prevalences, these were practiced the tests of ID, IFN- γ , ELISA and PCR to establish different profiles. Blood was obtained by EDTA to isolated, cells were cultivated at a density of 5×10^6 and them were stimulated by bovine PPD, avian PPD Con A and without stimulation, plus it was obtained serum for ELISA test, using like antigen CFPE of *M. bovis* and *M. avium*. To evaluated the cytokines were using specific primers for each cytokine it was used β -actin as a control. In agreement to the immune profiles found to conform seven groups. The expression of cytokines was represented as relative intensity of ethidium bromide stained bands using the Labworks 4.0 software. In this study did not exist a correlation in all the groups between positive animals to ID and IFN- γ with the expression the IFN- γ and IL-2. At the group of animals positive ELISA (group IV) was clearly observed that exist preferently expression of IL-10.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad zoonótica crónica que tiene como agente etiológico a *Mycobacterium bovis*. La TB constituye un serio problema de salud animal, causando pérdidas económicas debido a la baja en la producción de carne y leche. El principal hospedero de *M. bovis* es el ganado bovino, otros animales domésticos como perros y gatos pueden ser afectados, en estos últimos la principal vía de infección es alimento de origen bovino, como tejido pulmonar sin cocer; el hombre también puede ser hospedero de *M. bovis* (Cami *et al.*, 2001).

Las interacciones entre las diversas poblaciones de células inmunocompetentes, particularmente entre macrófagos y células T CD₄⁺ cooperadoras (Th), Th0, Th1 y Th2 y T CD₈⁺ citotóxicas en bovino, caracterizan la respuesta inmune hacia tuberculosis como una inmunidad mediada por células (CMI). Los macrófagos juegan un papel crucial en la generación de esta respuesta inmune. Estos fagocitan al bacilo y presentan antígenos micobacterianos a las células T; así, los receptores específicos de las células T reconocen a los antígenos y responden produciendo interleucinas como interferón gamma (IFN- γ), el cual con algunas citocinas de macrófagos y componentes micobacterianos inducen la activación de otros macrófagos. Los macrófagos activados son elementos claves en la inmunidad antimicobacteriana, ya que eliminan al bacilo y a las células infectadas con mayor eficiencia (Hernández-Pando *et al.*, 1997a).

La interacción entre los macrófagos y las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, permiten producciones específicas de citocinas, así en una población heterogénea pueden caracterizarse patrones de respuesta a antígenos extraños; por lo que, la cinética de transcripción de las citocinas provee una ventana dinámica para examinar la comunicación linfocítica durante el desafío inmune. En un afán de lograr descifrar esta comunicación se ha experimentado con diversas técnicas; una de ellas es la exitosa aplicación de la transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para detectar RNAm de citocinas bovinas en sangre periférica. Este método de detección de citocinas es rápido, económico y se pueden determinar distintas citocinas simultáneamente durante una respuesta inmune (Covert y Splitter, 1995). Sin embargo un mejor entendimiento de la respuesta inmune contra la tuberculosis bovina es requerida para facilitar el desarrollo de mejores medidas de control. Así, la observación de los perfiles de citocinas en animales con diferente respuesta inmune pueden contribuir a el entendimiento de esta respuesta inmunológica (Ng *et al.*, 1997).

1.1. Historia de la Tuberculosis bovina

Las bacterias han sido siempre y siguen siendo la forma de vida dominante sobre la Tierra. El fósil más antiguo que se ha encontrado es el de una célula sin organelos (célula procariota o bacteria) cuya aparición se estima hace unos 3, 500 millones de años (Manning y Collins, 2001).

El primer microorganismo patógeno en humanos, perteneciente al género *Mycobacterium* descubierto fue *Mycobacterium leprae* (Bloom y Murray, 1992). El *M. tuberculosis*, especie perteneciente a este género, fue descubierto poco tiempo después. Roberto Koch encontró esta micobacteria asociada constantemente con lesiones tuberculosas, la aisló en cultivo puro a partir de casos clínicos, reprodujo la enfermedad en animales de experimentación (cobayos) y recuperó el bacilo nuevamente en los animales que había infectado. Después del hallazgo de Koch fue posible el descubrimiento de nuevas especies, entre las que se cita al *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. kansasii* y *M. bovis* (Bloom y Murray, 1992).

Existen evidencias de la aparición de la tuberculosis en el año 3000 a.C. en el norte de África. En la era pre-dinástica de la cultura egipcia se han descubierto figurillas y pinturas mostrando deformaciones óseas características de esta enfermedad. En los indígenas de América del norte, también se han encontrado indicios de tuberculosis. En oriente se descubrió en 1850 en las islas Hawaianas. Recientemente se encontró evidencia de tuberculosis pulmonar, incluyendo la presencia de organismos ácido resistentes en momias del Perú, de individuos que vivieron hace 700 años d.C. (Morris *et al.*, 1985).

La enfermedad en el ganado, conocida como TB, fue primeramente descrita por Columella en el norte de Italia en el siglo XIV. La TB ha sido controlada o erradicada en numerosos países por el uso de las pruebas de diagnóstico y programas de sacrificio de animales reactivos a la tuberculina, pero la presencia de esta enfermedad es silenciosa en muchos países. Ahora es bien conocido que los animales de vida salvaje son reservorios y juegan un importante papel en la diseminación de *M. bovis* al ganado y hacen que la erradicación de la enfermedad sea extremadamente difícil bajo ciertas circunstancias (Bloom y Murray, 1992). En 1889 Rivolta, demostró que el bacilo aviario no era idéntico al bovino, y en 1898 Smith encontró ciertas diferencias en las características, entre los tipos humano y bovino.

En el siglo XVII los anatomistas italianos A.M. Valsalva y G.B. Morgani, sospecharon el carácter contagioso de la tuberculosis, pero hubo que llegar a 1865 para que el veterinario francés Jean Antoine Villemin demostrara este hecho, infectando conejos con pus procedente de lesiones de

humanos. Sin embargo el descubrimiento permaneció ignorado por sus contemporáneos, incluido el médico y microbiólogo alemán R. Koch, que en 1882 aisló al bacilo responsable, el *M. tuberculosis*. En 1897, C. Flügge médico alemán, sospecho que las gotas emitidas con la tos, llamadas desde entonces gotitas de Flügge, eran el origen de la contaminación. Esta vía de contagio fue confirmada en 1913 por P. Chaussé. Este médico francés demostró que los bacilos pueden permanecer durante años en los esputos secos o en la ropa (Marchal, 1992).

Quizá la tuberculosis como tal, apareció como una enfermedad endémica, primero en animales causada por *M. bovis*, antes que en el humano (Steele y Ranney, 1958). Ya que *M. tuberculosis* es capaz de infectar primates. Se ha considerado que existió primero en primates no humanos y posteriormente en humanos (Morris *et al.*, 1985).

Puesto que es una enfermedad que se presenta en condiciones de hacinamiento e insalubridad, probablemente no tubo importancia en las culturas nómadas, pero comenzó aparecer con el desarrollo de la agricultura. Con la revolución industrial la tuberculosis asumió importancia como causa de muerte e incapacidad (Kochi, 1991).

A pesar de que la tuberculosis ha dejado de ser un problema en muchos países industrializados hace décadas, esta siempre ha sido común en países en desarrollo con una prevalencia estimada anual de alrededor de 4 millones de casos clínicos, de los cuales aproximadamente el 25% son causa de muerte. En los últimos años la tendencia de decremento del número de casos de tuberculosis en los países industrializados se ha revertido y la infección con cepas altamente resistentes a antibióticos ha empezado a dar problemas clínicos significativos, particularmente en Estados Unidos (EU) (Kissane, 1985).

Aunque la TB es una enfermedad muy antigua, sus efectos sobre la producción y sobre la salud pública recién comenzaron a ponerse de manifiesto a fines del siglo XIX y principios del XX, con el desarrollo de la industria ganadera en Europa y América. En Alemania e Inglaterra hasta el 50% del ganado lechero presentaba entonces lesiones tuberculosas en la inspección post-mortem en el matadero. La alimentación de niños con leche cruda contaminada con *M. bovis* producía infección tuberculosa primaria y más del 20% de los casos de tuberculosis infantil era debida al bacilo bovino en estos países (Kochi, 1991).

1.2. Etiología de la Tuberculosis bovina.

Las micobacterias ocupan un nicho taxonómico entre las eubacterias y los actinomicetos. El género *Mycobacterium* es uno de los más antiguamente definidos. El nombre genérico *Mycobacterium* inicialmente designaba a un grupo de organismos que crecían como películas algodonosas parecidas a hongos sobre medio líquido. Las micobacterias son definidas como actinomicetos en forma de bastones rectos o curvos con ramificaciones ocasionales, aeróbicos, ácido-alcohol resistentes, positivos a la tinción de Gram, hifas aéreas ausentes normalmente. Son organismos sin esporas que contienen arabinosa y galactosa en la pared celular (Kissane, 1985; Chapman, 1997), es de lento crecimiento, su dependencia a el oxígeno molecular explica en parte su propensión a crecer en los pulmones y su tendencia a reactivarse en regiones apicales en donde la presión alveolar de oxígeno es alta (Kissane, 1985).

M. bovis es una de las especies del complejo tuberculosis, lo componen un grupo de especies micobacterianas que incluyen al *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. microti*. Una variante de colonia lisa de *M. tuberculosis*, denominada *M. canetti* ha sido propuesta como un miembro adicional de este complejo (Ashford *et al.*, 2001).

En sentido amplio la envoltura celular micobacteriana incluye la membrana plasmática y la pared celular de la bacteria. El centro de la pared celular está compuesto de tres moléculas: péptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos (mAGP) y lipoarabinomanosa (LAM). El peptidoglicano de la pared celular es un polímero altamente entrecruzado, formado por aminoazúcares y aminoácidos (unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-glicolilmurámico), que se encuentra rodeando a la membrana plasmática; las moléculas de ácido murámico presentes en su estructura están unidas covalentemente al complejo micolil-arabinogalactano, formado por el arabinogalactano (polisacáridos de arabinosa y galactosa), que se encuentran esterificando a los ácidos micólicos (ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono (Drapee, 1991, Rastogi, 1991, Ausina, 1995). El mAGP es un fuerte inmunógeno, pero se desconoce mucho acerca de sus interacciones con las células del hospedero y por otro lado, se ha especulado que este provee una barrera protectora al paso de las drogas (Besra y Chatterjee, 1994).

Otro grupo importante de componentes de la pared celular son los acil trealosa-2'-sulfatos, estos sulfátidos parecen promover la supervivencia del bacilo tuberculoso virulento dentro de los macrófagos inhibiendo la formación del fagolisosoma y evitando la exposición a enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas (Thoen y Steele, 1995, Felton y Vermeulen, 1996).

El principal glicolípido, es el LAM, formado por residuos de D-arabinosa y D-manosa. El LAM exhibe un amplio espectro de funciones inmunorreguladoras, entre las que se encuentran por un lado, anular la activación de las células T, inhibir la activación de los macrófagos mediada por el IFN- γ , así como la actividad de la proteína quinasa C; también estimula la producción de citocinas por los macrófagos, las cuales pueden provocar muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis, además es un potente productor de radicales oxígeno (Lee *et al.*, 1996, Thoen y Steele, 1995).

1.3. Epidemiología de la Tuberculosis bovina

Previo al control de la TB y a la implementación de los programas de pasteurización en el norte de Europa, la mayoría de infecciones por *M. bovis* en humanos fueron extra pulmonares, siendo los sistemas más afectados el linfoide (gastrointestinal), piel, óseo, genito-urinario y sistema nervioso central (meningitis) (Ashford *et al.*, 2001).

Actualmente la difusión de casos de TB en países en desarrollo y su potencial contribución a la prevalencia de la tuberculosis humana, han aumentado el interés de los casos que se presentan en ganado. Los programas para erradicar la TB basados en "prueba y sacrificio" son un inicio para la eliminación de animales infectados con *M. bovis*, pero es una alternativa costosa y socialmente inaceptable en muchos países en desarrollo (Wedlock *et al.*, 2000).

No se conoce con precisión el nivel de incidencia y prevalencia de la TB en muchos países del mundo, debido principalmente a la complejidad de su diagnóstico y a la falta de sistemas de notificación. Sin embargo, el número de infecciones por *M. bovis* entre humanos puede ser estimada por datos existentes de incidencia de tuberculosis, y prescindiendo de algunos datos se obtiene la proporción de tuberculosis por *M. bovis* en varias partes del mundo. En Europa y Norte América de 0.5 % a 1.0 % de casos de tuberculosis humana se estima que son el resultado de infecciones por *M. bovis*. En países en los cuales la TB es aún común y la pasteurización es rara, un estimado de 10 % a 15 % de casos humanos de tuberculosis son causados por *M. bovis* (Ashford *et al.*, 2001). En países de Sudamérica, como Argentina, la prevalencia de infección en ganado es más alta que en Norte América o el Norte de Europa, pero se pasteuriza o hierva rutinariamente la leche antes de su consumo, *M. bovis* es responsable del 1 % al 6 % de casos de tuberculosis humana. En los noventas, un estimado de nueve millones de casos de tuberculosis ocurrieron cada año en todo el mundo (aproximadamente el 10 % fueron individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH]), se sugiere que del 1 % al 15 % de estos casos podrían ser causados por *M. bovis*,

una incidencia anual en todo el mundo entre 90, 000 y 1, 350, 000 casos de tuberculosis asociada a *M. bovis* pueden ser estimados (Ashford *et al.*, 2001).

Las poblaciones en riesgo de contraer la infección por *M. bovis* incluyen cualquier población que consuma leche infectada sin pasteurizar, ordeñadores, veterinarios y poblaciones infectadas con VIH o potencialmente inmunocomprometidas. Dado que el VIH y la transmisión por *M. bovis* son altas en África, con 90 % de la población viviendo en áreas en las cuales ni la pasteurización ni los programas de control de TB ocurren y 1 de cada 10 adultos están infectados con el VIH, la asociación entre estas dos enfermedades es de particular interés para la mayor parte de este continente (Ashfor *et al.*, 2001). En EU, la prevalencia de hatos infectados con TB fue estimada en 0.003 % y TB todavía afectaba a Puerto Rico y ocho estados de EU en 1994, mientras que América Latina y el Caribe, constituyen un área de alta prevalencia de TB (Rastogi *et al.*, 2001).

La total erradicación de TB aún no se ha conseguido en países industrializados, principalmente por la existencia de reservorios de vida libre, que varían enormemente de acuerdo al área geográfica. En Canadá, la TB en ciervos fue reconocida como un problema potencial en los años noventa. Concerniente a los posibles reservorios de *M. bovis*, el tejón se conoce como un hospedero susceptible en Gran Bretaña, mientras que en Nueva Zelanda, el possum brushtail es la fuente principal de casos nuevos de TB en ganado. En Australia, los marsupiales han sido reconocidos como hospederos susceptible (Rastogi *et al.*, N). Otro aspecto de interés es la tuberculosis en animales de vida salvaje cautivos, algunos ejemplos incluyen, la infección por *M. bovis* en venado cola blanca en Michigan, EU, así como búfalos en el Kruger National Park en Sudáfrica. En el primer caso, se siguió un extenso programa de vigilancia, la misma cepa de *M. bovis* fue aislada de múltiples especies, incluyendo el venado cola blanca y cinco especies de carnívoros que se alimentan de este venado. Además se diagnosticaron animales infectados en una granja de venados, un hato de ganado lechero y siete hatos de ganado de carne (Schmitt *et al.*, 2002).

La prevalencia de tuberculosis bovina (TB) en la parte norte de México, en 1995 fue estimada en 2.1% para el ganado lechero y en un 0.1% para el ganado de carne. Sin embargo, en la parte centro y sur de México, los valores de tuberculosis bovina fueron mayores. En estas regiones se detectaron establos lecheros con prevalencias mayores al 25% de TB. La presencia de esta enfermedad en hatos lecheros, han constituido un riesgo potencial importante de salud pública, tanto por el consumo de productos no pasteurizados, como por el contacto de los trabajadores en el campo y en el ámbito de rastro de los animales infectados (Valdespino *et al.*, 1995.).

1.4. Diagnóstico de la Tuberculosis bovina

La prueba estándar para el diagnóstico de la TB es la prueba intradérmica de la tuberculina (ID), la cual identifica una respuesta de hipersensibilidad retardada (del inglés DTH) a una inyección de derivado protéico purificado (del inglés PPD) obtenido de un cultivo de *M. bovis* cepa AN5. Sin embargo, algunos inconvenientes que la prueba de la tuberculina sufre son baja sensibilidad (70 %) y especificidad (50-60%), además de que interfiere con el estado inmune del ganado con respecto a repeticiones de la prueba y no detecta la infección en etapas iniciales o finales de la enfermedad (Fifis, *et al.*, 1994).

Las razones para las aparentes fallas de la ID bajo las condiciones de campo son complejas: las fallas operacionales y el fenómeno temprano de inmunosupresión pueden jugar un papel principal; en particular, la respuesta a la ID es fluctuante (al menos *in vitro*) y está afectada por los circuitos regulatorios antígeno específicos; estos podrían suprimir la respuesta la ID, probablemente por un mecanismo circundante (Amadori *et al.*, 2002).

Se han realizado intentos por reemplazar la prueba de la ID desarrollando pruebas serológicas (fijación del complemento e inmunoensayo ligado a enzima [ELISA]), pruebas de hemaglutinación, pero estos han resultado inútiles (Nayak *et al.*, 2001). Dentro de los problemas para emplear estas pruebas se menciona la alta proporción de animales infectados con pocos anticuerpos o anticuerpos no detectables hacia antígenos micobacterianos. El ganado vacuno, los humanos y algunas otras especies animales preferentemente establecen una fuerte respuesta celular a infecciones micobacterianas. Las pruebas celulares *in vitro* tales como la proliferación linfocítica han demostrado útiles en el diagnóstico de la TB, aunque son caras y laboriosas (Fifis *et al.*, 1994).

En 1990 la prueba IFN- γ se describió como una prueba diagnóstica *in vitro* para tuberculosis en ganado vacuno. Esta prueba es significativamente más sensible que la prueba de tuberculina simple y produce resultados más certeros en un tiempo más corto (Rothel *et al.*, 1990).

Esta técnica es una medida de la CMI, y se basa en la estimulación *in vitro* de sangre heparinizada, usando como antígeno el PPD de micobacterias. Como resultado de la estimulación antigénica, los linfocitos T circundantes que se encuentran presentes en la muestra de sangre secretan IFN- γ , que es medido mediante una prueba de ELISA de captura (Domingo *et al.*, 1995). La utilización de la prueba de IFN- γ , u otras similares que puedan desarrollarse en el futuro, pueden ayudar a erradicar la TB, pero ha de tenerse en cuenta que otros factores, no relacionados con la eficacia de las

técnicas empleadas, y tal vez incluso de más relevancia, también dificultan la consecución de la erradicación (Domingo, M).

Otra prueba *in vitro* propuesta, es la detección de IgG anti-micobacteria circulantes, empleando una técnica de ELISA que permite determinar niveles de anticuerpos específicos. Se ha observado que los niveles altos de anticuerpos IgG circulantes anti-micobacteria tienen buena correlación con la presencia de lesiones tuberculosas importantes y la existencia, por tanto, de gran cantidad de antígeno bacilar en el organismo del animal. Esto tiene aplicación en situaciones de prevalencia media o elevada, en donde en una primera etapa se podrían ir seleccionando y eliminando los animales con enfermedad avanzada, que son la principal fuente de infección en el hato, o animales anérgicos, que pueden tener cantidades detectables de anticuerpos circulantes, y sin embargo, no manifestar reacción a las pruebas de tipo celular como la tuberculina. Por lo que, esta puede ser una herramienta útil para la identificación de vacas infectadas cuando la erradicación a corto plazo no es posible (Rittaco, 1991; Wood, 1992).

Los métodos de amplificación enzimática de DNA, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permiten acortar el tiempo de diagnóstico. Los parámetros a optimizar para llegar a una alta sensibilidad con la correcta elección de iniciadores, las condiciones de amplificación y el disponer de un método eficaz de lisis de la bacteria para obtener la mayor cantidad posible de DNA. Otra de las ventajas del uso de la PCR en el diagnóstico, es su especificidad, ya que los iniciadores que se emplean en la amplificación son específicos del genoma del organismo en estudio. De esta manera solo amplificará la secuencia blanco seleccionada, aún en presencia de exceso de DNA de células somáticas (Zumárraga *et al.*, 2001). Para el estudio en tejido se ha reportado la PCR en tiempo real, la cual además de incrementar la rapidez, permite la cuantificación de la carga bacteriana inicial. El principio del método es el empleo de una sonda fluorescente de tal manera que la cantidad de producto amplificado es directamente proporcional a la intensidad de la fluorescencia detectada. Por otra parte, debido a que es un método automatizado, proporciona la ventaja de ser altamente reproducible y de evitar la manipulación de la muestra luego de la amplificación, lo cual evita la contaminación con otros microorganismos (Taylor *et al.*, 2001).

1.5. Prevención de la Tuberculosis bovina

Un método para reducir la TB es el desarrollo de vacunas en ganado bovino, una vacuna en ganado reduciría el riesgo de infección en bovinos (Cockle *et al.*, 2002). Actualmente, una cepa atenuada de

M. bovis, la BCG, es la única vacuna disponible para la prevención de la tuberculosis; sin embargo, la inconsistencia en la efectividad de la BCG tanto en humanos como en ganado vacuno y su interferencia en la detección de animales infectados en la prueba intradérmica hace necesario el desarrollo de mejores vacunas. Una vacuna mejorada de tuberculosis para animales tendría también, probablemente aplicación en humanos. Por consiguiente, tanto en países industrializados en donde hay la persistencia de animales de vida salvaje infectados así como en países en desarrollo, el uso de una nueva vacuna contra la tuberculosis bovina es una seria consideración (Wedlock *et al.*; Cockle *et al.*, 2002).

Recientemente se ha reportado que la resistencia hacia micobacterias y la protección efectiva de *M. bovis* BCG en diferentes partes del mundo, puede ser atribuida a una exposición variable a micobacterias medio ambientales, bastante distintas de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Esto es compatible con el hecho de que las micobacterias están presentes en todas partes pero no forman parte de la flora normal del humano, así que la naturaleza, ruta y dosis de exposición a micobacterias saprofitas medio ambientales son variables y depende de donde y como viva cada individuo (Hernández-Pando *et al.*, 1997b).

Por otro lado, se ha encontrado que el uso de la BCG puede ser patógena en situaciones de inmunidad comprometida o deficiente, por lo que su empleo puede estar contraindicado en estos individuos con alto riesgo a contraer la enfermedad. Este problema ha sido dirigido recientemente al uso de herramientas de genética molecular para generar mutantes de BCG. Así con la ayuda de esta herramienta se ha logrado la delección de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y purinas de una vacuna BCG, obteniendo una mutante auxotrófica de BCG que fue incapaz de persistir en ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos; pero, sin embargo, estas fueron capaces de persistir el tiempo suficiente para generar una inmunidad protectora, sugiriendo que tales mutantes de BCG podrían ser empleadas para la vacunación de individuos con inmunidad deficiente o comprometida (Chambers *et al.*, 2000).

Otra alternativa empleada para conferir protección ha sido la co-administración de interleucina-2 (IL-2) con una vacuna a partir de proteínas de filtrado de cultivo (CFP) de *M. tuberculosis* la cual aumenta la protección inducida por la vacuna contra la tuberculosis en cuyes. Por otra parte, trabajos realizados en bovinos empleando una mezcla de CFP e IL-2 a diferentes dosis y desafiados vía intratraqueal con *M. bovis*, mostraron una alta respuesta de anticuerpos antígeno-específicos y bajos niveles de IFN- γ e IL-2 liberados en cultivos de sangre completa estimulada con PPD en

comparación con animales vacunados con BCG. Además, la vacunación de ganado con CFP-IL-2 redujo la severidad de las lesiones en los pulmones tuberculosos. Sin embargo, en comparación con animales control o animales vacunados con BCG, estos presentaron más lesiones tuberculosas extratorácicas y el nivel de protección fue más bajo que el conferido con BCG (Wedlock *et al.*, 2000). El tipo de respuesta inmune inducido posterior a la vacunación con CFP incluye un componente humoral substancial, en comparación a una respuesta fuerte de IFN- γ inducido por la vacunación con BCG. En conclusión, las vacunas CPF no proveen una alternativa para las vacunas BCG, pero han dado algunos resultados inesperados, los cuales tienen el potencial de conducirnos a un mejor entendimiento de la inmunidad protectora contra la tuberculosis bovina. Las vacunas CPF para el control de la tuberculosis bovina tienen la ventaja de no comprometer el uso de la prueba intradérmica de la tuberculina. Mejoras podrían ser hechas con la inclusión de adyuvantes fuertes e incorporando otras citocinas como la IL-12 que promueve la respuesta IFN- γ antígeno específica (Wedlock *et al.*, 2000).

El diseño racional de una vacuna más efectiva y mejores agentes quimioterapéuticos contra la tuberculosis requieren de un mejor entendimiento de la patogénesis de la infección, particularmente durante las etapas tempranas, de las cuales se conoce poco (McDonough *et al.*, 1993).

1.6. Patogenia de la Tuberculosis bovina

La exposición de bovinos con aerosoles de *M. bovis* es considerada la ruta más frecuente de infección; la totalidad de las lesiones generalmente involucran los nódulos linfáticos pulmonares y torácicos. El ganado expuesto a la ingestión de alimento y agua contaminados con *M. bovis* frecuentemente desarrollan focos primarios en tejido linfoide asociado a intestino (GALT) (Thoen y Steele, 1995).

Aunque los signos referibles a la localización en un órgano determinado suelen atraer la atención hacia la posible presencia de tuberculosis, son siempre evidentes ciertos signos generales. Algunos bovinos con lesiones tuberculosas miliares extensas son clínicamente normales, pero el enflaquecimiento progresivo no acompañado de otra enfermedad debe despertar siempre sospecha de tuberculosis. En casos avanzados cuando gran parte del pulmón ha sido destruido, es evidente la disnea con aumento de la frecuencia y de la profundidad de las respiraciones (Blood *et al.*, 1987).

El espacio mucociliar entre el moco y el epitelio ciliar del aparato respiratorio alto provee defensas contra la infección por inhalación de micobacterias. Sin embargo, los microorganismos sobre

partículas como polvo y pequeñas gotas de agua que no inciden contra la capa mucociliar pueden pasar a través de los bronquiolos terminales, así ganan el acceso a los alveolos terminales (Thoen y Steele, 1995).

La respuesta primaria por la presencia del bacilo en el tejido resulta en un influjo de células inflamatorias, como leucocitos polimorfonucleares (PMN's) y fagocitos mononucleares, estos últimos ingieren a la micobacteria y pasan a través de la línea de los bronquiolos, siendo el mecanismo de diapedesis la manera por la cual los macrófagos alveolares infectados pasan el bacilo a la circulación, llegando a nódulos linfáticos, parénquima pulmonar y otros sitios (Dobos *et al.*, 2000).

También se ha observado que la micobacteria puede entrar a los macrófagos a través de los receptores para las fracciones CR1 y CR3 del complemento, sugiriendo que la ruta de ingreso puede influir en el curso de los eventos posteriores a la ingestión del bacilo tuberculoso por los macrófagos, dando como resultado falla en la fusión del fagolisosoma o en una inapropiada explosión respiratoria y otros mecanismos citocidas. En general, se cree que la muerte e inhibición del crecimiento de los patógenos intracelulares dentro de los fagocitos mononucleares son dependientes de la fusión del fagolisosoma. Algunos estudios indican que el bacilo puede inhibir la fusión fagolisosoma y que los patrones de fusión de los macrófagos infectados con el bacilo virulento es afectado por la presencia o ausencia de componentes serológicos en el momento de la infección. Otros estudios señalan que la fusión del fagolisosoma puede realizarse en macrófagos de ratones por opsonización con anticuerpos, el patógeno sin embargo, permanece capaz para sobrevivir bajo estas condiciones. Además existe evidencia de que la fusión del fagolisosoma puede efectivamente ser estimuladora para el crecimiento del bacilo dentro del macrófago (McDonough *et al.*, 1993).

Dentro de los mecanismos bioquímicos de defensa en los macrófagos se encuentran los radicales de oxígeno reactivo, que son liberados después de la ingestión del microorganismo, estos son efectivos en la eliminación de otras bacterias pero parecen tener poco efecto sobre *M. bovis* (Thoen y Steele, 1995). El óxido nítrico (NO) exhibe una amplia variedad de importantes funciones *in vivo*, actuando como un factor liberador mediador de la vasodilatación, como molécula reguladora y principal mediador citotóxico del sistema inmune. Este es sintetizado constitutivamente, expresado por la sintasa de NO (cNOS) por periodos cortos de tiempo. También es sintetizado por una isoforma inducible de NOS (iNOS) que, una vez expresada, produce NO por largos periodos de tiempo (Morikawa *et al.*, 2000).

En hospederos que son susceptibles a la infección, la micobacteria es capaz de replicarse dentro del macrófago. Durante las etapas críticas iniciales de supervivencia y crecimiento, es posible que la micobacteria libere proteínas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune del hospedero, por lo tanto, los estadios preeliminarios de residencia intracelular determinan la supervivencia micobacteriana, si el bacilo es capaz de replicarse exitosamente (Aldwell *et al.*, 2000).

Algunas proteínas secretadas, se asume que ejercen importantes funciones biológicas que interfieren con el medio de la célula huésped. Una de estas proteínas liberadas en grandes cantidades para el crecimiento de la micobacteria es la superóxido dismutasa (SDO). Esta enzima es responsable de la eliminación de radicales de oxígeno reactivo, se cree que estos son las moléculas más tóxicas en la mezcla bactericida contenida en el fagolisosoma (Andersen *et al.*, 1991).

Como ya se mencionó anteriormente un porcentaje muy elevado de infecciones primarias sanan espontáneamente, pero el bacilo permanece dentro del cuerpo, probablemente por toda la vida del huésped (Chapman, 1991), así que, el progreso o control de la infección es atribuido exclusivamente a una respuesta inmune celular (Fifis *et al.*, 1994), por lo que las células implicadas en limitar o eliminar al bacilo, son los macrófagos que han sido reclutados por citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y por quimiocinas. Estas moléculas son producidas en conjunto por células endoteliales, epiteliales y macrófagos alveolares. Las citocinas proinflamatorias regulan positivamente la expresión de moléculas de adhesión como CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1) y CD62-E (selectina-E) en el endotelio y en los leucocitos, de esta forma los leucocitos circulantes pueden migrar al sitio de lesión mediante un proceso inflamatorio finamente regulado. El aumento en la concentración plasmática de estas citocinas proinflamatorias produce fiebre y en procesos crónicos puede generar caquexia (Jiménez *et al.*, 2001).

Durante la fase temprana de la infección, algunas quimiocinas como IL-8 atraen a PMN's, los cuales pueden fagocitar a la micobacteria, sin la capacidad suficiente para eliminarla. La función de los PMN's es contener a la micobacteria evitando su diseminación, mientras son sustituidos gradualmente por macrófagos activados. Otras quimiocinas (MCP-1, MIP-1 α , RANTES, IP-10 Mig, I-TAC) dirigen la migración de monocitos y linfocitos para la formación del granuloma el cual tiene la finalidad de restringir el crecimiento bacilar confinando a las micobacterias en un sitio (Jiménez *et al.*, 2001).

Se conoce que la formación de granulomas en humanos está asociada con la expresión de cierto patrón característico de citocinas, encontrándose una abundante expresión de RNA's mensajeros

para IL-1, IFN- γ , factor de necrosis tumoral- β (TNF- β), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) e IL-12 (p40) (Bergeron *et al.*, 1997).

Los granulomas son estructuras dinámicas compuestas de múltiples tipos celulares, y todos los granulomas inmunes están compuestos por la presencia de una acumulación central de neutrófilos en los estadios primarios y células mononucleares, que se encuentran rodeadas por un infiltrado de células T activadas (Bergeron *et al.*, 1997). Entre la cuarta y sexta semanas posteriores a la infección, la necrosis aparece en los granulomas y las células gigantes son comúnmente vistas cerca de esta área, el tejido que rodea la lesión se vuelve edematoso y el número de micobacterias disminuye, la necrosis asume una apariencia reseca semejante a un queso por lo que es llamada necrosis caseosa. Las condiciones en el centro de la necrosis caseosa no son favorables para la rápida proliferación del bacilo, debido a la baja en el pH y la tensión de oxígeno. Generalmente el número de organismos continúa en decremento y se forma una cápsula fibrosa rodeando la zona de inflamación inespecífica. Ocasionalmente, el tejido fibroso no es aparente y la lesión asume una apariencia más difusa (Kissane, 1985; Fifer *et al.*, 1994). Las células inflamatorias disminuyen y sales de calcio generalmente se depositan en el material caseoso. Si la micobacteria es particularmente virulenta o la resistencia del hospedero es baja, el granuloma puede continuar agrandándose por crecimiento centrífugo. Granulomas satélites se pueden formar, crecer y coalescer con el granuloma original. Ocasionalmente en uno o más granulomas el centro caseoso se licua, adquiriendo una consistencia fluida, producida principalmente por proteasas y otras hidrolasas elaboradas por células epiteliales y macrófagos en el granuloma. Cuando el contenido del granuloma se licua, comienza un rápido crecimiento extracelular del microorganismo, estableciéndose un escenario apto para la diseminación de la enfermedad (Kissane, 1985). Sin embargo, tanto la extensión del granuloma, así como las características morfológicas de los granulomas resultantes están sujetos a una variabilidad considerable, esta puede estar asociada con diferencias en la capacidad de reacción para eliminar patógenos intracelulares y/o contribuir a la patología del tejido (Converse *et al.*, 1996); por lo que el progreso o control de la infección es atribuido exclusivamente a una respuesta CMI (Thoen y Steele, 1995).

Por otro lado, se ha demostrado que ciertas cepas de ratón, aunque son capaces de controlar inicialmente una infección por aerosol en dosis baja de *M. tuberculosis*, eventualmente sucumben durante la fase crónica de la enfermedad. Mientras que la mortalidad temprana se asoció con un incremento en la carga bacteriana dentro del pulmón y ocurrió anterior a eventos que serían

atribuidos a vejez. La comparación de la patología en ratones propensos a la reactivación, que fueron capaces de mantener un estado de enfermedad crónica culminante, tuvieron profundas diferencias en relación a las primeras semanas de la infección. De estos, la diferencia más obvia fue la predominancia de macrófagos, combinada con un influjo mínimo de linfocitos, dentro de las lesiones de las cepas de ratones susceptibles. Esta ausencia de linfocitos fue asociada con una falla para regular las moléculas de adhesión CD11a y CD54 de las células T. Estos datos implican que las cepas de ratón propensas a este resurgimiento o reactivación del fenómeno son poco capaces de reclutar linfocitos en el sitio de la infección y que esta falta de habilidad predispone al animal a una probabilidad incrementada de resurgimiento bacteriano un tiempo después (Turner *et al.*, 2001). En el caso de la enfermedad causada por *M. tuberculosis* es frecuentemente debida a una reactivación de una infección latente que el paciente podría haber llevado por años. Además frecuentemente se ha especulado que durante la fase crónica de la infección la bacteria permanece en alguna fase de estado latente (Turner *et al.*, 2001). Se ha observado que en etapas terminales de una infección tuberculosa crónica puede haber también una pérdida de reactividad a la prueba de tuberculina y anergia generalizada asociada con falla de las células T para proliferar en respuesta a antígenos micobacterianos (Kissane, 1985; Bloom, 1994).

Esta falla en la proliferación linfocítica y la producción de IL-2 es provocado en gran parte por la depleción de monocitos. Estos efectos han sido observados específicamente con PPD pero no con antígenos diferentes a los micobacterianos. La actividad supresiva antígeno específica ejercida por los monocitos de pacientes tuberculosos parece resultar de la sobre expresión de factores supresivos que son producidos durante el curso de la enfermedad. Estos factores inhiben la linfoproliferación a través de la secreción de citocinas tales como la IL-10 y el factor transformador del crecimiento- β (TGF- β). El ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de la IL-10 se encuentra selectivamente incrementado en el sitio de la lesión y es expresado predominantemente por macrófagos más que por células T. Además, las células gigantes de Langhans y células epiteloides en el granuloma también expresan RNAm de TGF- β , sugiriendo que la producción local de esta citocina puede resultar en desactivación de macrófagos, favoreciendo el daño tisular o inmunopatológico (Bloom, 1994).

1.7. Inmunidad de la Tuberculosis bovina

La defensa del hospedero hacia infecciones intracelulares causadas por patógenos como la micobacteria involucran una respuesta inmune innata así como una adaptativa mediada por células (Trinchieri, 2003.).

Existen cuatro posibles caminos de una infección micobacteriana. Primero, el bacilo puede ser inmediatamente destruido, por la respuesta innata del hospedero. Sin embargo, los mecanismos innatos que protegen contra la infección están poco comprendidos. Segundo, una proporción de huéspedes infectados desarrollan tuberculosis activa sin un tiempo definido. Este grupo presumiblemente carece de habilidad para controlar la infección inicial y desarrollar una respuesta protectora para prevenir la enfermedad. Tercero, en general se piensa que la mayoría de los hospederos infectados tiene una infección clínicamente latente; en la que son infectados y responden positivamente a la prueba de la tuberculina pero no presentan signos clínicos y no son un riesgo de contagio para otros hospederos. Sin embargo, un número de estudios indican que algunas personas infectadas revierten a un estatus tuberculina-negativo, dando peso al argumento de que la eliminación del organismo por el hospedero ha ocurrido. Finalmente, los microorganismos que han estado latentes eventualmente vuelven a multiplicarse causando una infección (Jiménez *et al.*, 2001; Flynn y Chan, 2001).

Se cree que la inmunidad innata provee la resistencia inicial en las 2 a 3 primeras semanas después de la infección. Los principales componentes celulares involucrados en una inmunidad innata incluyen neutrófilos, macrófagos y células asesinas (NK), mientras que linfocitos y macrófagos son las principales células efectoras en una CMI durante una infección intracelular. Los componentes inmunes innatos sirven como un enlace hacia la CMI en gran medida por la liberación de señales solubles (citocinas) (Wakeham *et al.*, 2000).

Las quimiocinas también pueden dirigir a los linfocitos Th CD₄⁺ hacia los sitios donde se está desarrollando una respuesta de hipersensibilidad retardada que culmina con la formación del granuloma, esto se logra mediante la expresión selectiva de receptores de quimiocinas en linfocitos, durante las diferentes fases de la respuesta inmune. Recientemente, se ha sugerido que las quimiocinas son quienes regulan la hipersensibilidad retardada en la tuberculosis, diferenciando este tipo de respuesta de la CMI (Jiménez *et al.*, 2001).

La cinética de protección inmunitaria específica contra la tuberculosis inicia tras la activación de linfocitos T CD₄⁺ capaces de secretar citocinas como IFN- γ y el TNF- α . Sin embargo existen otras

subpoblaciones celulares involucradas durante la infección por tuberculosis como los linfocitos T CD_8^+ y linfocitos T $\gamma\delta$, estos últimos comparados con los anteriores representan una fracción muy pequeña del incremento total de las células T durante la infección micobacteriana (Wakeham *et al.*, 2000).

La respuesta celular que determina el resultado hacia una infección con micobacteria virulenta está relacionada con la naturaleza de las citocinas producidas localmente por diferentes tipos de células. Las células Th se pueden dividir en dos distintas poblaciones basadas en los perfiles de las citocinas que producen, los cuales indican su papel funcional. Las células Th-1 producen IFN- γ e IL-2 y están asociadas con resistencia hacia tuberculosis. Las células Th-2 producen IL-4, necesaria para regular la producción de anticuerpos e IL-10. Las células Th-1 y Th-2 operan de una manera recíproca, con lo que la respuesta inmune celular y humoral se consideran antagónicas (Thoen y Steele, 1995).

Recientemente, se encontró evidencia de una inmunidad protectora contra tuberculosis por células CD_8^+ restringidas al complejo principal de histocompatibilidad - I (del inglés MHC-I) en un modelo murino. Las células CD_8^+ fueron capaces de producir citocinas activadoras de macrófagos y manifestar actividad citolítica contra macrófagos infectados (Smith, *et al.*, 2000). En otros estudios se observó que las células T CD_8^+ responden fuertemente hacia *M. bovis* y hacia antígenos micobacterianos solubles los cuales son procesados dentro de las células presentadoras de antígeno (APC). Así que, las células CD_8^+ pueden ser citotóxicas a células blanco y producir citocinas como el IFN- γ en la inmunidad antimicobacteriana, sugiriendo la existencia de subpoblaciones de estas células (Flynn y Ernst, 2000). Se ha reconocido que las células CD_8^+ se pueden subdividir basándose en patrones específicos de secreción de citocinas, con células tipo I secretando principalmente IL-2 e IFN- γ y células tipo II que secretan principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 (Liébana *et al.*, 1999).

Por otro lado, es conocido que las células T $\gamma\delta$ participan en la respuesta inmune contra la micobacteria, como lo evidencia su acumulación temprana en lesiones en humanos y su expansión *in vitro* a antígenos micobacterianos no peptídicos. Un papel para este tipo de células se soporta con estudios funcionales que demuestran su capacidad para desplegar citotoxicidad y producir IFN- γ en respuesta a macrófagos infectados con la micobacteria (Stenger y Modlin, 1999).

1.8. El papel de las citocinas en la Tuberculosis bovina.

La respuesta inmunológica protectora generada durante la tuberculosis depende del balance entre la inmunidad inespecífica y específica, y esta última del predominio de la respuesta Th1 con producción de IFN- γ sobre la respuesta Th2. Diversos factores pueden cambiar el curso de la respuesta inmunitaria, desde alteraciones en la producción de citocinas regulatorias hasta la expresión de moléculas de membrana que participan en la coestimulación celular, incluyendo a los receptores de las citocinas regulatorias. En la respuesta inmune inespecífica, la participación de las citocinas IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 resultan fundamentales para promover un microambiente que favorezca la migración leucocitaria al sitio de invasión bacilar. Por otra parte, es indispensable la participación de IL-12 e IL-18 producidas por macrófagos promoviendo la respuesta inmune específica hacia Th1 (Trinchieri, 2003).

Las células T CD₄⁺ juegan un papel importante en la inmunidad antimicobacteriana, los individuos que presentan este patrón de secreción desarrollan resistencia hacia la enfermedad, principalmente a través de la producción de citocinas Th1, IFN- γ e IL-2 (Bhattacharyya *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 2000).

Los interferones son un grupo de citocinas originalmente identificadas y denominadas por su actividad antiviral, así como propiedades anti-proliferativas y regulan la expresión de moléculas clase I del MHC. Los interferones tipo I incluyen al interferón-alfa (IFN- α) de 18-20 kDa producido por los leucocitos y el interferón-beta (IFN- β), producido por los fibroblastos. Los interferones tipo II, también son conocidos como interferones inmunes, dentro de estos se encuentra el IFN- γ , que es un homodímero activador de células T y NK. El IFN- γ incrementa la expresión de moléculas clase I y II del MHC en células nucleadas y estimula muchas de las funciones efectoras de los fagocitos mononucleares. El IFN- γ reconoce un receptor de superficie celular específico, asimismo ha sido implicado en la patogénesis de una variedad de enfermedades autoinmunes y condiciones inflamatorias crónicas. Una de las funciones primarias del IFN- γ *in vivo* parece ser la activación de macrófagos para eliminar patógenos intracelulares como micobacterias (Trinchieri, 2003.).

Por otro lado, se ha reportado que ratones con delección del gen para IFN- γ resultaron con múltiples defectos inmunes, afectando su capacidad de resistencia a parásitos intracelulares, además activa a los macrófagos en la tuberculosis (Chensue *et al.*, 1997) y la producción de intermediarios de nitrógeno reactivo (RNI) por inducción de la sintasa óxido nítrico (NOS2). El mecanismo conocido

más eficaz para la destrucción de la micobacteria por los macrófagos es la acción del NOS2. Sin embargo, es probable que existan mecanismos adicionales por los que IFN- γ controlará la tuberculosis, puesto que ratones IFN- γ $^{-/-}$ son más susceptibles que ratones deficientes en NOS2. En humanos deficientes del gen para IFN- γ o el receptor de IFN- γ también muestran aumentada la susceptibilidad a infecciones con micobacterias (Flynn y Ernst, 2000).

El TNF- α es una citocina importante para el control de la tuberculosis aguda en ratones, puesto que ambos contribuyen a la resistencia hacia la micobacteria, en parte por sus papeles en la activación de macrófagos y la inducción de la expresión de NOS2. En una infección tuberculosa persistente estas citocinas continúan produciéndose en los pulmones de ratones, sugiriendo que la continua activación del macrófago es importante para prevenir la reactivación de la infección (Rhodes *et al.*, 2000; Flynn y Chan, 2001). Aunque, por otra parte, un estudio reciente demostró que altos niveles de TNF- α producido hacia *M. bovis* BCG recombinante causó patología excesiva, dando soporte a la hipótesis de que la cantidad de TNF- α en los pulmones durante la infección determina si la citocina es protectora o destructiva (Flynn y Chan, 2001).

La IL-2 actúa como factor de crecimiento para la expansión clonal de linfocitos antígeno específicos, modulando la proliferación y diferenciación de las células Th, células T citotóxicas, células B activadas y células NK, siendo secretada principalmente por células Th activadas (Jiménez *et al.*, 2001). La expresión de IL-2 por células T CD $_4^+$ durante una respuesta inmune primaria ha sido ligada a un aumento de la función memoria/efector con la sensibilidad antigénica incrementada y la expresión de citocinas efectoras en una respuesta secundaria. La unión de IL-2 a su receptor sobre células T incrementa la secreción de citocinas (IFN- γ , linfotóxina, IL-4, IL-3, IL-5, GM-CSF), e incrementa la expresión de moléculas del MHC clase II (MHC-II) (Rhodes *et al.*, 2000).

La IL-4 es producida por células Th CD $_4^+$, mastocitos y basófilos, es una citocina central en la conducción del desarrollo de una respuesta de tipo Th2. La IL-4 actúa como un factor de crecimiento en células B, células T y mastocitos, incrementa la expresión de moléculas MHC-II en células B. La IL-4 es necesaria para inducir la respuesta de IgE, y su ausencia conduce a niveles significativamente bajos de IgG1 en respuestas inmunes dependientes de células T. Los efectos estimulatorios de IL-4 sobre la producción de IgG1 e IgE y sobre la inducción de moléculas clase II del MHC están reguladas por IFN- γ , con el cual tiene funciones antagónicas. Por otra parte, es conocido que inhibe la secreción de muchas citocinas inducibles. La IL-4 puede aumentar la función de los monocitos incrementando la expresión de algunas moléculas proinflamatorias, incluyendo las

de clase II del MHC y CD23, además producen la secreción de quimocinas derivadas de monocitos (Ameixa y Friedland, 2001).

Existen estudios que reportan un incremento de IFN- γ en suero y localmente de IFN- γ e IL-4 en células de lavado bronquioalveolar, en pacientes con tuberculosis activa, sugiriendo la presencia tanto de citocinas Th1 como Th2 durante la enfermedad; se ha postulado también que la reactivación de tuberculosis latente involucra un cambio de citocinas de tipo 1 a tipo 2 (Rodees *et al.*, 2000; Ameixa y Friedland, 2001). Por otra parte, la expresión de IL-4 no siempre se ha detectado en pacientes tuberculosos (Ameixa y Friedland, 2001).

La IL-10 es también referida como un factor de crecimiento de las células T derivado de las células B y como un factor inhibitorio de la síntesis de citocinas como IFN- γ en células T activadas, se asocia con una respuesta Th2. La IL-10 es producida por una variedad de tipos celulares, incluyendo células T CD $^{+4}$, células T CD $^{+8}$ activadas y células B activadas. Sus efectos incluyen reducción en la proliferación de células T antígeno-específicas, inhibición en la producción de IFN- γ inducida por IL-2 en células NK e inhibición de IL-4 e IFN- γ inducida por la expresión de moléculas del MHC-II sobre monocitos. La IL-10 es considerada un factor de regulación cruzada en células T, además actúa como un factor de co-diferenciación para células Tc y un cofactor de crecimiento de células T. Tiene potentes propiedades anti-inflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*. La IL-10 activa células dendríticas que llegan a ser macrófagos con una actividad incrementada contra la micobacteria. La IL-10 no es secretada solamente por linfocitos Th2 también es producida por monocitos. La regulación de la secreción de la IL-10 por monocitos después de la fagocitosis de *M. tuberculosis* involucra caminos con múltiples señales (Ameixa y Friedland, 2001; Murray y Young, 1999).

Por otra parte, se han reportado estudios *in vitro* en los que ratones con células T deficientes en la producción de IL-10 producen más IFN- γ que las células T de los ratones control, y ratones deficientes a IL-10 mueren rápidamente de infecciones por *Toxoplasma* o *Tripanosoma cruzi* debido a una sobreproducción sistémica de mediadores inflamatorios como IFN- γ , TNF- α e IL-12. En contraste, ratones carentes de IL-10 son más resistentes a infecciones por *Listeria*, posiblemente debido a la producción incrementada de IFN- γ por células T en estos animales. En otros estudios se ha reportado que la administración de IL-10 a macrófagos infectados con la micobacteria inhibe la muerte bacteriana iniciada por el IFN- γ ; mostrando una fuerte evidencia de que IL-10 es una citocina que regula de manera negativa la función de los macrófagos (Murray y Young, 1999).

2. OBJETIVO GENERAL

Establecimiento de los perfiles de secreción de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10), relacionadas con la respuesta inmune hacia tuberculosis bovina, en células de sangre completa cultivadas de animales que presentan diferentes patrones de respuesta inmune.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar los diferentes patrones de respuesta inmune en la TB mediante pruebas de campo (ID) y laboratorio (IFN- γ , ELISA y PCR).

2.- Determinar mediante RT-PCR la expresión de las principales citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10) involucradas en la respuesta inmune asociada a los diferentes patrones de la TB.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales de estudio (bovinos).

Se muestrearon 40 bovinos en condiciones naturales de infección (de TB) de diferentes establos lecheros (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, Tizayuca, Tulancingo y Xochimilco) con prevalencias de 0.1 % (baja), 14 % (media-baja), 25 % (media-alta) y 40 % (alta). Las prevalencias fueron tomadas de acuerdo a los métodos establecidos por la campaña nacional contra la tuberculosis. El número de animales de cada establo se estableció de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: se seleccionaron explotaciones con las prevalencias ya mencionadas. En la explotación con prevalencia baja (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4) se eligieron animales solamente PPD negativos (5 animales). En las explotaciones con prevalencia media se eligieron animales PPD negativos y positivos, de Tizayuca (con prevalencia media- baja) se eligieron 8 animales PPD negativos y 5 PPD positivos; de Tulancingo (con prevalencia media-alta) se eligieron 5 animales PPD negativos y 10 animales PPD positivos. En la explotación con prevalencia alta (Xochimilco) se eligieron únicamente animales PPD positivos (7 animales) (Trusfield, 1997).

4.2. Obtención de muestras.

De los bovinos sanos e infectados, se formó un banco de muestras. El criterio de infección se obtuvo en base a la prueba ID. De los animales seleccionados se colectaron las siguientes muestras: sangre completa en un tubo con heparina para realizar la prueba de IFN- γ ; suero para la prueba de ELISA y muestras de exudado nasal utilizando hisopos estériles con lo que se evaluó la de *M. bovis* por la PCR. Además, se obtuvo sangre completa en un tubo con EDTA de cada animal seleccionado para observar la expresión de las citocinas, mediante la prueba de RT-PCR.

4.3. Prueba de intradermorreacción (ID).

A los 40 animales se les practicó la prueba doble comparativa. Las tuberculinas autorizadas para efectos de la campaña son: PPD bovino elaborado con *M. bovis* cepa AN5¹ y PPD aviar elaborado con *M. avium* cepa D4¹.

¹ PRONABIVE. México, D.F.

Primero, se rasuró el área donde se inoculó la tuberculina en el tercio medio superior del cuello. El sitio de aplicación superior fue cerca de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior fue aproximadamente 15 cm debajo de la anterior, esta prueba se aplicó mediante la inoculación intradérmica de 0.1 ml de PPD aviar y 0.1 ml de PPD bovino, previo a la inoculación, se levantó un pliegue de piel en el centro de las áreas rasuradas y se procedió a medir el grosor de estos utilizando un cutímetro (vernier) registrando estos valores. El PPD aviar se inoculó intradérmicamente en el área rasurada superior y el PPD bovino en la inferior. La lectura de la prueba se realizó 72 +/- 6 horas, midiendo con el cutímetro el grosor de las reacciones, estas fueron anotadas, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda. Los criterios de interpretación son los siguientes: 2 mm de aumento: negativo, > 2 y < 4 mm de aumento: sospechoso, > 4 mm de aumento: positivo (Norma Oficial Mexicana, 1995).

4 .4. Prueba de IFN- γ .

La prueba se les realizó a los 40 animales, empleando un kit comercial (BOVIGAM™ Bovine Gamma Interferon Test¹). Esta técnica es una medida de la inmunidad mediada por células, y se basa en la estimulación *in vitro* de linfocitos de sangre heparinizada, usando como antígeno el PPD de micobacterias. Como resultado de la estimulación antigénica, los linfocitos T circulantes presentes en la muestra de sangre secretan IFN- γ , que es medido mediante una prueba de ELISA de captura (Rothel *et al.*, 1990; Domingo *et al.*, 1995; Nuallain *et al.*, 1997; Walravens *et al.*, 2002a; Walravens *et al.*, 2002b).

En los establos seleccionados se procedió a la extracción de 10 ml de sangre de la vena caudal de 40 bovinos en tubos con vacío y con heparina, momentos después de realizada la medición de la prueba de ID. Las muestras de sangre fueron cultivadas siguiendo el protocolo de Rothel *et al* (1990), se establecieron cuatro cultivos de 1.5 ml de sangre heparinizada de cada animal, en placas de cultivo de 24 pozos. Cada cultivo fue estimulado con 100 μ l de PPD bovino (20 μ g/ml), 100 μ l de PPD aviar (20 μ g/ml), 10 μ l de concanavalina A (Con A) (1 μ g/ μ l) y un pozo sin estimular. El cultivo se realizó durante 24 hrs, en estufa de CO₂ a 37°C. Una vez finalizado el cultivo, el plasma fue depositado en microtubos y congelado a - 70°C hasta la realización de la prueba de ELISA para detectar IFN- γ .

¹ CSL.Veterinary. Victoria, Australia

Para el ELISA se adicionaron 50 μ l de diluyente a la placa. Después se adicionaron 50 μ l de muestras problema y control a los diferentes pozos que contenían diluyente, las muestras control se adicionaron al final de cada placa y se mezcló el contenido. Se incubaron a temperatura ambiente (25°C) por 60 +/- 5 min. Se retiró el contenido y se lavaron 6 veces, los pozos se llenaron con amortiguador de lavado, se retiró el contenido del líquido de lavado en 5 veces, después se colocó la placa sobre papel filtro y se permitió que se secase. Se adicionaron 100 μ l de conjugado preparado minutos antes a cada pozo. Se cubrieron las placas y se incubaron a temperatura ambiente por 60 +/- 5 min. Se lavaron y adicionaron 100 μ l de sustrato preparado en el momento a cada pozo. Se cubrieron las placas y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Se adicionaron 50 μ l de solución de paro a cada pozo. La lectura de la absorbancia a 450 nm se realizó dentro de los 5 min de terminada la reacción. Los valores de absorbancia fueron usados para calcular los resultados y la interpretación de los resultados se realizó de la siguiente manera:

- Se calcularon las medias de los valores de absorbancia de cada muestra de los pozos sin antígeno, con PPD bovino, aviar y con A. La prueba se realizó por duplicado a cada muestra.
- Se compararon las medias de los valores de absorbancia de las muestras de PPD bovino con el control negativo a IFN- γ del kit. Todas las muestras con PPD bovino que tuvieron un valor promedio superior a 0.050 con respecto al control negativo del kit se les realizaron más cálculos. El resto de las muestras fueron consideradas negativas.
- Después se compararon las medias de los valores de absorbancia de las muestras sin antígeno, con PPD bovino y aviar para cada animal identificado como positivo en el paso anterior. Todos los animales en los que la media de la muestra con PPD bovino fue mayor que la media de las muestras sin antígeno y con PPD aviar fueron consideradas positivas en esta prueba y probablemente se encuentran infectadas con *M. bovis*. Si el valor de absorbancia de la muestra con PPD aviar fue mayor que la muestra con PPD bovino, el animal fue considerado negativo a TB.

4.5. Prueba de ELISA.

Se utilizó suero, colectando sangre de la vena caudal de 40 bovinos en tubos de 10 ml con vacío. La prueba se realizó de la siguiente manera (Ritacco, V; Voller, A) : las placas fueron sensibilizadas

con 5 µg de extracto protéico de filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis* y *M. avium* en 100 µl de solución de pegado (amortiguador de carbonatos pH 9.6) (Apéndice B) por pozo. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente y se descartó la solución. Se añadieron 100 µl de solución bloqueadora (1 % de leche descremada en PBS y 0.1 % Tween 20¹), incubando por 1 h a 37°C. Se lavaron 5 veces con solución de lavado (PBS con 0.1 % de Tween 20) (Apéndice B), se secaron en estufa a 37°C. Posteriormente se añadieron 100 µl de cada suero problema diluido 1: 50 en solución bloqueadora y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Se descartó la solución y se lavaron 5 veces con solución de lavado. Enseguida se agregó a cada pozo 100 µl de proteína G² conjugada con peroxidasa diluido 1 : 10 000 en solución bloqueadora, se dejaron incubar 1 h a 37°C, se descartó la solución y se lavaron 5 veces con solución de lavado. Inmediatamente se añadió a cada pozo 100 µl de solución de revelado (10 ml/placa de amortiguador de citratos¹ o citrato-fosfato pH 4.5 {Apéndice B}, 4 mg de orto-fenilendiamina³) agregándose al momento 4 µl de H₂O₂. Se paró la reacción a los 10 min mediante la adición de 50 µl por pozo de solución de paro (H₂SO₄ 2M⁴). Las lecturas se realizaron a 492 nm.

4.6. Extracción de DNA de hisopo nasal.

La extracción de DNA de moco nasal se realizó de la siguiente manera (Van Soolingen) : Se tomó la solución (PBS estéril) de los tubos en donde se encontraban los hisopos nasales, se colocó en microtubos y se centrifugó a 12 000 g x 5 min, se decantó el sobrenadante y se lavó con PBS (Apéndice A), nuevamente se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Después se agregaron 400 µl de TE 1X más 50 µl de lisozima⁵ (TSI) se agitó e incubó a 37°C durante 1 h. Enseguida se adicionaron 75 µl de SDS 10 % / proteinasa K⁶ (70 µl de SDS 10 % y 5 µl de proteinasa K 10 mg), se agitó e incubó a 65°C durante 1 h. Posteriormente, se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M y 100 µl de CTAB (Apéndice B) / NaCl (esta solución debe precalentarse a 65°C), se agitó hasta que la solución tomó una consistencia lechosa y se incubó a 65°C durante 10 min. Después se adicionaron

¹ J.T. Baker S.A. de C.V. Xalostoc, Edo. de México

² ICN BIOMEDICAL. Inc. Aurora, Ohio, USA

³ SIGMA, USA

⁴ Técnica Química, S.A., México, D.F.

⁵ SIGMA, San Luis, USA

⁶ SIGMA, USA

750 μ l de una solución de cloroformo / alcohol isoamilico¹ y se agitó para hacer una solución homogénea, se centrifugó a 12 000 g durante 5 min. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo (aproximadamente 600 μ l) teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia, ya que se podía contaminar el DNA. Inmediatamente, se adicionaron 360 μ l de alcohol isopropílico, dejando la mezcla a -20°C durante 30 min, o todo la noche. Se centrifugó a 12 000 g durante 15 min y se descartó la mayoría del sobrenadante, dejando aproximadamente 20 μ l por encima del botón de DNA al cual se le adicionó 1 ml de etanol al 70 % frío, se centrifugó a 12 000 g durante 5 min nuevamente se descartó el sobrenadante y se dejó 20 μ l por encima del DNA. Se centrifugó a 12 000 g durante 1 min y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Finalmente, se permitió que el DNA se secara a temperatura ambiente, aproximadamente por 20 min y se colocaron los tubos en una centrifuga de vacío a 45°C durante 20 min. El DNA se disolvió en 20 μ l de agua destilada y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.7. Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se extrajo DNA de cada muestra de exudado nasal por el método de Van Soolingen *et al.* (1998). Como control positivo se empleo DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5 y, como control negativo, DNA de *M. avium* DN4 y agua Milli-Q. Se siguió esencialmente el método descrito por Kamerbeek *et al.* (1997). Los iniciadores para la PCR fueron TB1a 5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3' y el TB1b 5' CCT GCG AGC GTA GGG GTC GC 3', que amplifican el gen MPB70 con un tamaño de producto de 372 pb, que identifica al complejo tuberculosis. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l a las siguientes concentraciones de: dNTP's 10 mM, 1.5 mM de Mg₂Cl, 20 pM de cada primer, 0.625 U de *Taq* polimerasa² y 100 ng de DNA de cada muestra problema. Se amplificó por 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: 1' a 96°C, 1' a 55°C y 1' a 72°C. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio³ al 1 % (Apéndice A).

4.8. Conformación de grupos de animales de acuerdo a las pruebas establecidas.

Los grupos se formaron de acuerdo a un patrón de respuesta inmune basado en las pruebas establecidas. El grupo I es el testigo negativo, los animales agrupados aquí resultaron negativos a

¹ AMRESCO, Solo, Ohio, USA

² Applied Biosystems. New Jersey, USA

las cuatro pruebas. En el grupo II se encuentran los animales que resultaron positivos a ID e IFN- γ . En el grupo III los animales positivos a ID, IFN- γ y PCR. Mientras que, en el grupo IV se tienen a los positivos a ELISA. Los animales positivos a ID, IFN- γ y ELISA se encuentran en el grupo V. Los positivos a las cuatro pruebas se localizan en el grupo VI. En tanto que, los que resultaron positivos a la PCR se encuentran en el grupo VII (cuadro 4.8.1). Tres grupos (VIII, IX y X) fueron eliminados de este trabajo ya que estaban conformados por un número muy reducido de animales (menos de 3), considerándolos no representativos.

4.9 Optimización de tiempos y temperaturas para la PCR de las citocinas.

Para poder realizar la PCR fue necesario primero lograr la optimización de tiempos y temperaturas para cada citocina estudiada, mediante el empleo de un termociclador de gradiente de temperatura icicler Termal Cycler¹, para esto fue necesaria la extracción de DNA de sangre heparinizada de animales PPD negativos sanos.

Se probaron los siguientes iniciadores: para el IFN- γ fueron probadas dos secuencias (con productos de amplificación de 184 y 426 pb) descritas por Cerreti *et al.* (1986b). Para la IL-2 se probaron dos secuencias (con productos de amplificación de 457 y 548 pb) descritas por Cerreti *et al.* (1986a). Para la IL-4 se probaron dos secuencias (con productos de amplificación de 303 y 311 pb) descritas por Heussler *et al.* (1992). Para la IL-10 se probó una secuencia (con productos de amplificación de 471 pb) descrita por Hash *et al.* (1994)., como control de amplificaciones de la PCR se usaron dos pares de iniciadores de β -actina (con productos de amplificación de 390 y 890 pb), secuencias descritas por Degen *et al.* (1983) (cuadro 4.9.1.). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio al 1 %.

4.10. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y condiciones de cultivo.

La sangre completa con EDTA fue obtenida de los 40 animales seleccionados. El paquete de PBMC se aisló por gradiente (Ficoll-paque²), de la siguiente manera: en tubos de polipropileno de 15 ml se

³ GIBCO BRL. LIFE TECHNOLOGIES. Galthersburg, MD, USA

¹ BIO-RAD. Hercules, CA., USA

² Amersheim Biosciences. Uppsala, Swedwn

agregaron 5 ml de Ficoll-paque y 6 ml de sangre con anticoagulante (EDTA³), estos se centrifugaron a 780 g durante 30 min. Después se extrajo la capa de leucocitos que fueron colocados en un tubo nuevo, aforando el volumen a 10 ml con RPMI 1640¹, estos fueron centrifugados a 440 g por 10 min. y se decantó el sobrenadante, este paso se repitió una vez más. Se adicionaron 5 ml de RPMI 1640 con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y se realizó el conteo de leucocitos en una cámara de New Bawer, ajustando 5x10⁶ células por pozo (placa de 24 pozos). De inmediato, se agregaron 100 µl de PPD bovino o PPD aviar (20 µg/ml) y 10 µl de conc A (10 µg) (testigo positivo) al pozo correspondiente, dejando un pozo sin antígeno (testigo negativo). Las placas se incubaron por 60 hrs a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂. Las células fueron cosechadas y centrifugadas a 440 g por 3 min. Posteriormente se les agregó 1 ml de TRIzol² y fueron congeladas a -70°C hasta la extracción de RNA total (Covert y Splitter, 1995; Nuallain *et al.*, 1997).

Cuadro 4.8.1. Selección de los grupos de acuerdo a las pruebas establecidas.

Prueba	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Grupo VIII	Grupo IX	Grupo X
ID	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
IFN-γ	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
ELISA	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
PCR	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+

³ Becton Dickinson. USA

¹ In vitro, S.A. México, D.F.

² In vitrogen, LIFE TECHNOLOGIES. California, USA

Tabla 2. Secuencia de iniciadores empleados y tamaño del fragmento amplificado para diferentes citocinas de origen bovino.

Nombre	Secuencia de los iniciadores	Tamaño del fragmento amplificado cDNA (pb)
IL-2 Cerretti et al., 1986a	5' AGA TAC AAC TCT TGT CTT GC 3' 5' AGT CAT TGT TGA GTA GAT GC 3'	457
IL-2 Cerretti et al., 1986a	5' ACG GGG AAC ACA ATG AAA GAA GT 3' 3' CGT AGG GCT TAC AAA AAG AAT CT 5'	548
IFN- γ Cerretti et al., 1986b	5' TTC AGA GCC AAA TTG TCT CC 3' 5' CTG GAT CTG CAG ATC ATC CA 3'	184
IFN- γ Cerretti et al., 1986b	5' CTG TGG GCT TTT GGG TTT TTC TG 3' 3' CTC TTC CGC TTT CTG AGG TTA GA 5'	426
IL-4 Heussler et al., 1992	5' CTA TTA ATG GGT CTC ACC TAC CA 3' 3' CTT GCC AAG CTG TTG AGA TTC 5'	311
IL-4 Heussler et al., 1992	5' CGT CCA TGG ACA CAA GTG TGA TA 3' 5' TTC CAA GAG GTC TTT CAG CGT AC 3'	303
IL-10 Hash et al., 1994	5' GTT GCC TGG TCT TCC TGG CTG 3' 5' TAT GTA GTT GAT GAA GAT GTC 3'	471
β -actina Degen et al., 1983	5' ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG 3' 3' GCA TTT GCG GTG GAC AAT GGA 5'	890
β -actina Degen et al., 1983	5' CCT TTT ACA ACG AGC TGC GTG TG 3' 5' ACG TAG CAG AGC TTC TCC TTG ATG 3'	390

4.11. Aislamiento de RNA. Técnica de TRIzol.

El RNA total para las reacciones de RT-PCR, se extrajo de las células de sangre periférica. Se agregó 1 ml del reactivo de TRIzol¹ por cada 5×10^6 células. El RNA se extrajo con 200 μ l de cloroformo, se centrifugó y se recuperó la fase acuosa en un microtubo. El RNA se precipitó con 500 μ l de isopropanol². La pastilla se lavó con 1 ml de etanol³ al 75 % (Apéndice A) y el RNA fue resuspendido en 50 μ l de agua DEPC⁴ (Apéndice A), se calentó en baño maría por 10 min. entre 55 – 60°C y se cuantificó en un fluorómetro (VersaFluor™ Fluorometer System)⁵ (Chomczynski y Sacchi, 1987).

4.12. Condiciones óptimas de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Mediante la reacción de la transcriptasa reversa se sintetizó la cadena de cDNA del RNA total aislado de cada animal estimulando con PPD bovino, PPD aviar, conc A y sin estimular. Las reacciones de RT, se realizaron en un volumen de 50 μ l, la mezcla contenía 5 μ l de Oligo d(T)₁₆ 50 μ M⁶, 10 μ l de 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCL, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂)¹, 2.5 μ l de cada desoxiribonucleótido (dNTP: dGTP, dATP, dTTP, dCTP) 10 Mm⁶, 5 μ l de DTT 0.1 M¹, 2.5 μ l de RNase Inhibitor 40 U⁶, 5 μ l de la enzima MuLV Reverse transcriptasa (250 U)⁶ y 250 ng de RNA total. La mezcla se sometió a un ciclo de RT a 42°C por 50 min. (Covert y Splitter, 1995).

El cDNA sintetizado se agregó a las reacciones de la PCR que se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l. La mezcla contenía 2 μ l de 10X PCR buffer II⁶ (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 μ l de MgCl₂ (2.5 mM), 2 μ l de cada desoxiribonucleótido (dNTP: dGTP, dATP, dTTP, dCTP)

¹ In vitrogen, LIFE TECHNOLOGIES. California, USA

² J.T. Baker. Xalostoc, Edo. de México

³ Técnica Química, S.A. México, D.F.

⁴ AMRESCO. Solon, Ohio, USA

⁵ BIO-RAD. Richmond, California, USA

⁶ Applied biosystems. New Jersey, USA

(10 mM), 1 μ l de cada primer (20 pmol), 0.15 μ l de AmpliTaq DNA Polymerase (0.75 U), 4 μ l de cada cDNA y agua DEPC cbp 20 μ l (Covert y Splitter, 1995).

Las reacciones de la PCR se desarrollaron en un termociclador iCycler de acuerdo a las condiciones establecidas previamente (cuadro 5.2.1.). Los resultados de la RT-PCR con la β -actina normalizada para la expresión de las citocinas fue representada como la intensidad relativa de las bandas encontradas en los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio utilizando el software LabWorks 4.0 (Beltan *et al*, 2000).

5. RESULTADOS

5.1. Animales de estudio (bovinos).

Se evaluó la respuesta intradérmica, considerando los criterios establecidos por la CONATB y la prueba de IFN- γ , ambas para el diagnóstico de la TB, además se determinó la presencia de anticuerpos antimicobacterianos por la técnica de ELISA empleando CFPE de *M. bovis* / *M. avium* estableciendo un punto de corte de 0.3 de densidad óptica (DO) (Díaz *et al.*, 2003). Asimismo, estos animales fueron evaluados por la técnica de la PCR a partir de muestras de moco nasal, para determinar la presencia de *M. bovis*.

En la figura 5.1.1. se observan los valores de DO para la prueba de IFN- γ , en los animales procedentes de Tulancingo (15 animales) y Xochimilco (7 animales) (con prevalencias de 25 y 40 % respectivamente) se observaron valores de DO > 2 en las PBMC estimuladas con PPD bovino, mientras que los animales procedentes de Cuautitlán (5 animales) (con prevalencia de 0.1 %) presentaron una DO < 0.3 en células estimuladas con PPD bovino. En cuanto a las PBMC estimuladas con PPD aviar se observaron DO > 1.0 y 0.5 en los animales procedentes de Tulancingo y Xochimilco respectivamente y en los animales de Cuautitlán y Tizayuca se vieron DO < 0.5. Las PBMC estimuladas con Con A tuvieron valores de DO > 1.5 en los animales procedentes de Cuautitlán y valores < 0.5 en los animales de Tizayuca y Tulancingo. Por lo que respecta a las PBMC sin estimular los valores fueron homogéneos en todos los animales (< 0.1).

En el cuadro 5.1.1., se observan los animales de FES-C, todos los animales fueron negativos a las pruebas de ID, IFN- γ y PCR; y solo dos de estos resultaron positivos a la prueba de ELISA.

El cuadro 5.1.2. muestra animales de Tizayuca, dos animales fueron negativos a todas las pruebas y uno fue positivo a estas, mientras que cuatro resultaron negativos a ID, IFN- γ y ELISA y dos resultaron positivos a las tres. Además, un animal resultó positivo a ID e IFN- γ y otro solamente a IFN- γ ; mientras que un animal fue positivo a ID, ELISA y PCR, y otro únicamente al ELISA y PCR. En cuanto a la PCR, en este grupo, seis animales fueron negativos y siete resultaron positivos.

En el cuadro 5.1.3. se muestra a los animales de Tulancingo, siete animales fueron positivos a todas las pruebas y uno resultó negativo a estas; mientras que, dos animales fueron positivos a ID, IFN- γ y PCR y uno resultó negativo a las tres; otro animal resultó positivo a ID e IFN- γ y uno fue negativo a estas; así, otro animal resultó positivo IFN- γ , ELISA y PCR; en tanto que, un animal fue positivo solamente a la prueba de IFN- γ .

Grafica de resultados de IFN- γ

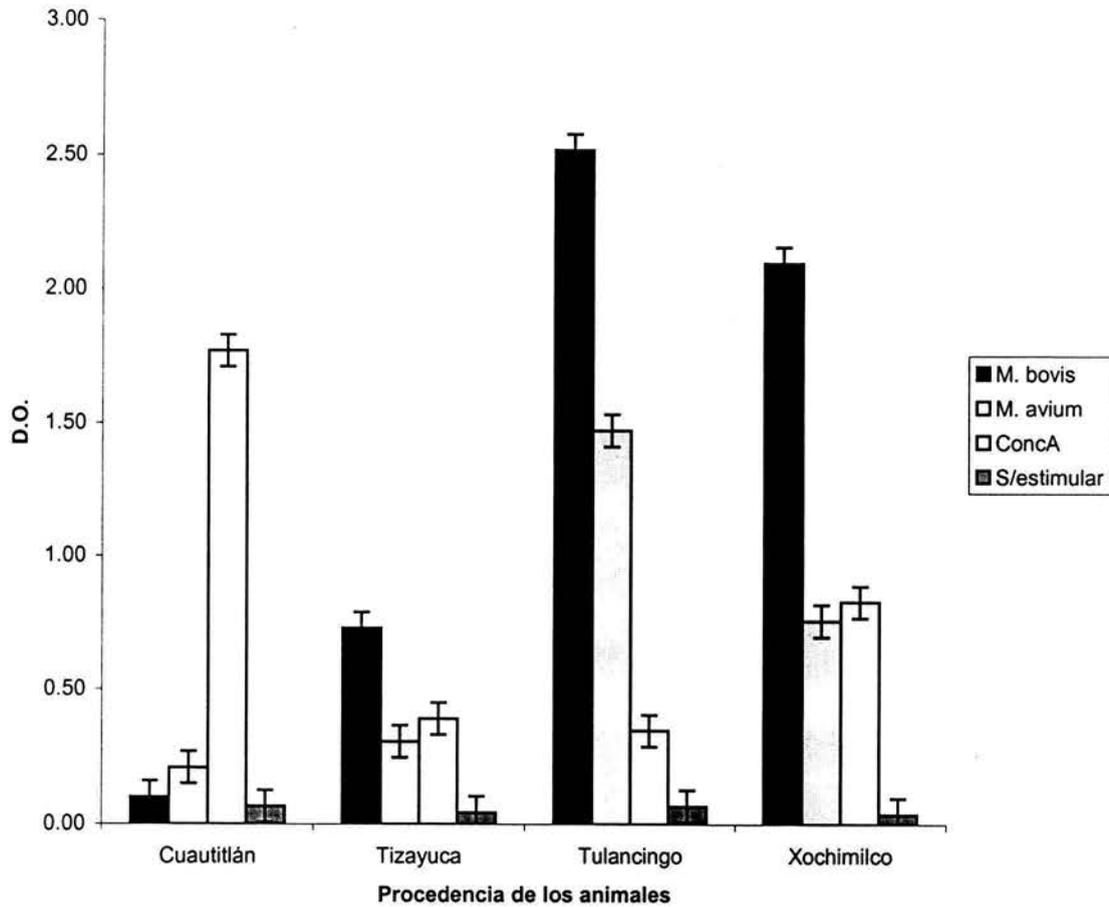


Figura 5.1.1. Promedio de los valores de DO para la prueba de IFN- γ . La producción de IFN- γ se cuantificó de cultivos de PBMC estimuladas con PPD bovino, PPD aviar, Con A y sin estimular. En la gráfica se agrupan de acuerdo a su procedencia y prevalencia. \perp desviación estándar.

Cuadro 5.1.1. Resultados prueba intradérmica (ID), IFN- γ , ELISA y PCR. Animales de FES-C. Prevalencia 0.1%.

Identificación	ID	IFN- γ	ELISA	PCR
218	-	-	-	-
501	-	-	-	-
505	-	-	+	-
509	-	-	+	-
516	-	-	-	-

Cuadro 5.1.2. Resultados ID, IFN- γ , ELISA y PCR. Animales de Tizayuca. Prevalencia del 14%.

Identificación	ID	IFN- γ	ELISA	PCR
603	+	+	+	-
149	+	+	+	-
20	-	-	-	+
1961	+	+	-	-
917	-	-	-	+
950	-	+	-	-
24	-	-	-	+
180	-	-	-	-
957	-	-	-	+
777	+	+	+	+
703	-	-	+	+
63	-	-	-	-
688	+	-	+	+

Cuadro 5.1.3. Resultados ID, IFN- γ , ELISA y PCR. Animales de Tulancingo. Prevalencia del 25%.

Identificación	ID	IFN- γ	ELISA	PCR
18	+	+	+	+
33	+	+	+	+
41	+	+	+	+
48	+	+	+	+
54	+	+	+	+
58	+	+	-	-
69	+	+	-	+
148	+	+	+	+
219	+	+	-	+
240	+	+	+	+
21	-	+	+	+
99	-	-	+	+
212	-	+	-	-
215	-	-	+	-
227	-	-	-	-

En el cuadro 5.1.4. observamos animales de Xochimilco, dos animales resultaron positivos a todas las pruebas; mientras que, dos fueron positivos a ID e IFN- γ y otro animal resultó positivo a ID, IFN- γ y ELISA y dos animales fueron positivos a ID, IFN- γ y PCR.

El objetivo principal de realizar estas pruebas fue conformar grupos con patrones diferentes de estatus inmune hacia la TB (cuadro 5.1.5.). Se formaron tres grupos que no se consideraron representativos por contar con un número muy reducido de animales (tabla 1, ver material y métodos). Los patrones de respuesta de estos grupos se observaron así, un grupo ELISA y PCR positivo, otro grupo IFN- γ positivo y uno más IFN- γ , ELISA y PCR positivo.

5.2. Optimización de la PCR

La concentración de los iniciadores/template y las concentraciones de los reactivos para la PCR fueron optimizadas utilizando DNA de PBMC de bovinos PPD negativos, libres de TB. Los iniciadores específicos de bovino para la PCR fueron obtenidos de secuencias publicadas y las condiciones para la temperatura de alineación y número de ciclos se determinó como se enlista en el cuadro 5.2.1. Los iniciadores escogidos para trabajar fueron los siguientes: para el IFN- γ la secuencia con productos de amplificación de 184 pb descrita por Cerreti *et al.* (1986b). Para la IL-2 la secuencia con productos de amplificación de 457 pb descrita por Cerreti *et al.* (1986b). Para la IL-4 la secuencia con productos de amplificación de 311pb descrita por Heussler *et al.* (1992). Para la IL-10 la secuencia con productos de amplificación de 471 pb descrita por Hash *et al.* (1994) y como control de amplificación de la PCR se usó el par de iniciadores de β -actina con productos de amplificación de 890 pb, secuencia descrita por Degen *et al.* (1983). Los pares de iniciadores se eligieron de acuerdo a su mejor definición y claridad observadas en los geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio al 1 % en las figuras 5.2.1 a 5.2.5.

En la figura 5.2.1. se observan los productos amplificación de β -actina (890 pb) de animales procedentes de Tizayuca, las muestras de los 40 animales probados mostraron amplificación para la β -actina. En la figura 5.2.2. se observan los productos de amplificación de la IL-2 (457 pb) de animales procedentes de Tizayuca En los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 23, 24 y 25 se observa la expresión de esta citocina. En la figura 5.2.3. se visualizan los productos de amplificación del IFN- γ (184 pb) de animales procedentes de Tulancingo. En los carriles 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 20 y 24 se visualiza la expresión de esta citocina.

Cuadro 5.1.4. Resultados ID, IFN- γ , ELISA y PCR. Animales de Xochimilco. Prevalencia del 40%.

Identificación	ID	IFN- γ	ELISA	PCR
03569	+	+	-	-
06801	+	+	+	-
07228	+	+	-	-
05572	+	+	+	+
05573	+	+	-	+
06970	+	+	+	+
4M	+	+	-	+

Cuadro 5.1.5. Conformación de grupos de acuerdo a los criterios establecidos el cuadro 4.8.1

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII
218	03569	05573	505	06801	05572	20
501	07228	4M	509	603	06970	917
516	58	69	215	149	18	24
227	1961	219			33	957
180					48	
63					41	
					54	
					148	
					240	
					777	
Testigo negativo	ID (+) IFN- γ (+)	ID (+) IFN- γ (+) PCR (+)	ELISA (+)	ID (+) IFN- γ (+) ELISA (+)	ID (+) IFN- γ (+) ELISA (+) PCR (+)	PCR (+)

Tabla 5.2.1. Optimización de tiempos y temperaturas para la amplificación de las citocinas.

Citocina	Programa en el termociclador				
IL-2 457 pb	95°C 4'	94°C 1'	52°C 1'	72°C 1':30"	72°C 7'
	33 CICLOS				
IFN-γ 184 pb	95°C 4'	94°C 1'	51°C 1'	72°C 1':30"	72°C 7'
	31 CICLOS				
IL-4 311 pb	94°C 5'	94°C 30"	51°C 45"	72°C 1'	72°C 5'
	33 CICLOS				
IL-10 471 pb	95°C 4'	94°C 1'	53°C 1'	72°C 1':30"	72°C 7'
	30 CICLOS				
β-actina 890 pb	94°C 5'	94°C 30"	53°C 45"	72°C 1'	72°C 5'
	28 CICLOS				

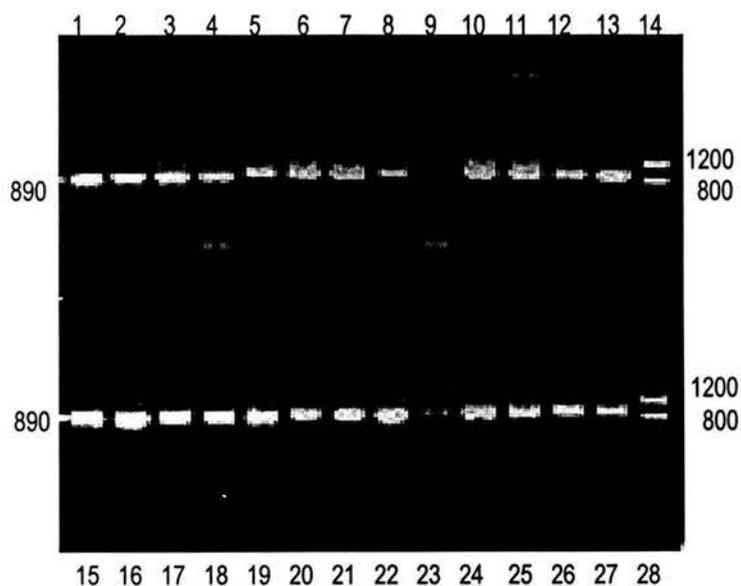


Fig. 5.2.1. Gel de productos de amplificación de la PCR. β-actina (producto de 890 pb). Carriles 1, 5, 9, 13, 18, 22 y 26 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2, 6, 10, 15, 19, 23 y 27 muestras estimuladas con PPD aviar. Carriles 3, 7, 11, 16, 20 y 24 muestras estimuladas con Con A. Carriles 4, 8, 12, 17, 21 y 25 muestras sin estimular. Carriles 14 y 28 marcadores de peso molecular.

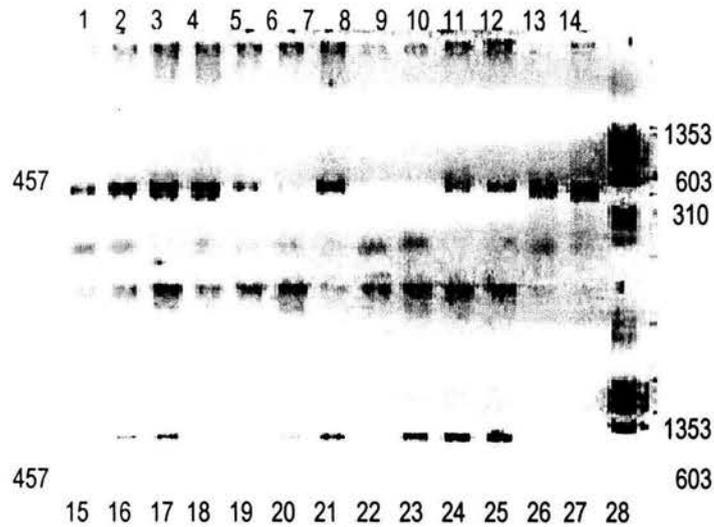


Fig. 5.2.2. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-2 (producto de 457 pb). Carriles 1, 5, 9, 13, 18, 22 y 26 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2, 6, 10, 15, 19, 23 y 27 muestras estimuladas con PPD aviar. Carriles 3, 7, 11, 16, 20 y 24 muestras estimuladas con Con A. Carriles 4, 8, 12, 17, 21 y 25 muestras sin estimular. Carriles 14 y 28 marcadores de peso molecular.

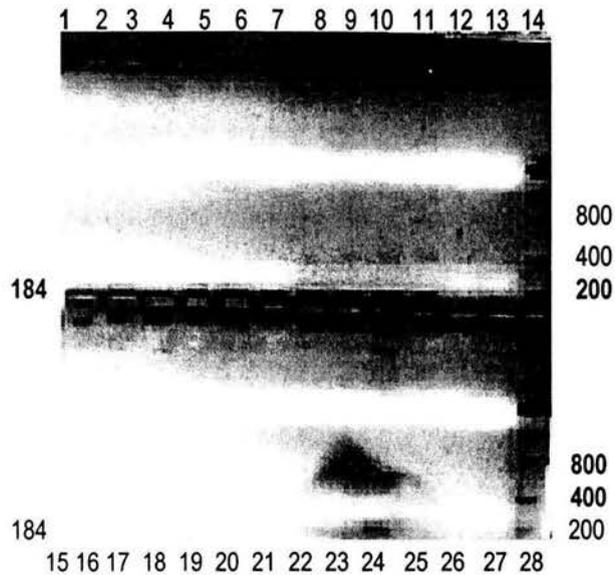


Fig. 5.2.3. Gel de productos de amplificación de la PCR. IFN- γ (producto de 184 pb). Carriles 1, 5, 9, 13, 18, 22 y 26 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2, 6, 10, 15, 19, 23 y 27 muestras estimuladas con PPD aviar. Carriles 3, 7, 11, 16, 20 y 24 muestras estimuladas con Con A. Carriles 4, 8, 12, 17, 21 y 25 muestras sin estimular. Carriles 14 y 28 marcadores de peso molecular.

En la figura 5.2.4. se observan los productos de amplificación de la IL-4 (311 pb) de animales procedentes de Tizayuca. En los carriles 4, 8, 12, 21 se observa la expresión de esta citosina. En la

figura 5.2.5. se observan los productos de amplificación de la IL-10 (471 pb), de animales procedentes de Tizayuca. En los carriles 3, 7, 13, 15, 16, 20, 23 y 24 se observa esta citocina.

5.3. Expresión de citocinas por grupo

Grupo I. Dentro del grupo control (libres de TB) hubo un incremento visible en la expresión de IFN- γ en el animal 218, principalmente cuando las células fueron estimuladas con PPD bovino y Con A; IL-2 tuvo una expresión muy baja, mientras que IL-4 e IL-10 no se evidenciaron, comparando con las células que no se estimularon. Mientras que, el animal 516 mostró una elevada expresión de IL-2 en células estimuladas con PPD aviar y Con A primordialmente; IFN- γ presento una baja expresión, en tanto que, IL-4 e IL-10 no se expresaron al ser comparadas con las células sin estimular. En los animales 501, 227, 180 y 63 prácticamente no se evidenció la expresión de ninguna citocina (ver figura 5.3.1.).

Grupo II. El animal 03569 mostró un incremento en la expresión de IL-4 cuando las células fueron estimuladas con PPD aviar y Con A en relación a las células sin estimular. Mientras que, en el animal 07228 se observó un aumento en la expresión de IL-2 cuando las células fueron estimuladas con PPD bovino al compararlas con las células sin estimular. El animal 58 mostró expresión de IL-2 e IL-4 cuando las células se estimularon con PPD aviar en comparación con las células sin estimular. En cuanto al animal 1961 se evidenció la expresión de IFN- γ en las células estimuladas con Con A; así como, un fuerte incremento en la expresión de IL-2 en las células estimuladas con PPD bovino, PPD aviar y Con A, en relación con las células sin estimular (ver figura 5.3.2.).

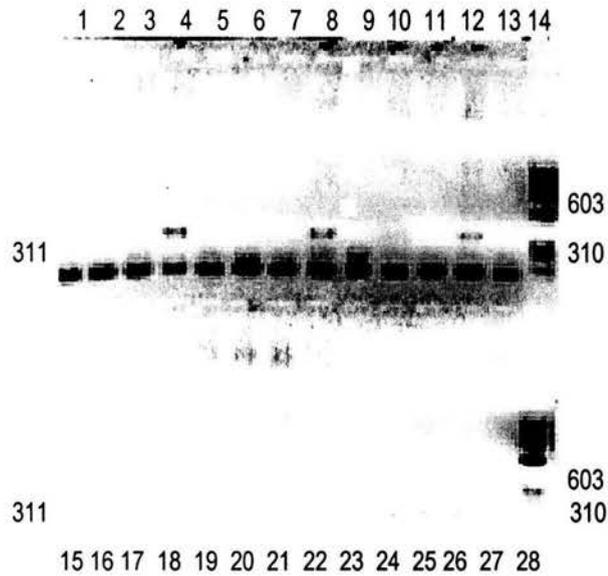


Fig. 5.2.4. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-4 (producto de 311 pb). Carriles 1, 5, 9, 13, 18, 22 y 26 muestras sin estimular. Carriles 2, 6, 10, 15, 19, 23 y 27 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 3, 7, 11, 16, 20 y 24 muestras estimuladas con PPD aviar. Carriles 4, 8, 12, 17, 21 y 25 muestras estimuladas con Con A. Carriles 14 y 28 marcadores de peso molecular.

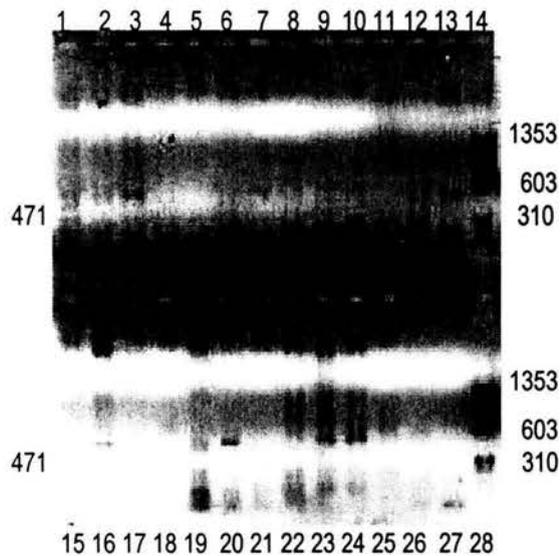


Fig. 5.2.5. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-10 (producto de 471 pb). Carriles 1, 5, 9, 13, 18, 22 y 26 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2, 6, 10, 15, 19, 23 y 27 muestras estimuladas con PPD aviar. Carriles 3, 7, 11, 16, 20 y 24 muestras estimuladas con Conc A. Carriles 4, 8, 12, 17, 21 y 25 muestras sin estimular. Carriles 14 y 28 marcadores de peso molecular.

Grupo I

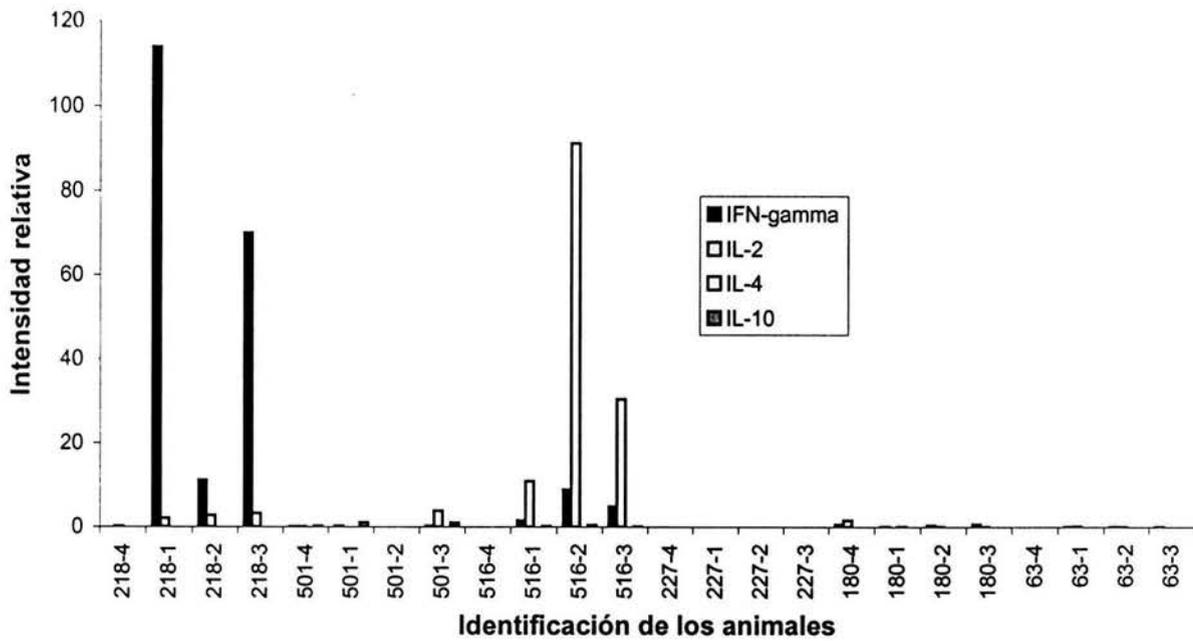


Fig.5.3.1.Resultados de RT-PCR para el grupo I. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

Grupo II

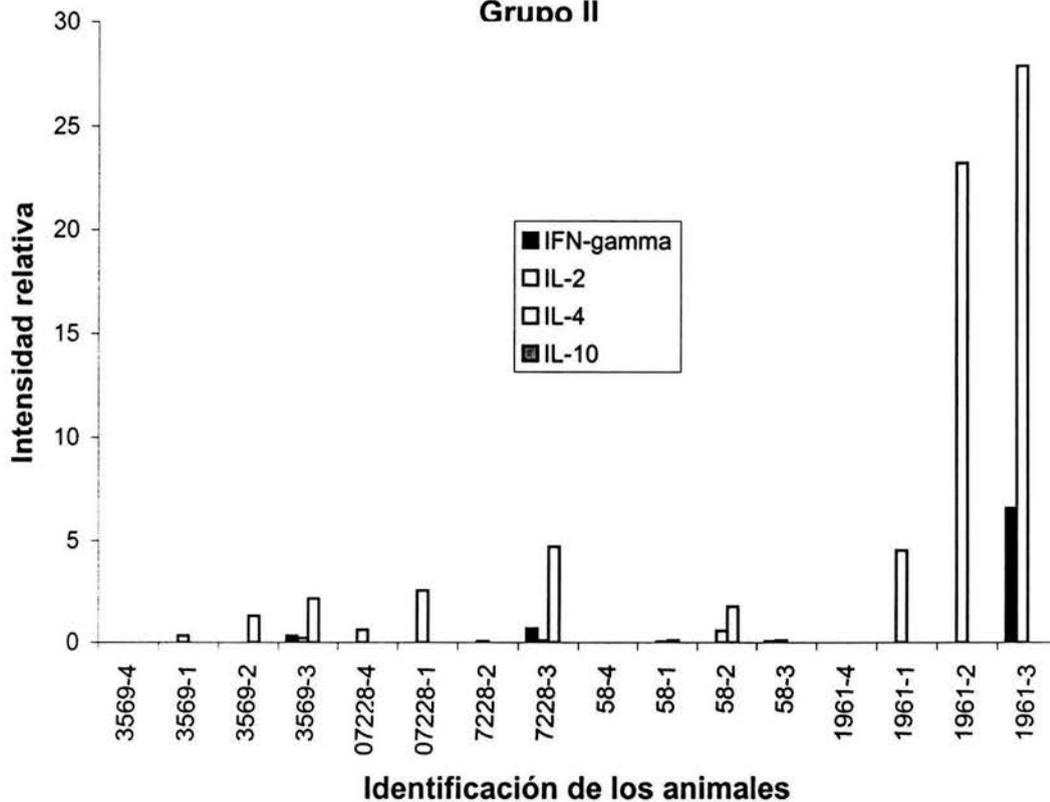


Fig.5.3.2.Resultados de RT-PCR para el grupo II. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

Grupo III. El animal 05573 mostró una ligera expresión para IFN- γ cuando las células fueron estimuladas con PPD bovino; además IL-2 se observó en células estimuladas con Con A en comparación con las células sin estimular. En el animal 4M se observó un incremento en la expresión de IFN- γ cuando las células se probaron con PPD aviar; mientras que, IL-2 aumento su expresión en células estimuladas con PPD bovino, PPD aviar y Con A en relación con las células que no se estimularon. IFN- γ e IL-2 evidenciaron un incremento en su expresión en el animal 69 cuando sus fueron células fueron estimuladas con PPD aviar, Con A y principalmente con PPD bovino cuando se compararon con células sin estimular. En el animal 219 se expresó IFN- γ en las células estimuladas con PPD bovino, PPD aviar y Con A en relación con las células no estimuladas. IL-4 se observó únicamente en el animal 219 cuando las células se estimularon con Con A e IL-10 mostró una muy pobre expresión en el animal 4M cuando sus células se estimularon con PPD bovino (ver figura 5.3.3.).

Grupo IV. El animal 505 mostró un incremento en la expresión de IFN- γ cuando las células fueron estimuladas con PPD bovino, PPD aviar y Con A; en IL-2 no se observó un incremento en relación con las células sin estimular; IL-4 se observó únicamente cuando las células fueron probadas con Con A; para IL-10 se observó expresión en células ensayadas con PPD bovino, PPD aviar y principalmente Con A en comparación con las células sin estimular. El animal 509 expresó IFN- γ en las células que se estimularon con PPD bovino y aviar; mientras que, IL-2 se evidenció en células estimuladas PPD aviar, Con A y primordialmente con PPD bovino. IL-10 se observó en células que se probaron con PPD bovino, Con A y preferentemente con PPD aviar en comparación a las células sin estimular. En el animal 215 se expresó IFN- γ en las células que fueron estimuladas con PPD aviar y Con A; en tanto que IL-2 se expresó en células estimuladas con Con A; además IL-10 se expresó en células probadas con PPD bovino y Con A cuando fueron comparadas con células no estimuladas. IL-4 únicamente se evidenció en el animal 505 cuando sus células fueron estimuladas con Con A. Preferentemente en este grupo se observa una mayor expresión de IL-10, correlacionando con el patrón de respuesta en el que los animales son ELISA positivos (ver figura 5.3.4.).

Grupo III

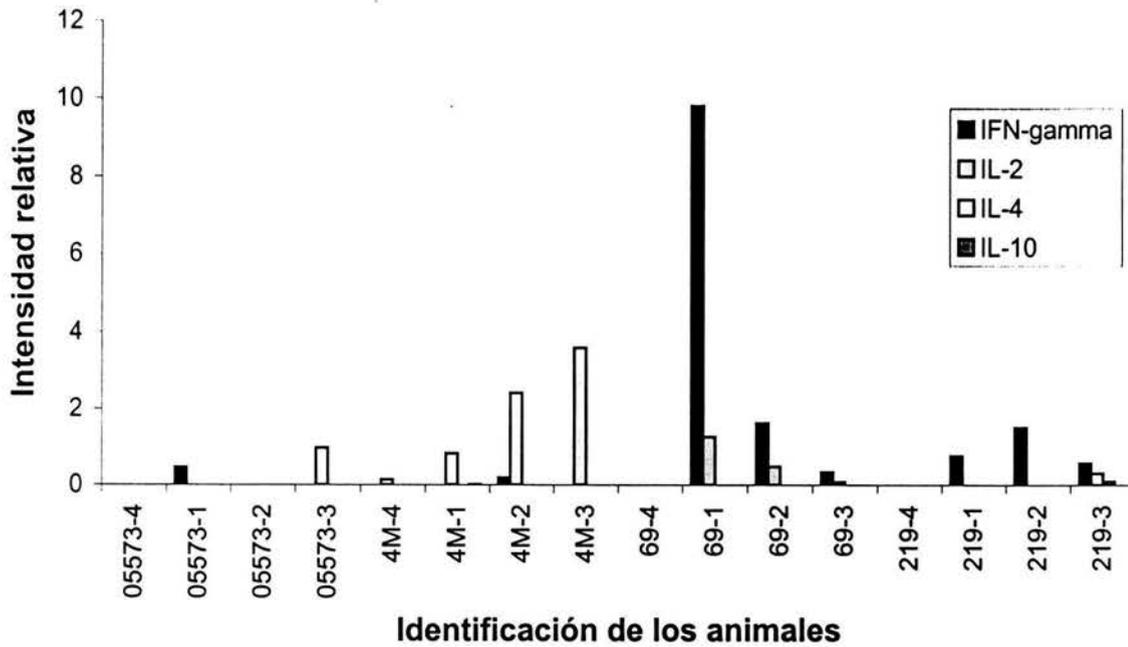


Fig.5.3.3. Resultados de RT-PCR para el grupo III. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

Grupo IV

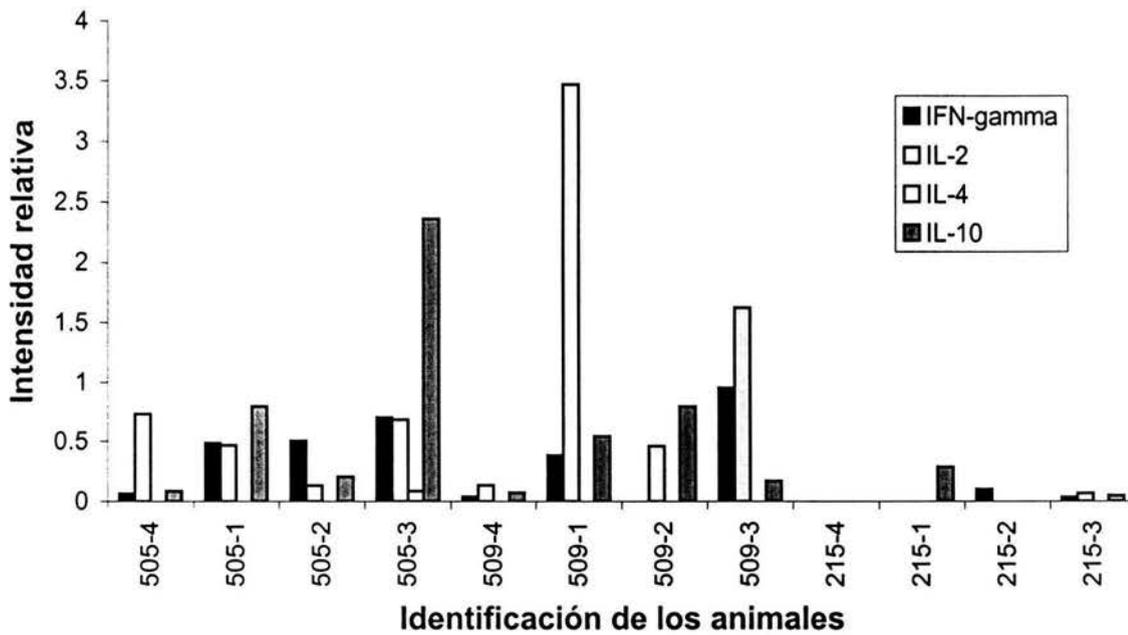


Fig.5.3.4. Resultados de RT-PCR para el grupo IV. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

Grupo V. En el animal 06801 se observó la expresión de IFN- γ en las células estimuladas con PPD bovino y Con A; mientras que, con PPD aviar solo se expresó IL-2 al comparar con células no estimuladas. El animal 603 mostró expresión de IFN- γ e IL-2 en células ensayadas con PPD bovino, PPD aviar y Con A relación con células que no se estimularon. En IL-4 se observó una expresión muy baja en los animales 06801 y 149 al comparar con las células no estimuladas. Por lo que respecta a IL-10 no se observó su expresión en ningún animal de este grupo (ver figura 5.3.5.).

Grupo VI. El animal 05572 presentó expresión de IFN- γ e IL-2 en las células estimuladas con PPD bovino; en tanto que, IL-2 e IL-4 se expresaron en las células ensayadas con Con A; IL-10 no se expresó en este animal, en comparación con células no estimuladas. En el animal 06970 se observó una expresión muy baja de IL-2 en las células probadas con PPD bovino y Con A; mientras que, tuvo una baja expresión en células estimuladas con Con A; IL-10 no se expresó al comparar con células sin estimular. Se presentó expresión de IFN- γ en el animal 18 en células estimuladas con PPD bovino y Con A; además IL-4 se expresó en forma muy baja en células estimuladas con Con A; IL-10 no se expresó en relación con células no estimuladas. En el animal 33 no se observó la expresión de IFN- γ e IL-2 al comparar con células sin estimular; IL-4 e IL-10 se observaron en células estimuladas con Con A. En el animal 48 se visualizó la expresión de IFN- γ e IL-2 en células probadas con PPD bovino, PPD aviar y Con A, además IL-4 se expresó en células ensayadas con Con A en comparación a células sin estimular (ver figura 5.3.6.1). El animal 41 mostró resultados similares a el animal 48, aunque IFN- γ se expresó grandemente en las células estimuladas con PPD aviar en comparación con células sin estimular. En el animal 54 se observó la expresión de IFN- γ e IL-2 en células ensayadas con PPD bovino y PPD aviar; con Con A se expresaron IFN- γ , IL-4 e IL-10 en comparación con células sin estimular. El animal 148 expresó IFN- γ en animales estimulados con PPD bovino, PPD aviar y Con A, además en las células estimuladas con Con A se expresaron IL-2 e IL-4 en comparación a células sin estimular. El animal 240 presentó expresión de IFN- γ en células ensayadas con PPD bovino, PPD aviar y Con A; IL-2 se expresó en células estimuladas con PPD bovino y Con A; además IL-4 se expresó en células estimuladas con Con A; IL-10 no se expresó al compara con células no estimuladas. El animal 777 expresó IFN- γ en células probadas con PPD bovino, PPD aviar y Con A; IL-2 solo se expresó en células estimuladas con Con A; mientras que, la expresión de IL-4 se observó en células estimuladas con PPD bovino; IL-10 no se expresó en relación con células no estimuladas (ver figura 5.3.6.2.).

Grupo VII. El animal 20 mostró expresión de IFN- γ en las células probadas con PPD aviar, Con A y principalmente PPD bovino; IL-2 se visualizó en células estimuladas con PPD aviar y Con A; IL-4 e IL-10 no se expresaron en relación a células sin estimular. En el animal 917 se expresó IFN- γ en células estimuladas con PPD bovino, PPD aviar y Con A; IL-4 se observó en células probadas con PPD bovino y PPD aviar; IL-10 no se expresó al comparar con células no estimuladas. El animal 24 únicamente mostró expresión de IFN- γ e IL-2 en células estimuladas con Con A; IL-4 e IL-10 no se expresaron al comparar con células no estimuladas. En el animal 957 se observó expresión de IFN- γ , IL-2 e IL-4 en células estimuladas con PPD bovino, PPD aviar y Con A en relación con células sin estimular; IL-10 no se expresó en ninguno de los animales de este grupo (ver figura 5.3.7.).

Grupo V

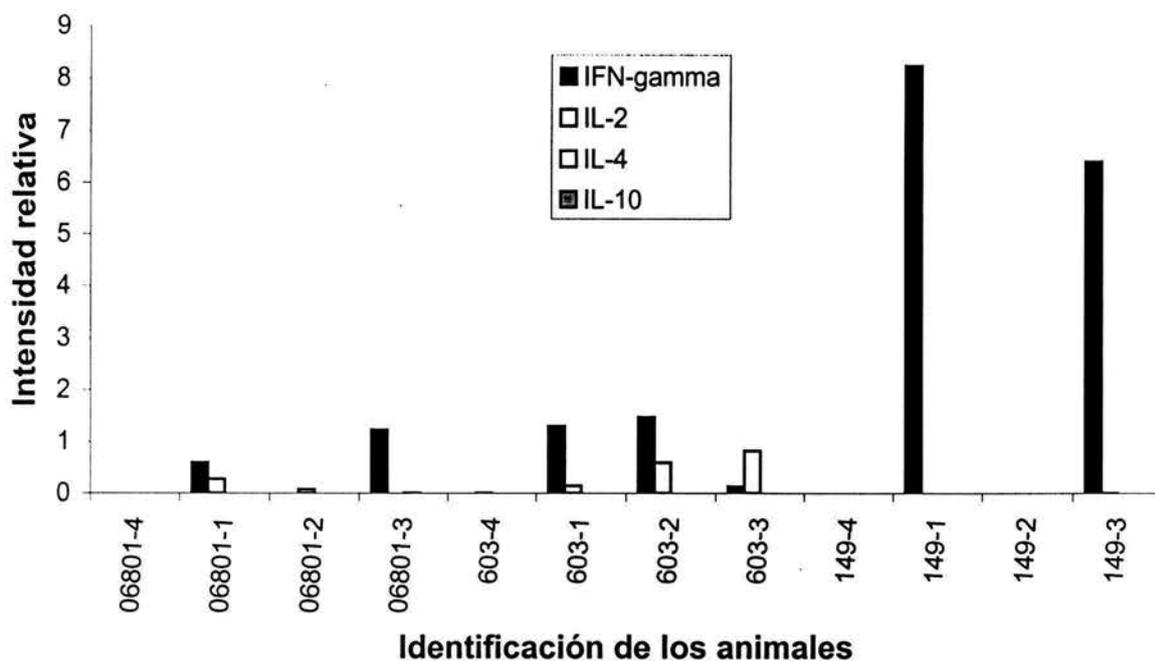


Fig.5.3.5. Resultados de RT-PCR para el grupo V. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

Grupo VI

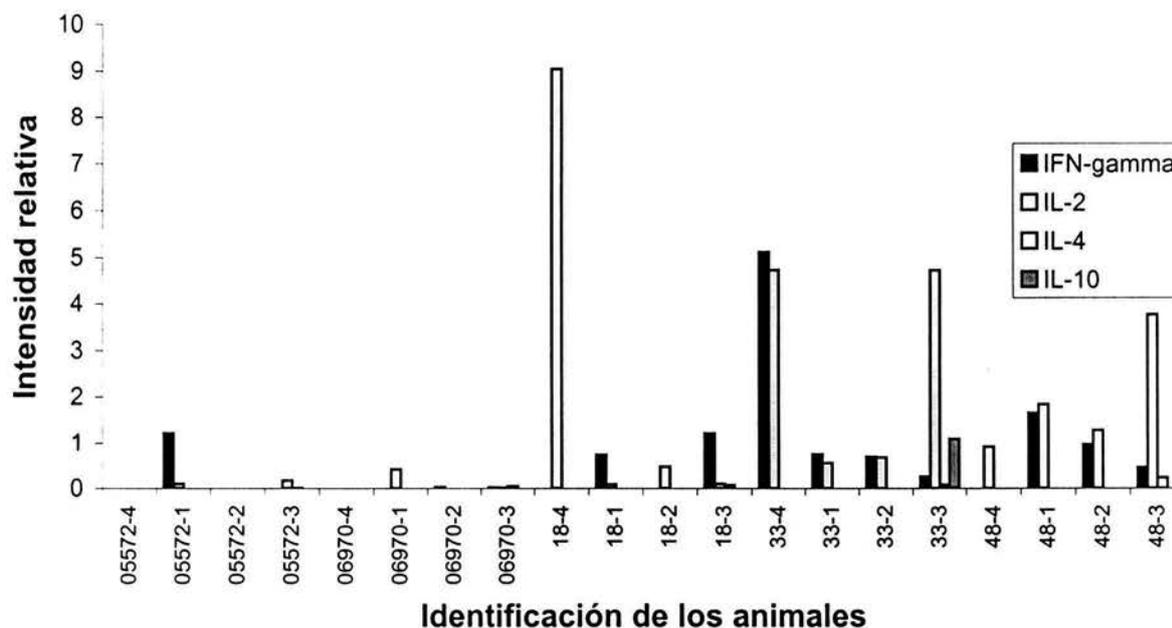


Fig.5.3.6.1. Resultados de RT-PCR para el grupo VI. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

Grupo VI

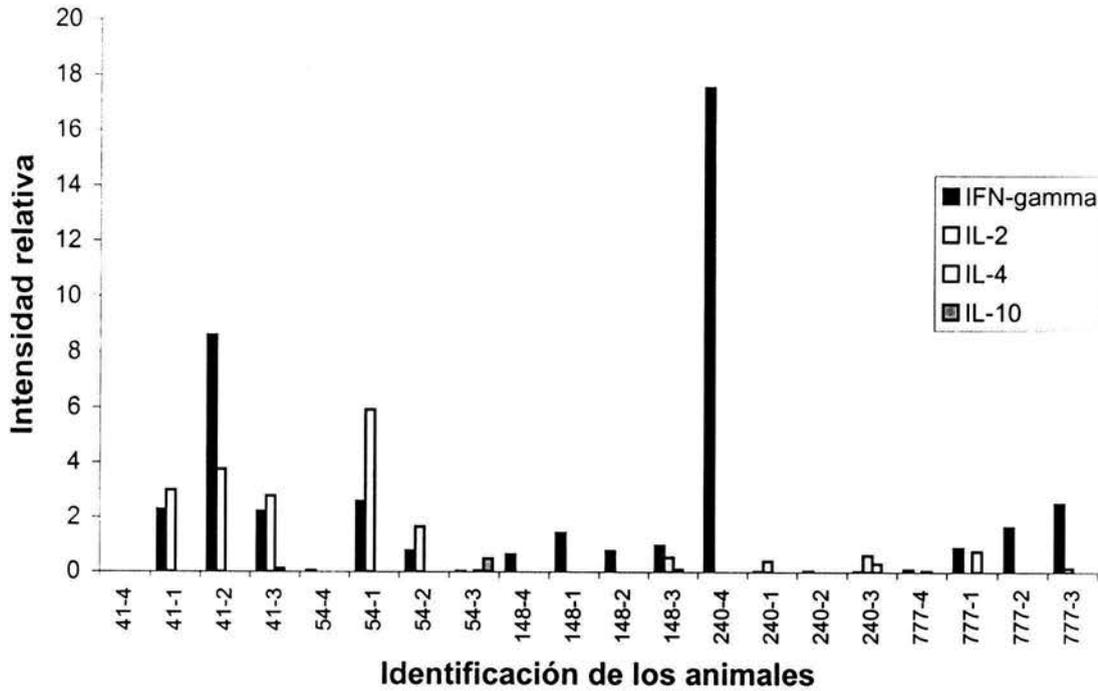


Fig.5.3.6.2. Resultados de RT-PCR para el grupo VI. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

Grupo VII

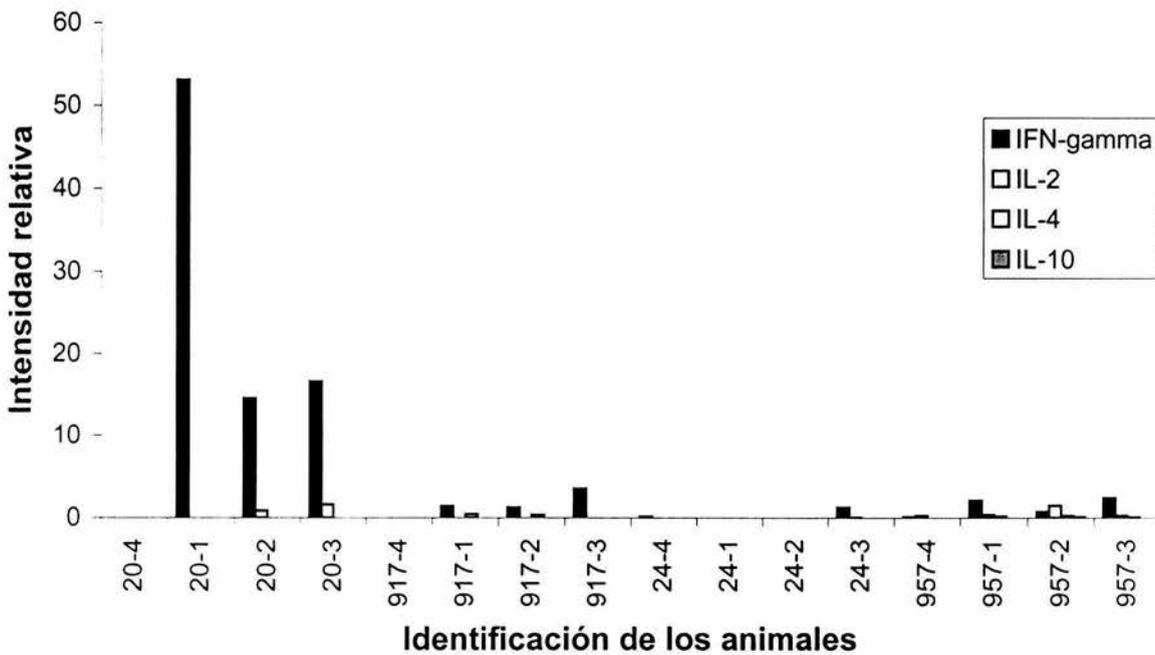


Fig.5.3.7. Resultados de RT-PCR para el grupo VII. Podemos observar la expresión de cada animal de las citocinas estudiadas (IFN- γ , IL-2, IL-4, e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etidio. Células estimuladas con PPD bovino (-1), con PPD aviar (-2), Con A (-3) y sin estimular (-4).

6. DISCUSIÓN

Fundamentalmente, han sido confusos los términos para definir tuberculosis primaria de post-primaria, puesto que en el primer caso, la enfermedad se manifiesta en animales no infectados previamente por *M. bovis*. La tuberculosis post-primaria implica que el animal ha sido infectado previamente por el organismo. Por esta razón, en la tuberculosis en humanos existen diferentes espectros inmunes, que permiten conformar cuatro grupos: Reactores (RR), reactores intermedios (RI), no reactores intermedios (UI) y no reactores (NR). Considerando que este mismo fenómeno se presente en bovinos, puesto que estos también presentan variaciones en su respuesta inmune, entre especie y aún para un mismo animal de acuerdo al progreso de la enfermedad.

Para la realización de este trabajo, fue primordial establecer patrones de respuesta inmune en bovinos, empleando cuatro herramientas de diagnóstico, que son ID, IFN- γ , ELISA y la PCR. Se evaluó la expresión de las citocinas más importantes, reconocidas como moduladoras de la respuesta inmune, que determinan por tanto, el control o progreso de la enfermedad. Las citocinas que se evaluaron por la técnica de RT-PCR fueron: IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10.

El empleo de la prueba de ID, ha mostrado su gran utilidad para el control de la TB a nivel mundial, sin embargo debido a su baja sensibilidad (70 %) y especificidad (50-60 %) se han desarrollado otros métodos, como la prueba de IFN- γ que es más sensible que la técnica de ID (Domingo *et al.*, 1995). Además, el empleo de la prueba del ELISA proporcionó una variante más para la conformación de los grupos; así, se observó que los animales procedentes de hatos con prevalencias baja y baja-media a TB presentaban valores de DO < 0.3 contra CFPE bovino, en tanto que los animales procedentes de hatos con prevalencias media-alta y alta presentaron valores de DO > 0.8 hacia CFPE bovino. Estos resultados indican que la sensibilidad del ELISA en animales con alta serorreactividad pueden producir una reacción específica contra *M. bovis* en individuos infectados con esta especie micobacteriana como ya se ha reportado (Rittaco, 1990). Por otro lado, una respuesta elevada de anticuerpos contra CFPE bovino, en algunos animales de hatos con prevalencia baja, sugiere que el ELISA podría ser un método útil para determinar infecciones residuales en hatos en donde recientemente se han dejado de encontrar reactores positivos a la prueba de ID, ya que es muy común la reaparición de nuevos casos (Nelly *et al.*, 1992).

El uso de la PCR se decidió, puesto que se ha reportado que es una prueba muy sensible y específica, que ayuda a detectar animales que están aparentemente sanos (Zumárraga *et al.*, 2001)

y efectivamente se conformó un grupo que fue positivo sólo a esta prueba, confirmando su sensibilidad.

La prueba de la RT-PCR se ha empleado por otros autores (Covert y Splitter, 1995; Keefe, 1997), para detectar exitosamente la transcripción del mRNA de citocinas bovinas en PBMC. En este estudio se utilizó empleando iniciadores ya diseñados, estimulando a las PBMC con PPD bovino, PPD aviar y Con A, además de un testigo negativo sin estimular. La expresión del mRNA es una medida apropiada de la producción de citocinas, puesto que, la mayoría de los genes de las citocinas son regulados transcripcionalmente y su expresión correlaciona directamente con los niveles de proteína (Covert y Splitter, 1995; Ng *et al.*, 1997).

En este estudio se empleó la amplificación de la β -actina como un control positivo de la RT-PCR, ya que esta es una proteína constitutiva de todas las células. La β -actina se detectó en todas las células probadas, aún en donde la transcripción de las citocinas no fue detectable de RNA de algunas muestras sin estimular y de algunas estimuladas (PPD bovino, aviar o Con A). Además, la amplificación de β -actina demostró que muestras diferentes contenían cantidades similares de cDNA y que las reacciones de la PCR fueron igualmente eficientes en transcribir las citocinas.

Las células estimuladas con Con A se emplearon como un control positivo de proliferación celular, algunas citocinas en células estimuladas con Con A no fueron visualizadas, de acuerdo con otros estudios esto puede deberse a una disfuncionalidad incrementada en su capacidad para inducir la producción de citocinas, debido al progreso de la enfermedad (Díaz *et al.*, 2003). Es importante mencionar que la presencia de IFN- γ en las cuatro explotaciones con diferente prevalencia muestran que en la explotación con menor prevalencia de TB, la producción de IFN- γ fue muy eficiente, dando a entender que eran animales que no se encontraban inmunocomprometidos. En el resto de las explotaciones se observa que el estado inmune del hato no les permitió responder de la misma forma que el otro grupo.

La identificación de los perfiles de citocinas de las subpoblaciones Th1 y Th2 de linfocitos ayudan al entendimiento de los mecanismos de protección o incapacidad para eliminar a un patógeno elucidando la comunicación entre las células Th (Covert y Splitter, 1995). Por esta razón en este trabajo se analizó la expresión de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) y Th2 (IL-4 e IL-10) en animales con diferentes perfiles inmunes.

En el grupo I se encuentran los animales negativos a todas las pruebas. En lo que respecta a la expresión de citocinas, en este grupo se observó en general una nula expresión de citocinas, con

excepción de dos animales, el 218 que mostró expresión elevada de IFN- γ con PPD bovino, PPD aviar y Con A, además de visualizarse también IL-2; en lo que respecta al animal 516 se observó la expresión de IFN- γ y más notablemente de IL-2 en células estimuladas con PPD aviar, Con A y PPD bovino. En contraste con lo observado en este trabajo se ha reportado que bovinos y murinos sanos solo presentan expresión de citocinas en células estimuladas con Conc A (Covert, y Splitter, 1995; Hernández-Pando *et al.*, 1997).

Por otra parte, se ha reportado en otros estudios que cultivos de PBMC sin previo contacto con la micobacteria presentan altos niveles de producción de IFN- γ en asociación con baja producción de IL-2 sugiriendo el papel de las citocinas derivadas de células NK en el desarrollo de una respuesta inmune exitosa específica contra *M. bovis*, como se ha reportado contra *M. tuberculosis* en humanos (Russo *et al.*, 2000).

En el grupo II se observan animales positivos a ID e IFN- γ , indicando que se trata de animales que probablemente se encuentran en etapas iniciales de la enfermedad; puesto que, en otros trabajos se reporta una fuerte respuesta a la prueba de IFN- γ en las primeras semanas después de una inoculación intratraqueal (Walravens *et al.*, 2002b), así como una DTH mediada por efectores regulados por el IFN- γ (Muraille y Leo, 1998). Por otra parte, se observó una expresión generalizada de IL-2, que sugiere la expansión clonal de linfocitos antígeno-específicos, que otros autores han encontrado en etapas iniciales en modelos murinos de tuberculosis pulmonar (Hernández-Pando *et al.*, 1997; Walravens *et al.*, 2002b). No se encontró una explicación para la falta de expresión de IFN- γ , ya que hay trabajos que reportan una concordancia entre RNAm y proteína (Covert, J). Además, se observó en los animales 03569 y 58 la expresión de IL-4 en células estimuladas con PPD aviar y Con A, esta expresión probablemente se debe a que se obtuvieron valores más elevados en el ELISA (0.461 y 1.132 respectivamente) que en la prueba de IFN- γ (0.327 y 0.958 respectivamente) con PPD aviar, lo que produce la supresión de IFN- γ e IL-2 en estos animales, como se ha reportado en otros trabajos, en donde la subpoblación Th2 tiene la capacidad de modular negativamente la respuesta Th1 (Bhattacharyya *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 2001).

El grupo III se formó con animales que resultaron positivos a las pruebas de ID, IFN- γ y PCR. Los resultados de este grupo sugieren una tuberculosis abierta, en la cual el animal se encuentra diseminando la micobacteria, esto se evidencia por la PCR. En este grupo al igual que el anterior se encuentra una expresión generalizada de IFN- γ e IL-2 que sugieren una respuesta Th1 y probablemente en el inicio de una etapa crónica. Bhattacharyya *et al.* (1999) reportan que los perfiles

de citocinas Th1 y Th2 se encuentran en estados crónicos de la enfermedad, en los cuales los antígenos micobacterianos persisten y no pueden ser eliminados, mientras que un patrón de citocinas Th0 es más notable en un inicio de la infección, después de la activación linfocítica (en humanos).

En el grupo IV se encuentran animales que fueron únicamente positivos a la prueba del ELISA, esto hace suponer que se trata de un grupo de animales con actividad de linfocitos B (inmunidad humoral), coincidiendo con la expresión de citocinas en donde encontramos IFN- γ e IL-2, pero predomina IL-10. Los resultados de este grupo de animales hacen suponer la posibilidad de una tuberculosis activa; en la que otros autores reportan una producción de IFN- γ , con altos niveles de IL-10 (en humanos) (Boesen *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1998).

El grupo V se formó con animales que fueron positivos a las pruebas de ID, IFN- γ y ELISA. Estos resultados hacen suponer que se trata de animales en fase crónica, en la cual encontramos la presencia de inmunidad celular e inmunidad humoral, ya en otros trabajos se ha reportado que en la fase crónica de la enfermedad (en murinos) hay una coexistencia entre inmunidad celular y humoral durante la evolución de la enfermedad (Hernández-Pando *et al.*, 1997). En lo referente a las citocinas este grupo presentó en general, una expresión constante de IL-2 e IFN- γ , pero no de IL-4 e IL-10; lo que presupone, que la producción de anticuerpos se debe a otra citocina no estudiada en este ensayo, como la IL-13. Otros autores reportan, que IL-13 posee la capacidad de iniciar la síntesis de anticuerpos por las células B y antagonizar con IFN- γ ; además, esta puede ser sintetizada por subpoblaciones Th0, Th1 y Th2 (Gordon, 2003), lo que explica la presencia de IFN- γ e IL-2 en este grupo.

En el grupo VI se observan animales que resultaron positivos a las cuatro pruebas. Estos hallazgos son similares a los del grupo anterior; además, sugieren que la tuberculosis es abierta (son PCR +). Por lo que respecta a las citocinas este grupo presentó una expresión constante de IFN- γ e IL-2. Estos resultados coinciden con otros, en donde la falta de expresión de IL-4 e IL-10 se puede deber a la producción de IFN- γ que antagoniza con una respuesta Th2, como ya se ha reportado (Thoen y Steele, 1995; Jiménez *et al.*, 2001) y la presencia de inmunidad humoral se puede relacionar con otras citocinas no ensayadas en este trabajo, como IL-13 que puede ser producida por subpoblaciones Th0, Th1 y Th2 (Gordon, 2003).

En el grupo VII se agruparon animales que resultaron positivos solo a la prueba de la PCR, sugiriendo que estos animales se encuentran posiblemente en una etapa de muy reciente infección

en la cual la micobacteria no ha pasado hacia el tracto respiratorio bajo o que los animales presentaron una carga bacteriana muy baja que produjo una respuesta inmune muy baja, que no produjo resultados positivos en la otras pruebas, demostrando que la PCR es una prueba muy sensible y precisa (Zumárraga *et al.*, 2001) Por otra parte, este grupo presentó en general una constante expresión de IFN- γ con PPD bovino y aviar, una posible explicación a esto, es que al encontrarse el animal en etapas de infección muy reciente, otras poblaciones celulares, como las células NK, sean las responsables de la producción temprana del IFN- γ , como se ha reportado previamente (Jiménez *et al.*, 2001; Trinchieri, 2003)

Así, se puede mencionar que, en este trabajo no existió una correlación en todos los grupos entre animales que son positivos a ID e IFN- γ con la expresión de IFN- γ e IL-2; que no se encontró en todos los grupos una expresión de IL-4 y/o IL-10 en los animales ELISA positivos.

Sería interesante la realización de estudios futuros en los que se probará la expresión de citocinas con un número representativo de animales en los grupos que tuvieron que ser eliminados en este trabajo, para poder observar el patrón de expresión de citocinas en estos grupos.

Relevante resultaría también el poder ensayar otras citocinas que son igualmente importantes en el desarrollo de la TB, como IL-12, TNF- α e IL-18. De igual importancia sería realizar el seguimiento de los animales probados al rastro para conjuntar los hallazgos a la necropsia con las otras pruebas.

Además, el estudio de bovino bajo un esquema experimental, permitiría el control de los animales en varios aspectos; como el trabajar con animales libres de TB e infectarlos al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, para observar como evoluciona la enfermedad en cada uno, midiendo niveles de anticuerpos, inmunidad celular y por supuesto la expresión de citocinas, además de poder examinar las lesiones a la necropsia.

7. CONCLUSIONES

Se logró la conformación de 10 grupos con diferentes patrones de respuesta inmune mediante la utilización de pruebas de campo (ID) y laboratorio (IFN- γ , ELISA y PCR), en condiciones naturales de infección con animales de diferentes hatos lecheros que presentaron distintas prevalencias.

En animales sanos no se observó la expresión del RNAm de IFN- γ en células estimuladas con Con A, como se reporta en otros trabajos en bovinos y murinos.

No siempre existió una correlación entre la prueba de IFN- γ y la transcripción de RNAm de IFN- γ , ya que en el grupo II los animales fueron positivos a la prueba de IFN- γ , pero no se encontró expresión de esta citocina.

En el grupo de animales ELISA positivo (grupo IV) se observó claramente que existe preferentemente expresión de IL-10

En alguna etapa de la infección existe una coexistencia entre inmunidad humoral y celular, aunque no exista expresión de IL-4 e IL-10, lo que evidencia que otras citocinas no probadas en este trabajo son las responsables de activar a las células B para la producción de anticuerpos.

8. ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CD	Grupo de diferenciación
CFP	Proteínas de filtrado de cultivo
CFPE	Extracto protéico de filtrado de cultivo
CMI	Inmunidad mediada por células
Con A	Lectina Concanavalina A
CTAB	N-cetil-N, N, N,-trimetil bromuro de amonio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	Hipersensibilidad retardada
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
IDR	Intradermorreacción
IFN- γ	Interferón-gamma
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
LAM	Lipoarabinomanano
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NK	Asesina natural
NO	Óxido nítrico
NOS2	Sintasa de óxido nítrico
PAF	Factor activador de plaquetas
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Suero fetal bovino
PMN	Polimorfonucleares
PPD	Derivado protéico purificado
RNI	Intermediarios de nitrógeno reactivo
RT-PCR	Transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa
SDO	Superóxido desmutasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TB	Tuberculosis bovina
Tc	Linfocito T citotóxico
TGF- β	Factor transformador del crecimiento-beta
Th	Linfocito T cooperador
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral-beta

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Cami K, Romano M I, Alito A, Zumarraga M, Bigi F and Cataldi A. 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. JCM. 39 (3) : 1067-1072
- 2 Hernández-Pando R, Orozco, E H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J and Madrid-Marina V. 1997. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology. 90 : 607-617
- 3 Covert J and Splitter G. 1995. Detection of cytokine transcriptional profiles from bovine peripheral blood mononuclear cells and CD4⁺ lymphocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Vet Immunol Immunopathol. 49 : 39-50
- 4 Ng K H, Aldwell F E, Wedlock D N, Watson J D and Buddle B M. 1997. Antigen-induced interferon- γ and interleukin-2 responses of cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*. Veterinary Immun Immunopathol. 57 : 59-68
- 5 Manning E y Collins M T. Introduction en Review Scientific et technique. OIE. Editado por Board-Consejo Editorial. 2001. 20 (1): 9-10
- 6 Bloom B R, Murray C J L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. Science. 257: 1055-1064
- 7 Morris J A, Thorns C J, Wolley J. 1985. The identification of antigenic determinants on *Mycobacterium bovis* using monoclonal antibodies. J. of Gen. Micro. 131: 1825-1831
- 8 Marchal, G. 1992. El resurgir de la tuberculosis. Mundo científico. 136 (13): 520-528
- 9 Kochi A. 1991. The global situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle. 72: 1-6
- 10 Kissane J M. Chapter 22: Lung and mediastinum en Anderson's Pathology. Editado by John M. Kissane. 1985. Vol. I: 852-860
- 11 Chapman C & Hall MEDICAL. Chapter 7 en: Pathology. Editado por Ian C. Cree. 1997. 150-155
- 12 Ashford E, Whitney P, Raghunathan & Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals en Review Scientific et technique. OIE. Editado por Board-Consejo Editorial. 2001. 20 (1): 325-337
- 13 Drapee P. 1991. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. Res Microbiol. 142 : 420-422

- 14 Rastogi N. 1991. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug resistance. *Res Microbiol.* 142 : 462-476
- 15 Ausina R V. 1995. Tuberculosis. Farrera Valenti, P. 13° edición. Mosby/Doyma libros, Madrid. 2367-2371
- 16 Besra G S and Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. Barry, R. Bloom, ed. American Society of Microbiology, Washington. 1994. Cap. 20
- 17 Thoen C O and Steele J H. 1995. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* in: *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ed. by Charles O. Thoen and James H. Steele. Iowa State University Press/Ames. Iowa 1995. 3-15
- 18 Felton M J and Vermeulen M W. 1996. Immunopathology of tuberculosis. Roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun.* 64 : 683-690
- 19 Wedlock D N, Vesosky B, Skinner M A, De Lisle G W, Orme I M and Buddle B M. 2000. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 68 (10) : 5809-5815
- 20 Rastogi N, Lagrand & Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis en *Review Scientific et technique*. OIE. Editado por Board- Consejo Editorial. 2001. 20 (1): 21-54
- 21 Schmitt S M, O'brien D J, Bruning-Fann C S and Fitzgerald S D. 2002. Bovine tuberculosis in Michigan wildlife and livestock. *Ann N Y Acad Sci.* 969: 262-268
- 22 Valdespino, O.J.R., Dosseti, D. J.G. Batalla, C.D. 1995. Incidencia de la tuberculosis bovina, durante once años en establos de una cuenca lechera con un programa de control. *Vet. Méx.* 26. Supl 2:35.
- 23 Fifis T, Corner L A, Rothel J S and Wood P R. 1994. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. *Scand J Immunol.* 39 : 267-274
- 20 Amadori M, Tagliabue S, Lauzi S, Finazzi G, Lombardi G, Telo P, Pacciarini L and Bonizzi L. 2002. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. *J Vet Med B.* 49: 89-96
- 24 Nayak S, Verma R, Joshi B and Venkatesan K. 2001. Aspects of humoral and cell-mediated immune responses in calves experimentally infected with *Mycobacterium bovis* strain. *Indian J of Anim Sci.* 71 (8): 726-730

- 25 Rothel J S, Jones S L, Corner L A, Cox JC and Wood PR. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J.* 67: 134-137
- 26 Domingo M, Liébana E, Carrera J, Vilafranca M, Casal J, Aranaz A, Altamira J, Vidal D, Marco A, Panel J M, Mateos Aa y Dominguez L. 1995. Eficacia comparativa de la intradermorreacción y de la prueba de liberación de γ -interferón para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo. *Med Vet.* 12 (5): 307-316
- 27 Wood P R, Corner L A, Rothel J S, Fifis T *et al.* 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.* 31: 71.
- 28 Ritacco V, López B, De Kantor I N, Barrera L y Errico F, Nader A. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in veterinary science.* 50: 365-367
- 29 Zumárraga R J, Paolicchi F, Garbaccio S, Gioffré A y Cataldi A. 2001. Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido de terneros. *Vet Arg.* XVIII (179): 668-676
- 30 Taylor M J, Hughes M S, Skuce R A and Neill S D. 2001. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. *J Clin Microbiol.* 39: 1271-1278
- 31 Cockle P J, Gordon V S, Lalvani A, Buddle B M, Hewinson R G and Vordermeier H M. 2002. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potencial as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect Immun.* 70 (12): 6996-7003
- 32 Hernández-Pando R, Pavón L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V and Rook G. 1997. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun.* 65 (8) : 3317-3327
- 33 Chambers M A, Williams A, Gavier-Widén D, Whelan A, Hall G, Marsh P D, Bloom B R, Jacobs W R and Hewinson R G. 2000. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against *M. bovis* and hematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* without sensitization to tuberculin. *Infect Immun.* 68 (12) : 7094-7099
- 34 McDonough K A, Kress Y and Bloom B. Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. 1993. 61 (7): 2763-2773
- 35 Blood D C, Henderson J A, Radositis O M. 1986. Enfermedades causadas por bacterias. Enfermedades causadas por especies de *Mycobacterium* en: *Medicina Veterinaria.* Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 1986. 691-702

- 36 Dobos K M, Spotts E, Quinn F D and King C H. 2000. Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect Immun.* 68 (11) : 6300-6310
- 37 Morikawa A, Koide N, Kato Y, Sugiyama T, Chakravorty D, Yoshida T and Yokochi T. 2000. Augmentation of nitric oxide production by gamma interferon in a mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 68 (11) : 6209-6214
- 38 Aldwell F E, Dicker B L, Da Silva T F M, Cross F M, Liggett S, Mackintosh C G and Griffin F T. 2000. *Mycobacterium bovis*- infected cervine alveolar macrophages secrete lymphoreactive lipid antigens. *Infect Immun.* 68 (12) : 7003-7009
- 39 Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J and Heron I. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 59 (6): 1905-1910
- 40 Jiménez M M, Báez S R, Linares C M, Chávez S R, Lascurain S R y Centeno G E. 2001. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 14 (1): 39-49
- 41 Bergeron A, Bonay M, Kambouchner M, Lecossier D, Riquet M, Soler P, Hance A and Tazi A. 1997. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas. *J of Immunol.* 159 : 3034-3043
- 42 Converse P J, Dannenberg A M Jr, Estep J E, Sugisaki K, Abe Y, Schofield B H and Pitt M L M. 1996. Cavitory tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. *Infect Immun.* 64 (11) : 4776-4787
- 43 Turner J, González-Juarrero M, Saunders B M, Brooks J V, Marietta P, Ellis D L, Frank A A, Cooper A M and Orme I M. 2001. Immunological basis of reactivation of tuberculosis in mice. *Infect Immun.* 69 (5) : 3264-3270
- 44 Bloom B R. T.cell-responses and cytokines in: Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. Edited by Barry R. Bloom. ASM PRESS. Washington, D.C. 1994. Cap. 25: 419
- 77 Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. *Immunol.* 3 : 133-146
- 45 Flynn J L and Chan J. 2001. Minireview. Tuberculosis: Latency and Reactivation. *Infect Immun.* 69 (7) : 4195-4201

- 46 Wakeham J, Wang J and Xing Z. 2000. Genetically determined disparate innate and adaptive cell-mediated immune responses to pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun.* 68 (12) : 6946-6953
- 47 Smith S M, Klein M R, Malin A S, Sillah J, Huygen K, Andersen P, McAdam K P and Dockrell H M. 2000. *Infect Immun.* 68 (12): 7144-7148
- 48 Flynn J L and Ernst J D. 2000. Immune responses in tuberculosis. *Current Opinion in Immunology.* 12: 432-436
- 49 Liébana E, Girvin R M, Welsh M, Neill S D and Pollock J M. 1999. Generation of CD8⁺ T-cell responses to *Mycobacterium bovis* antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 67 (3): 1034-1044
- 50 Stenger S and Modlin R L. 1999. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Immunology.* 2: 89-93
- 51 Bhattacharyya S, Singla R, Dey A B and Prasad H K. 1999. Dichotomy of cytokine profiles in patients and high-risk healthy subjects exposed to tuberculosis. *Infect Immun.* 67 (11): 5597-5603
- 52 Russo D M, Kozlova N, Lakey D L and Kernodle D. 2000. Naïve human T cells develop into Th 1 effectors after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages or recombinant Ag85 proteins. *Infect Immun.* 68 (12) : 6826-6832
- 53 Chensue S W, Warmington K, Ruth J H, Lukacs N and Kunkel S L. 1997. Mycobacterial and Schistosomal antigen-elicited granuloma formation in IFN- γ and IL-4 knockout mice. *J of Immun.* 159 : 3565-3573
- 54 Rhodes S G, Palmer N, Graham S P, Bianco A E, Hewinson R G and Vordermeier H M. 2000. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 68 (9) : 5393-5400
- 55 Ameixa C and Friedland J S. 2001. Down-regulation of interleukin-8 secretion from *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes by interleukin-4 and -10 but not by interleukin-13. *Infect Immun.* 69 (4) : 2470-2476
- 56 Murray P J and Young R A. 1999. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 67 (6): 3087-3095
- 57 Thrusfield, M. 1997. *Veterinary epidemiology.* Blackwell Sciences, UK.
- 58 Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*)

- 59 Walravens K, Marche S, Rosseels V, Wellemans V, Boelaert F, Huygen K and Godfroid J. 2002a. IFN- γ diagnosis tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Vet Immunol Immunopathol.* 87: 401-406
- 60 Walravens K, Wellemans V, Weynants V, Boelaert F, deBergeyck V, Letesson J J, Huygen K and Godfroid J. 2002b. Analysis of the antigen-specific IFN- γ producing T-cell subsets in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 84: 29-41
- 61 Nualláin E M Ó, Davis W C, Costello E, Pollock J M and Monaghan. 1997. 56: 65-76
- 62 Voller A, Bidwell D E and Barlett A. The enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) in A guide with abstracts of microplate applications London (UK). Edited by Dynatech Laboratories, Inc. 1979.
- 63 Van Soolingen D, Van Der Zanden A, De Has P, Noordhoek G, Kiers A, Fourdrine N, Portels F, Kolk A, Kremer K and Van Embden J. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microtti* infection among humans by using novel genetic markers. *J of Clin Microbiol.* 6 (36): 1840-1845
- 64 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S *et al.* Simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997. 35 : 907-914
- 65 Cerretti, D.P., McKereghan, K., Larsen, A., Cantrell, M.A., Anderson, D., Cosman, D., Gillis, S., Baker, P.E., 1986a. Cloning sequence, and expression of bovine interleukin-2. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 83:3223-3227.
- 66 Cerretti, D.P., McKereghan, K., Larsen, A., Cosman, D., Gillis, S., Baker, P.E. 1986b. Cloning sequence, and expression of bovine interferon gamma. *J. Immunol.* 136:4561-4564.
- 67 Heussler, V T, Eichorn, M., Dobbelaere, D.A., 1992. Cloning of a full-length cDNA encoding bovine interleukin-4 by the polymerase chain reaction. *Gene.* 114:272-278.
- 68 Hash S M, Brown W C and Ficht A R. 1994. Cloning of a full-length cDNA encoding bovine interleukin-10 using the polymerase chain reaction. *Gene.* 114 : 272-278
- 68 Degen J L, Newbauer M G, Freizner S J, Seyfreid C E and Morris D R. 1983. Regulation of protein synthesis in mitogen-activated bovine lymphocytes analysis of actin-specific and total mRNA accumulation and utilization. *J Biol Chem.* 258 : 12 153-12 162
- 69 Chomczynski PY and Sacci N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159

- 70 Beltan E, Horgen L and Rastogi N. 2000. Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Microbial Pathogenesis*. 28 : 313-318
- 71 Ritacco V. 1990. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Med Series B*. 37 : 19-27
- 72 Neill SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TG. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet Rec*. 131 : 45-47
- 73 Díaz F, Massó F, Páez A, Varela E, Suárez-Güemes F y Montaña LF. 1999. Secretion of IFN- γ bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Mycobacterium bovis* protein fractions obtained by isoelectric-focusing. *Vet Immunol Immunopathol*. 67 : 203-212
- 74 Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA and Sada E. 1998. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 66 (1) : 176-180
- 75 Boesen H, Jensen BN, Wilcke T and Andersen P. 1995. Human T-cell response to secreted antigen fraction of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 63 : 3482-3489
- 76 Muraille E and Leo O. 1998. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scan J Immunol*. 47 : 1-9
- 77 Díaz F, Banda V, Jaramillo L, Arriaga C, González D y Estrada C. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet Mex*. 34 (1) : 13-26
- 78 Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Immunol*. 3 : 23-35
- 79 Lee R E, Brennan P J and Besra G S. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Tuberculosis*. Shinnick. Springer. 1996. Cap. I. 1-25

APÉNDICE A

Agua con dietil-pirocarbonato (DEPC).

- 1) 100 μ l de dietil-pirocarbonato
- 2) cbp 100 μ l de agua Milli-Q (o destilada)
- 3) Dejar agitando toda la noche a 4°C
- 4) Esterilizar por calor 15 min. 15 libras

Alcohol etílico al 75%.

- 1) 75 ml de alcohol etílico absoluto
- 2) cbp 100 ml de agua DEPC (o destilada)

Solución bufferada de fosfatos (PBS).

	1X
1) NaCl	8.0gr
2) K ₂ HPO	1.2gr
3) KH ₂ PO ₄	0.34gr
4) cbp	1000ml

TAE 50X (TRIS-ácido acético-EDTA).

- 1) 24.2gr de TRIS base
- 2) 5.71ml de ácido acético glacial
- 3) 25ml de EDTA 0.2M pH 8.0
- 4) cbp 100ml de agua DEPC

Gel de agarosa al 1.5%.

- 1) 100ml de TAE 1X (diluir 1ml de TAE 50X en 49ml de agua destilada)
- 2) 1.5gr de agarosa
- 3) 1 μ l de bromuro de etidio en 100ml

A 100ml de TAE 1X agregar 1.5gr de agarosa, homogenizar con calor y agregar 1 μ l de bromuro de etidio.

APÉNDICE B

CTAB

	100ml
1) NaCl	4.1gr
2) CTAB	10gr
3) Agua	100ml

Amortiguador de pegado (buffer de carbonatos 0.06M pH 9.6).

- 1) 3.8gr/L de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- 2) 1.93gr/L de carbonato de sodio (Na_2CO_3)

Amortiguador de lavado (buffer de fosfatos 0.01M pH 7.2).

- 1) 1.10gr/L de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)
- 2) 0.32gr/L de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)
- 3) 8.5gr/L de cloruro de sodio
- 4) 1ml de Tween 20
- 5) 1000ml de agua destilada

Amortiguador de citratos (0.05M pH4.5).

- 1) 4.6gr/L de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- 2) 7.64gr/L de citrato trisodium ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Ácido sulfúrico 2M (H_2SO_4)

55.5 ml H_2SO_4 cbp 500 ml