

1674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
CUAUTITLÁN

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN CÉLULAS DE BOVINOS VACUNADOS CON  
BCG Y FILTRADO DE CULTIVO DE *Mycobacterium bovis* ESTIMULADAS  
CON ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS RECOMBINANTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MAURA CRUZ FIERRO

TUTOR: DR. FERNANDO DÍAZ OTERO

COMITÉ TUTORIAL: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2005

m. 345226



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

OFICIO/FES-C/CGPMYDCPySA/ST/CGEP/299/IV/2005

ASUNTO: Designación de Jurado

**BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE**  
**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN DE POSGRADO**  
**DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN 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 **CRUZ FIERRO MAURA**, registrada con el número de cuenta **9057370-1** para presentar su examen de grado de **Maestra en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**, con la tesis titulada **"Expresión de citocinas en células de bovinos vacunados con BCG y filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis* estimuladas con antígenos micobacterianos recombinantes"** a quien se le ha designado el siguiente jurado:

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Presidente:</b>       | <b>DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO</b> |
| <b>Vocal:</b>            | <b>DRA. CLARA INES ESPITIA PINZON</b>   |
| <b>Secretario:</b>       | <b>DR. EDGAR ZENTENO GALINDO</b>        |
| <b>Primer Suplente:</b>  | <b>DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ</b>         |
| <b>Segundo Suplente:</b> | <b>DR. FERNANDO DIAZ OTERO</b>          |

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 13 de abril del 2005.

**DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES**  
**COORDINADOR GENERAL**

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

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Av. 1° de mayo S/N, Campo 1, Edificio de Estudios de Posgrado,  
Apartado Postal 25, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54700  
Tel.: 5623 2027, Fax: 5868 2489

**La investigación se efectuó en el laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología) del INIFAP, como parte de las investigaciones del proyecto "Tuberculosis Bovina"**



**Trabajo parcialmente financiado por CONACYT. Proyecto No. D 43244-Z, y con beca parcial del proyecto.- G34799-B**

## DEDICATORIAS

Hoy me considero ser una hija consentida de DIOS, y primero le agradezco a él, por ayudarme a culminar esta etapa, en donde me ha puesto a prueba en muchas ocasiones y siempre me ha escuchado, reconozco que no he estado sola.

Ma. de la Luz, mi abuelita consentida sin tí, mi forma de pensar y parte de mi esencia, no serían reflejo de la tuya, gracias por ser parte de un principio, el mío, donde quiera que estés, siempre estas en mi corazón.

A mis hijos, Luis Rodrigo y Luz Mariana, ha valido la pena el sacrificio y el esfuerzo de nosotros, gracias por su paciencia, los amo.

A mi madre Sofia, el tiempo da experiencia, que has sabido transmítirme, y los valores inculcados los he aprendido también, ahora entiendo el tiempo que sacrificaste estar con tus hijas, por forjar un mejor futuro para nosotras, gracias por ser mi madre.

Javis, tal vez no pasamos juntos en su momento, el tiempo necesario, sin embargo nunca es tarde y en gran medida, este logro te lo debo a tí, porque estuviste en el momento justo, apoyándome, te quiero papá.

A mi hermana Sofia, por su apoyo, consejos, y paciencia en todo momento y en todos los aspectos que nos han rodeado.

A todos aquellos que han estado cerca de mí y que no hemos podido continuar el camino juntos, porque solo se han adelantado.

A todas las personas con espíritu de libertad Diana, Teresa, Carol, Nelson, Diane, Jane, Flor y Mario, gracias por ser parte del ejemplo.

A mi tía Carmen, gracias por hacer todo más sencillo y por demostrarme que me quieres.

## AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial para el H. Jurado, por su experiencia, y en la crítica objetiva y acertada, en mejora del trabajo.

Al Dr. Fernando Díaz y la Dra. Laura Jaramillo por la oportunidad y apoyo brindados.

A la Dra. Camila, por todo el apoyo recibido, tanto profesional como moral, durante mi estancia en el Instituto.

A mis verdaderos amigos, que no necesitan mención, ya que ellos saben que los considero así, aunque no siempre tenemos la oportunidad de vernos, siempre están conmigo.

Al Dr. Rafael Pérez, y al Dr. Fernando Ingalls, porque mucho del apoyo profesional, lo he recibido de ustedes, gracias por invitarme a sus respectivos equipos de trabajo, y por despertar en mí la inquietud de lograr este objetivo.

Al equipo de trabajo de AGROPECUS, Dr. Ariel, Dr. Benito, Dr. Enrique, que me ha dado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, y me ha brindado las herramientas para abrir las puertas de otras áreas.

Al Dr. Carmona, por su ayuda incondicional y elemental para la parte analítica este trabajo.

Al Dr. José Rojo, por sus consejos y amistad sincera de siempre.

Al Dr. Heriberto y su familia, por tantos años de confianza ofrecida, pero sobre todo por su amistad y sus palabras de aliento.

A mis amigos y compañeros de trabajo, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Rocío, Chayito, Mago, Lili, Angie, Josefina, y Don Goyo, que siempre me han animado a continuar, con sus palabras de aliento, para seguir por este camino.

A mis amigos del Depto. de Posgrado de FES-Cuautitlán Campo 1, Mine, Hugo, Dra. Paty, Chivís, Rodrís, por su paciencia y apoyo en todos los aspectos.

Al Dr. Gabriel Ruíz, que es un ejemplo de admiración y respeto, por su espíritu creativo, profesional y sobre todo por ser un gran apoyo espiritual.

A mis amigos y compañeros del INIFAP, Palo Alto, Cecy, Martha, Juanito, por su amistad sincera; Angel y Jesús, sin ustedes en ocasiones no se hubieran acortado distancias, ni tiempo.

Dr. Víctor Banda, gracias por enseñarme, y tenerme paciencia, sin sus comentarios graciosos, la estancia en el Instituto no hubiera sido tan divertida.

A Lupita, Fer y Elvira, por todo su tiempo dedicado a que esto saliera adelante.

A todo el equipo de trabajo del INER, gracias por su experiencia y enseñanza, para que todo saliera bien.

A todos mis profesores, que desde el principio sembraron buenas bases, nombrar a algunos sería injusto, porque muchos nombres quedarían al olvido, sin embargo todos ustedes están en mi memoria.

## ÍNDICE GENERAL

|   | Páginas |
|---|---------|
| INDICE GENERAL  | I       |
| Resumen   | V       |
| Summary   | VI      |
| 1. INTRODUCCIÓN   | 1       |
| 1.1. Historia de la tuberculosis bovina (TB)  | 2       |
| 1.2. Agente etiológico de la tuberculosis bovina  | 4       |
| 1.3. Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública                                  | 6       |
| 1.4. Diagnóstico y control de la tuberculosis bovina  | 8       |
| 1.5. Vacunas contra la tuberculosis bovina  | 9       |
| 1.6. Antígenos micobacterianos  | 11      |
| 1.7. Patogénesis de la tuberculosis bovina  | 13      |
| 1.8. Respuesta inmune en la tuberculosis bovina   | 16      |
| 1.8.1. Función de los macrófagos en la tuberculosis bovina                                      | 17      |
| 1.8.2. Importancia de los receptores de linfocitos T (TLRs) en la respuesta inmune              | 17      |
| 1.8.3. Inducción de la respuesta inmune   | 18      |
| 1.8.4. Acción de los linfocitos   | 19      |
| 1.8.5. Papel de las citocinas en la modulación de la respuesta inmune en la tuberculosis bovina | 21      |
| 2. HIPÓTESIS  | 23      |
| 3. OBJETIVO GENERAL   | 23      |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 23      |
| 5. MATERIAL Y METODOS   | 24      |
| 5.1. Animales y lugar de estudio  | 24      |
| 5.2. Tratamientos   | 24      |
| 5.3. Prueba de intrademorreacción (ID)  | 26      |
| 5.4. Determinación de interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )                                     | 26      |
| 5.5. Evaluación de la inmunidad humoral (ELISA)   | 28      |
| 5.6. Diagnóstico de tuberculosis bovina por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)           | 28      |
| 5.6.1. Extracción de DNA de hisopo nasal  | 28      |

|  |    |
|--|----|
| 5.6.2. Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)  | 29 |
| 5.7. Obtención de muestras en diferentes tiempos para determinar la expresión de citocinas                 | 29 |
| 5.8. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y Condiciones de cultivo             | 30 |
| 5.9. Conteo de leucocitos y ajuste de leucocitos   | 30 |
| 5.10. Estimulación <i>in vitro</i> de linfocitos con los antígenos recombinantes                           | 30 |
| 5.11. Aislamiento de RNA. Técnica de TRizol  | 31 |
| 5.12. . Condiciones óptimas de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) | 31 |
| 5.13. Empleo del IFN- $\gamma$ bovino recombinante utilizado como inmunomodulador                          | 33 |
| 5.14. Características de la vacuna BCG <i>M. bovis</i> empleada  | 33 |
| 5.15. Obtención de extractos proteicos de filtrado de cultivo (CFPE) de <i>M bovis</i> y <i>M. avium</i>   | 34 |
| 5.16. Preparación del inóculo bacteriano para el desafío intratraqueal                                     | 34 |
| 5.17 Desafío   | 35 |
| 5.18. Inspección post-mortem   | 35 |
| 5.19. Análisis estadístico   | 36 |
| 6. RESULTADOS  | 38 |
| 6.1. Animales de estudio (bovinos).  | 38 |
| 6.2. Determinación de IFN- $\gamma$  | 38 |
| 6.3. Expresión de citocinas por grupo y por muestreo   | 41 |
| 6.3.1. Primer muestreo.  | 41 |
| 6.3.2 Segundo muestreo   | 48 |
| 6.3.3. Tercer muestreo   | 52 |
| 6.4. Inspección post-mortem  | 57 |
| 7.DISCUSIÓN  | 58 |
| 8. CONCLUSIONES  | 62 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA  | 63 |
| 10. APENDICE   | 73 |
| 11.ABREVIATURAS  | 75 |
| INDICE DE CUADROS Y FIGURAS  |    |
| FIGURAS  |    |
| Figura 6.2.1. Gráfica de resultados de IFN- $\gamma$ del 1er muestreo                                      | 39 |
| Figura 6.2.2. Gráfica de resultados de IFN- $\gamma$ del 2º muestreo                                       | 40 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 6.2.3. Gráfica de resultados de IFN- $\gamma$ del 3er muestreo  | 41 |
| Figura 6.3.1. Gel de productos de amplificación de la PCR. $\beta$ -actina   | 42 |
| Figura 6.3.2. Gel de productos de amplificación de la PCR. IFN- $\gamma$   | 42 |
| Figura 6.3.3. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-2  | 43 |
| Figura 6.3.4. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-4  | 44 |
| Figura 6.3.5. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-10   | 44 |
| Figura 6.3.1.1. Resultados de la expresión de citocinas del grupo control 1er muestreo   | 45 |
| Figura 6.3.1.2. Resultados de la expresión de citocinas del grupo BCG 1er muestreo   | 46 |
| Figura 6.3.1.3. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE 1er muestreo  | 47 |
| Figura 6.3.1.4. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE-IFN- $\gamma$ 1er muestreo  | 48 |
| Figura 6.3.2.1. Resultados de la expresión de citocinas del grupo control 2º muestreo  | 49 |
| Figura 6.3.2.2. Resultados de la expresión de citocinas del grupo BCG 2º muestreo  | 50 |
| Figura 6.3.2.3. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE 2º muestreo   | 51 |
| Figura 6.3.2.4. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE- IFN- $\gamma$ 2º muestreo  | 52 |
| Figura 6.3.3.1. Resultados de la expresión de citocinas del grupo control 3er muestreo   | 53 |
| Figura 6.3.3.2. Resultados de la expresión de citocinas del grupo BCG 3er muestreo   | 54 |
| Figura 6.3.3.3. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE 3er muestreo  | 55 |
| Figura 6.3.3.4. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE- IFN- $\gamma$ 3er muestreo   | 56 |
| <b>CUADROS</b>   |    |
| Cuadro 1.2.1. Clasificación de las micobacterias de crecimiento lento  | 5  |
| Cuadro 1.2.2. Especies micobacterianas y animales que son afectados  | 6  |
| Cuadro 5.2. Esquema de tratamientos  | 24 |
| Cuadro 5.3. Diagrama de flujo de tratamientos y obtención de muestras  | 25 |
| Cuadro 5.12. Secuencia de los iniciadores empleados, tamaño del fragmento amplificado para las diferentes citocinas de origen bovino y programas empleados | 32 |
| Cuadro 6.2.1. Gráfica de resultados de IFN- $\gamma$ del 1er muestreo  | 39 |
| Cuadro 6.2.2. Gráfica de resultados de IFN- $\gamma$ del 2º muestreo   | 40 |
| Cuadro 6.2.3. Gráfica de resultados de IFN- $\gamma$ del 3er muestreo  | 41 |
| Cuadro 6.3.1.1. Resultados de la expresión de citocinas del grupo control 1er muestreo   | 45 |
| Cuadro 6.3.1.2. Resultados de la expresión de citocinas del grupo BCG 1er muestreo   | 46 |
| Cuadro 6.3.1.3. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE 1er muestreo  | 47 |
| Figura 6.3.1.4. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE-IFN- $\gamma$ 1er muestreo  | 48 |

|  |    |
|--|----|
| muestreo   |    |
| Cuadro 6.3.2.1. Resultados de la expresión de citocinas del grupo control 2º muestreo              | 49 |
| Cuadro 6.3.2.2. Resultados de la expresión de citocinas del grupo BCG 2º muestreo                  | 50 |
| Cuadro 6.3.2.3. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE 2º muestreo                 | 51 |
| Cuadro 6.3.2.4. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE- IFN- $\gamma$ 2º muestreo  | 52 |
| muestreo   |    |
| Cuadro 6.3.3.1. Resultados de la expresión de citocinas del grupo control 3er muestreo             | 53 |
| Cuadro 6.3.3.2. Resultados de la expresión de citocinas del grupo BCG 3er muestreo                 | 54 |
| Cuadro 6.3.3.3. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE 3er muestreo                | 55 |
| Cuadro 6.3.3.4. Resultados de la expresión de citocinas del grupo CFPE- IFN- $\gamma$ 3er muestreo | 56 |
| muestreo   |    |
| Cuadro 6.4 . Resultados a la necropsia de la distribución de lesiones tuberculosas microscópicas   | 58 |

## RESUMEN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, producida principalmente por *Mycobacterium bovis*; que guarda importancia por el riesgo que representa para la salud humana y por los efectos negativos que ocasiona a la industria pecuaria. El desarrollo de una inmunidad protectora contra la tuberculosis, se favorece por la estimulación de linfocitos T específicos productores de IL-2 e IFN- $\gamma$ , conocidos como Th1; no obstante, la coexistencia y magnitud de activación de linfocitos Th2, productores de IL-4 e IL-10 posee influencia negativa en la regulación de la respuesta de linfocitos Th1, por tanto, la cinética de transcripción de los diferentes y principales mediadores de estas poblaciones celulares provee una ventana para evaluar la respuesta inmune no solo durante el desarrollo de la tuberculosis, sino también en la evaluación de vacunas contra la enfermedad. A este respecto, existe evidencia de que la vacuna viable BGG y las proteínas presentes en el filtrado de cultivo de *M. bovis* contienen antígenos relevantes capaces de inducir una respuesta inmune protectora, misma que es posible incrementar con la aplicación exógena de IFN- $\gamma$ , por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de la vacuna BCG y del extracto proteico de cultivo (CFPE) de *M. bovis*, así como el efecto inmunomodulador del IFN- $\gamma$ , en bovinos vacunados mediante el análisis de expresión de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10) por medio de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para lo cual se utilizaron 24 becerras Holstein de 8-12 meses de edad negativas a las pruebas de diagnóstico de TB (tuberculina, IFN- $\gamma$ , ELISA y PCR), divididas en cuatro grupos. El primer grupo represento el grupo control; el segundo, se vacuno con BCG; el tercero, con CFPE y el cuarto, con CFPE más IFN- $\gamma$ . Seis meses después de la vacunación los animales se desafiaron intratraquealmente con una cepa de campo de *M. bovis* a una dosis de  $10^4$  UFC. Los animales se sacrificaron humanitariamente seis meses después para realizar una inspección postmortem. La respuesta inmune celular de los diferentes grupos se monitoreo y evaluó mediante la producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de leucocitos estimulados con PPD bovis y los antígenos purificados de *M. bovis* BCG el Dip Z y el complejo 45-47, seleccionados por su capacidad para inducir una importante respuesta celular, además se estimularon células con el mitógeno concanavalina (Con A). Los sobrenadantes de los diferentes cultivos se colectaron a las 72 h para evaluar la producción de IFN- $\gamma$  mediante un ensayo de ELISA. Por otro lado, se extrajo el RNA de los mismos cultivos celulares para determinar la expresión de las citocinas por RT-PCR, empleando iniciadores específicos para cada una de ellas, teniendo como control positivo interno el gen de la  $\beta$ -actina. La expresión de las citocinas fue considerada como la intensidad relativa de las bandas que correspondieron a los productos de amplificación comparando con la intensidad del producto de la  $\beta$ -actina, utilizando el programa LabsWorks 4.0. De acuerdo a los resultados la mayor producción de IFN- $\gamma$  se observó en los cultivos celulares del grupo vacunado con BCG principalmente con los antígenos purificados mas que con el PPD bovis días antes del sacrificio; una respuesta similar se observó en el grupo vacunado con CFPE con el antígeno 45-47. Mediante el análisis semicuantitativo del RT-PCR se determinó que las células del grupo vacunado con BCG presentó una expresión importante de IFN- $\gamma$  con PPD bovis y Dip Z cuatro meses después de la vacunación, mientras que las expresión de ésta citocina fue prácticamente nula en los otros grupos vacunados. En tanto que, el grupo vacunado con CFPE + IFN- $\gamma$  presentó una expresión significativa de IL-4 en el mismo periodo evaluado. Seis meses después del desafío la expresión de IFN- $\gamma$  fue significativa en los diferentes grupos a excepción del grupo vacunado con CFPE, correspondiendo entonces a un patrón de respuesta tipo Th1. No obstante, en el grupo vacunado con CFPE + IFN- $\gamma$  fue observable una expresión importante de IL-10 conjuntamente con IFN- $\gamma$ , coexistiendo en este grupo ambos tipo de respuesta Th1 y Th2. Las lesiones se localizaron principalmente en los linfonódulos cervical profundo, retrofaríngeos y mediastínicos para los diferentes grupos, siendo mas extensas en el grupo control que en los grupos vacunados, por lo que la vacunación con BCG y CFPE podrían ser consideradas como herramientas para el control y erradicación de la tuberculosis bovina.

## SUMMARY

Bovine tuberculosis (TB) is an infectious-contagious disease, produced mainly by *Mycobacterium bovis*; it is important due the risk that represents for human health and for the negative effects that causes to the cattle industry. The development of a protective immunity against the tuberculosis, is favored by the stimulation of specific Th1 lymphocytes, producers of IL-2 and IFN- $\gamma$ ; however, the coexistence and magnitude of activation of Th2 lymphocytes, producers of IL-4 and IL-10 have negative influence in the regulation of the response of Th1 lymphocytes. Therefore, the kinetics of transcription of the different mediators of these cellular populations provide a window to evaluate the immune response not only during the development of tuberculosis, but also in the evaluation of vaccines against the disease. In this respect, evidence exists that BGG and the proteins present in the culture filtrate of *M. bovis* contain relevant antigens, able to induce a protective immune response, same that is possible to increase with the exogenous application of IFN- $\gamma$ . Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effectiveness of the BCG vaccine and the protein extract of culture filtrate (CFPE) of *M. bovis*, as well as the immunomodulator effect of the IFN- $\gamma$ , in vaccinated bovines through the analysis of the expression of cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10) by means of the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). For which 24 Holstein yearling calves of 8-12 months of age, negative to the tests for TB diagnosis (tuberculin, IFN- $\gamma$ , ELISA and PCR), were divided in four groups. Group 1 constitutes the group control; group 2 was vaccinated with BCG; group 3, with CFPE and group 4 was vaccinated with CFPE and IFN- $\gamma$ . Six months after the vaccination the animals were challenged in intratracheal way with  $10^4$  UFC of a field strain of *M. bovis*. The animals were sacrificed six months later and postmortem inspection was carried out. The cellular immune response of the different groups were evaluated by means of the production of IFN- $\gamma$  in cultures of leukocytes stimulated with PPD bovis and purified antigens of *M. bovis*: BCG, DIP Z and complex 45-47, selected by their capacity to induce an important cellular response; in addition cells were stimulated with the mitogen concanavalin A. The supernatants of the different 72 cultures were collected to evaluate the production of IFN- $\gamma$  by means of an ELISA test. On the other hand, the RNA of such cellular cultures was extracted to determine the expression of the cytokines by RT-PCR, using specific primers for each one of them, and as internal positive control the  $\beta$ -actine gene. The expression of the cytokines was considered like the relative intensity of the bands that corresponded to amplification products comparing with the intensity of the product of  $\beta$ -actine, using the program LabsWorks 4.0. According to the results, the greater production of IFN- $\gamma$  was observed mainly in the cellular cultures of the group vaccinated with BCG and stimulated with the purified antigens rather than with PPD bovis, days before the sacrifice. A similar response was observed in the group vaccinated with CFPE and stimulated with the antigen 45-47. By means of the semiquantitative analysis of the RT-PCR it was determined that the cells of the group vaccinated with BCG bovis displayed an important expression of IF- $\gamma$  with bovine PPD and DIP Z four months after the vaccination, whereas the expression of this cytokine was practically null in the other vaccinated groups. The group vaccinated with CFPE + IFN- $\gamma$  presented a significant expression of IL-4 in the same evaluated period. Six months after the challenge IFN- $\gamma$  expression was significant in the different groups with the exception of the group vaccinated with CFPE, corresponding then to a Th1 type response. However, in the group vaccinated with CFPE + IFN- $\gamma$  an important expression of IL-10 jointly with IFN- $\gamma$  was observable, coexisting in this group both type of immune responses, Th1 and Th2. The injuries were located mainly in the cervical deep, retropharyngeal and mediastinum lymph nodes for the different groups, being more extensive in the group control that in the vaccinated groups; therefore the vaccination with BCG and CFPE could be considered like tools for the control and eradication of the bovine tuberculosis.

## 1. INTRODUCCION

La tuberculosis bovina (TB), es una de las más importantes enfermedades zoonóticas a nivel mundial y por lo tanto representa un serio problema de salud pública, además de causar graves pérdidas económicas en gran parte del mundo en la industria ganadera (Morris *et al.*, 1994). Los casos documentados de tuberculosis en humanos, ocasionada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), han ido incrementando en las últimas décadas en los hospitales (Bouvet *et al.*, 1993). Para poder reducir la incidencia de TB, algunos países han implementado programas de control y erradicación, basados principalmente en la realización de la prueba de intrademostración (ID) y el posterior sacrificio de los animales en caso de ser positivos, pero constantemente se buscan alternativas que permitan el control, sin que represente el sacrificio del ganado, por lo que hoy día se busca desarrollar alternativas, entre ellas una vacuna que a largo plazo logre controlar la enfermedad (Millian *et al.*, 2003). Es por ello que el estudio de la estructura molecular del *Mycobacterium sp* en los últimos años se ha desarrollado y a través de métodos biotecnológicos se estudia la identificación y la caracterización funcional de los productos de los genes para poder entender los mecanismos de patogénesis, por los cuales el *Mycobacterium* causa infección, así mismo se han logrado purificar y analizar algunas proteínas, que representan la oportunidad de ser consideradas como antígenos y por lo tanto son estimados como altamente potenciales para el diagnóstico de la tuberculosis (Espitia, *et al.*, 1992). Sin embargo es importante recalcar que estos estudios se han realizado con especies de *Mycobacterium* que no son patógenas, pero que los productos de expresión de los genes, son similares a las proteínas de *M. tuberculosis* (Torres, *et al.*, 2001). Se sabe que para que se lleve a cabo la respuesta inmune en el individuo, son necesarios la participación de múltiples antígenos, lo que lleva a analizar la mayor cantidad posible de ellos, para poder en un futuro desarrollar un método de diagnóstico y una vacuna eficaz (Colangeli, *et al.*, 1998). En la actualidad estas alternativas van enfocadas a la investigación sobre aquellos antígenos que son identificados como propios de la vacuna de *M. bovis* BCG y que puedan ser distinguibles de aquellos propios del *M. bovis* causante de la TB (Bedwel *et al.*, 2001). Entre los antígenos más estudiados están: 38 kDa, PE-PGRS, ESAT-6, Dip-z, complejo 45-47, cada uno por su lado envían señalizaciones al interior del sistema inmune para activar una respuesta de tipo protectora, que tratándose de un microorganismo intracelular como *M. bovis*, la respuesta ideal es de tipo celular, y de la cual se estima la expresión de moléculas llamadas citocinas y que van a favorecer la activación de linfocitos específicos (Buddle *et al.*, 2001). Estas citocinas dependiendo del estadio de la enfermedad son el resultado de la estimulación y activación de linfocitos Th1 o Th2, ya sea interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2), para el primer caso, IL-4 e IL-10 en el segundo caso (Mosmann y Coffman, 1989).



Se han logrado desarrollar vacunas a nivel de laboratorio, que contienen uno o varios antígenos, y al realizar su evaluación provocan la secreción de valores altos de citocinas que protegen contra la enfermedad, como IFN- $\gamma$  e IL-2, el inconveniente es que interfieren con el método de diagnóstico convencional, por lo que se busca hoy en día una vacuna que pueda ser usada para controlar la enfermedad, que no interfiera con el diagnóstico y que su aplicación en los animales sea práctica (Skinner, *et al.*, 2001).

### 1.1. Historia de la tuberculosis bovina

Cuando el hombre era nómada, vivía aisladamente, y la presentación de la tuberculosis era de forma esporádica, por lo que en esta etapa no representaba alto riesgo para otros grupos, sin embargo cuando se empezó a desarrollar la agricultura y la domesticación, el hombre se hizo sedentario, y la enfermedad comenzó a presentarse con mayor frecuencia, en comparación con la etapa anterior, sin dejar de ser su aparición ocasional. Hoy día se sabe que los primeros en ser afectados por esta enfermedad fueron los animales, por *M. bovis*, y posteriormente el humano, antecedidos por primates (Morris *et al.*, 1985). Conforme fueron creándose asentamientos humanos, la diseminación de la enfermedad fue gradual al mismo tiempo que la densidad poblacional. Primero por los viajes de reconocimiento de nuevos territorios y la apertura del comercio, la diseminación se hizo evidente. Hacia el siglo XVI se le consideró una enfermedad altamente contagiosa (Rastogi *et al.*, 2001). Entre 1700 y 1800 la prevalencia de la tuberculosis, alcanzó niveles máximos tanto en Europa Occidental como en Estados Unidos, lo que provocó numerosas muertes, acrecentándose con el inicio de la Revolución Industrial en 1780, donde no solo se presentaban muertes, sino también incapacidades (Kochl, 1991). Esto contribuyó a que la enfermedad se extendiera al resto del mundo, que años después provocó innumerables muertes (Bloom, 1994).

Se tienen datos de que algunas momias encontradas en Egipto con edad de hace 3,000 años murieron a causa de tuberculosis, por el hallazgo de representaciones de barro y pinturas, que muestran deformaciones óseas características de la tuberculosis; en momias del Perú de hace 700 DC se ha hecho evidente la presencia de la enfermedad, al encontrar tuberculosis pulmonar y la presencia del bacilo ácido resistente. En Europa, surgió la alerta cuando se desarrolló una epidemia llamada "La plaga blanca", lo que provocó que se tomaran medidas medioambientales. En la India, la enfermedad era muy rara en la primera mitad del siglo XIX. (Morris *et al.*, 1985).

La enfermedad en el ganado fue descrita por vez primera por Columella en el norte de Italia en el siglo XIV. Los anatomistas italianos A.M. Valsalva y G.B. Morgani, en el siglo XVII, se preocupaban por el alto riesgo de contagio de la tuberculosis, pero hasta 1865 el veterinario francés Jean Antoine Villemin, comprobó esta teoría, a través de la infección de conejos, con exudado de

lesiones de humanos. A principios del siglo XIX los trabajos de los médicos franceses Gaspard Laurent Bayle y René Laënc establecieron las formas y estadios de la tuberculosis como enfermedad; ambos fallecieron por su causa. Hasta 1882 Koch, aisló el *M. tuberculosis* identificándolo como agente causal de la tuberculosis en humanos y en 1891 realizó la preparación de la tuberculina, posteriormente en 1902 Smith describió el *M. bovis* como patógeno causal de la tuberculosis en bovinos. De 1908 a 1920, Calmette y Guérin usaron un medio de cultivo específico para disminuir la virulencia del bacilo *M. bovis* dando la pauta para el desarrollo de la vacuna de Calmette- Guérin (BCG), usada por vez primera en 1921 hasta hoy en día, solo en humanos y experimentalmente en animales (Marchal, 1992).

Diversos países han podido controlar y/o erradicar la enfermedad, a través de las pruebas de diagnóstico y programas de sacrificio de animales reactivos a la tuberculina, sin embargo la presencia de la TB pasa desapercibida en muchos países. Algunos animales de vida silvestre son reservorios y por lo tanto diseminan el *M. bovis* al ganado, por lo que la erradicación es considerablemente difícil (Bloom y Murray, 1992).

En los países industrializados la tuberculosis, ha dejado de constituir un problema desde hace tiempo, no siendo el mismo caso para países en desarrollo, donde la prevalencia anual se estima de aproximadamente 4 millones de casos clínicos, de los cuales el 25% desencadenan en muerte. Anualmente esta enfermedad es responsable de la muerte de 2 millones de personas (incluidas las personas infectadas con el VIH), siendo las regiones más afectadas el África subsahariana, el sureste de Asia y Europa del Este, teniendo en cuenta que la tuberculosis en humanos por *M. bovis* contribuye importantemente en el ciclo de la tuberculosis en bovinos en estos continentes (Daborn et al., 1993). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, si el control de la enfermedad no mejora, entre el 2002 y el 2020, alrededor de 1.000 millones de personas en el mundo se infectarán, 150 millones contraerán la enfermedad y 36 millones morirán como consecuencia de esta enfermedad, tanto por cepas de *M. tuberculosis* y algunos por *M. bovis* (Casal, 1998).

A pesar de que esta enfermedad es muy antigua, y con el previo conocimiento de los graves efectos sobre la salud pública y la producción animal, no fue sino hasta principios del siglo XX, cuando se le puso atención a estos factores de riesgo. En Alemania e Inglaterra hasta el 50% del ganado lechero presentaba lesiones tuberculosas en la inspección post-mortem en el momento del sacrificio y el suministro de leche contaminada con *M. bovis* producía infección tuberculosa primaria sobre todo en niños y más del 20% de los casos de tuberculosis infantil era debida al *M. bovis* en estos países (Kochi, 1991).

## 1.2. Agente etiológico de la tuberculosis bovina

El género *Mycobacterium* es el mayormente definido y estudiado en Microbiología, causante de diversas variantes de tuberculosis en humanos y animales. Son organismos sin esporas que contienen arabinosa y galactosa en la pared celular (Kissane, 1985; Chapman, 1997). El *M. bovis*, es una bacteria intracelular que es capaz de sobrevivir y persistir dentro de las células mononucleares, este microorganismo tiene la capacidad de evadir la respuesta destructiva de los macrófagos, escapando de ella y manteniéndose dentro de ellos (Stenger y Modlin, 2002). Conserva una característica importante, el ser carente de motilidad, con morfología bacilar y considerarse como aeróbico (Rastogi et al., 2001). Este microorganismo crece mejor en medio Lowenstein-Jensen's, y para su aislamiento el medio Middlebrook's 7H10 en combinación con el anterior. Para el crecimiento de *M. bovis*, son necesarias algunas semanas para poder ver las colonias en el medio, ya que se les considera de crecimiento lento, además de necesitar una temperatura de 33 a 39°C (Collins et al., 1985).

La micobacteria es un bacilo ácido-alcohol resistente caracterizado por una pared celular rica en cera, constituida por una larga cadena de ácidos grasos, como ácidos micólicos, glicolípidos como lipoarabinomanana (LAM), glicolípidos peptídicos y fenólicos, sulfolípidos y otros; además la pared también es rica en polisacáridos principalmente peptidoglicanos y arabinogalactanos (Kaufmann y Hess, 2000, Jumperz y Brenner, 2001). La hidrofobicidad de la pared celular no solo es responsable de que la micobacteria sea considerada como ácido-resistente, sino que además la hace resistente al complemento, a químicos ácidos, alcalinos o a desinfectantes, tal vez la mayor importancia recae en que promueve la replicación micobacteriana dentro de los fagosomas de los macrófagos, por medio de señalizaciones, evitando la maduración del fagosoma y por consiguiente la fusión con lisosomas, con esto la micobacteria puede sobrevivir por largos periodos dentro de los macrófagos (Kaufmann y Hess, 2000). Se tiene conocimiento de que la envoltura celular de la micobacteria le permite adaptarse para poder crecer intracelularmente, adherirse a los macrófagos del huésped y poder obtener los nutrientes necesarios de las células huésped, así como inhibir las propiedades microbicidas de este, controlar la muerte de las células infectadas y conferir resistencia a los antibióticos. (Rastogi et al., 2001). En los últimos años a través de inmunocitoquímica y con ayuda de la microscopía electrónica, se ha podido identificar una estructura llamada cápsula, que no solo contribuye con la envoltura celular a crear una barrera permeable, sino que también la protege de la actividad microbicida de los macrófagos al igual que la envoltura celular (Rastogi, 1993). El estudio de la estructura de la envoltura celular, la biosíntesis y la localización de los antígenos en la pared celular, son de gran ayuda para poder definir el papel que juegan las moléculas de superficie, en la resistencia general del microorganismo. Ahora bien,

es sabido hoy día que esta estructura capsular, solo la contienen las especies patógenas de *Mycobacterium* pero no así las no patógenas (Rastogi *et al.*, 2001).

El *M. bovis*, afecta principalmente a los animales, y esta incluido dentro del complejo conocido como *M. tuberculosis*, (Cuadro 1.2.1.) el cual incluye a las especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*, así como una variante de *M. tuberculosis*, conocida como *M. canetti*, *M. bovis* afecta principalmente ganado bovino, ovejas, cabras y ciervos, y otros hospedadores que pueden ser: tejones, zarigüeyas y otros marsupiales, liebres europeas, primates, elefantes, caballos, cerdos y camellos (Rastogi *et al.*, 2001); sin embargo otras especies micobacterianas infectan a una gran variedad de especies animales, por lo que son de importancia para la Salud Animal (Chávez, 1993, Thoen, 1994) (Cuadro 1.2.2.).

**CUADRO 1.2.1. CLASIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO LENTO.**

|  |   |
|--|---|
| COMPLEJO <i>M. tuberculosis</i>                      | <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> ,<br><i>M. microti</i> y <i>M. canetti</i> . |
| COMPLEJO <i>M. leprae</i>                            | <i>M. leprae</i> y <i>M. leprae-murium</i>  |
| COMPLEJO <i>M. avium</i><br>(micobacterias atípicas) | <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> y <i>M. xenopi</i>   |

CUADRO 1.2.2. ESPECIES MICOBACTERIANAS Y ANIMALES QUE SON AFECTADOS

| GENERO <i>Mycobacterium</i>                   | ANIMALES AFECTADOS   |
|---|--|
| <i>M. bovis</i>                               | Bovinos, borregos, perros, gatos, monos, simios, primates (hombre), cerdos, elefantes, rinocerontes, aves, venados, zorros, tapires, camellos, bisontes, llamas, elefantes marinos, zariguellas y jirafas. |
| <i>M. tuberculosis</i>                        | Bovinos, monos, simios, primates (hombre), cerdos, perros, tapires y elefantes.  |
| <i>M. leprae, M leprae-murium</i>             | Gatos, ratas y ratones.  |
| <i>M. leprae</i>                              | Armadillo y humano.  |
| <i>M. fortuitum</i>                           | Perros, vacas y cerdos.  |
| <i>M. marinum</i>                             | Peces y sapos  |
| <i>M. kansasii</i>                            | Monos, vacas y cerdos  |
| <i>M. chelonae</i>                            | Cerdos y manatíes  |
| COMPLEJO <i>M. avium</i> Subs. <i>avium</i>   | Pollos, pájaros y cerdos   |
| <i>M. avium</i> Subs. <i>silvaticum</i>       | Paloma torcaz y ciervo.  |
| <i>M. avium</i> Subs. <i>paratuberculosis</i> | Bovinos, ovinos, caprinos y rumiantes animales silvestres  |

### 1.3. Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública

La TB representa un grave problema de salud pública, causando graves pérdidas económicas en la producción de ganado bovino en diversas partes del mundo (Amadori *et al.*, 1998). En Europa el control de la TB se ha basado en la realización de la prueba de la tuberculina y el posterior sacrificio de animales enfermos, conjuntamente con la implementación del método de la pasteurización de la leche para consumo humano; en algunos países es considerada como la causa de tuberculosis en humanos, en un porcentaje que va de 1 a 4.3% (Cosivi *et al.*, 1998,

Ashford *et al.*, 2001). En Canadá fue identificada TB en ciervos, constituyéndose un grave problema en la década de los 90's, a mediados de la misma década en Estados Unidos la prevalencia de TB en los hatos se estimó en 0.003%; en Australia y Nueva Zelanda se considera a las zarigüeyas como los principales vectores de tuberculosis que infectan los hatos de ganado en las granjas y en América Latina y el Caribe aproximadamente el 75% de la población bovina tiene una alta prevalencia de TB, lo que representa un gran riesgo de contagio para el hombre (Rastogi *et al.*, 2001).

En el caso particular de México, el control de la TB, se encuentra a cargo de la Dirección General de Salud Animal, que es una dependencia de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA), la cual hace mención de la prevalencia a nivel nacional de TB en ganado de leche de 11.1% y en ganado de carne de 2.9%. En el año 2002 los censos ganaderos indicaban 30,702,115 cabezas de ganado bovino, de los cuales el 10% correspondían a bovinos especializados para la producción de leche y el 90%, a bovinos especializados para la producción de carne, por lo que resulta de suma importancia tomar medidas sobre esta enfermedad. En el mismo año, el servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria (SENASICA), informó los casos y focos reportados en bovinos y humanos, en el caso de bovinos se presentaron 2258 focos con 3286 casos en total, y en el caso de humanos se presentaron 15,622 casos pero se desconoce cuantos de estos problemas fueron causados por *M. bovis* (SENASICA, 2002).

La TB solo se encuentra en etapa de erradicación en 7 estados del país, principalmente en los estados del norte del país y actualmente en la península de Yucatán, en el resto del país se encuentra en etapa de control sanitario (SENASICA, 2002), lo que resulta en tomar medidas sanitarias eficientes para evitar la diseminación, en los hatos ganaderos y al mismo tiempo evitar la propagación en los humanos, sin embargo existen por otro lado factores que determinan el recrudescimiento de esta enfermedad en los humanos, como los son: las infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), la presencia de los albergues en las ciudades, la aparición de cepas multiresistentes y una infraestructura de salud pública insuficiente (Casal, 1998).

Es importante tomar en cuenta que no solo la transmisión de la TB es de los animales hacia el hombre, sino también vía hombre-animal, a finales de los años 60's y principios de los 70's en Alemania *M. bovis*, aislado de humanos fue responsable de infectar a establos bovinos, por lo que fue considerado un índice de 18% en los casos de transmisión de tuberculosis del hombre hacia los animales (Lisslie, 1968), en comparación de la transmisión de los animales, hacia el hombre, que va de 6 a 30% (Karlson, y Carr, 1970) sin embargo en Europa y América del Norte este índice va de 0.5 a 1.0 %. En países de mayor prevalencia de TB y donde la pasteurización no es una práctica rutinaria se estima de 10 a 15% los casos de tuberculosis causados por *M. bovis*. (Ashford *et al.*, 2001).

Es por ello que en las campañas de control y erradicación de la tuberculosis en bovinos, se abarcan factores anteriormente descritos que determinan; el riesgo que existe para la salud humana primordialmente, así como el establecimiento de medidas tanto para la exportación de ganado, como para los productos que se derivan de estos y el comportamiento del número de cabezas para valorar su disminución del censo ganadero ( Szewzyk, *et al.*, 1995).

#### 1.4. Diagnóstico y control de la tuberculosis bovina

En la actualidad es necesario desarrollar pruebas de diagnóstico *In vivo* e *in vitro* eficientes para el control de la enfermedad. La tuberculina es un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovino), también llamado tuberculina, es un derivado de proteína purificado en un medio estéril, preparada a partir de productos de crecimiento y lisis tratados con calor de una o más cepas de *M. bovis* AN5, durante muchos años se ha utilizado como herramienta de diagnóstico en la prueba de la tuberculina en el ganado vacuno, probando así la hipersensibilidad, de tal manera que los animales positivos son sacrificados, sobre todo en países desarrollados y donde es posible tolerar la pérdida económica del animal (Rhodes *et al.*, 2000, Vondermeyer *et al.*, 2003). Sin embargo, esta posee algunos inconvenientes ya que es de 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 condiciones de campo son complejas, por un lado las fallas operacionales y el fenómeno de inmunosupresión pueden jugar un papel importante, principalmente porque la respuesta a la ID es fluctuante (*in vitro*) y está afectada por los circuitos regulatorios antígeno específicos, estos podrían suprimir la respuesta a la ID, probablemente por un mecanismo circundante. (Amadori *et al.*, 1998). Los anticuerpos producidos contra los antígenos micobacterianos han sido evaluados a través del curso de la enfermedad, sin embargo las pruebas de diagnóstico basadas en la respuesta inmune humoral por sí sola, han demostrado baja eficiencia en la detección de animales infectados con TB, ya que los perfiles de anticuerpos de animales infectados con TB y los de animales libres de TB no corresponden por la pobre eficiencia de la prueba (Amadori *et al.*, 1998 y Kayak *et al.*, 2001). En la década de los 90's se desarrolló una prueba simple y rápida para detectar bovinos tuberculosos, cuyo fundamento básico es la evaluación de la inmunidad celular mediante la detección de IFN- $\gamma$  en respuesta a un antígeno específico, en un sistema de cultivo con sangre completa, a través de una prueba de ELISA de captura (Rothel *et al.*, 1990). En otros estudios, pruebas de inmunoensayo (ELISA) de muestras de fluido broncoalveolar, esputo y cultivo positivo a tuberculosis se han podido detectar altos niveles de IFN- $\gamma$  (Prince *et al.*, 2003).

Una prueba *in vitro*, es la detección de IgG anti-micobacteria circulante, a través de la técnica de ELISA que permite determinar niveles de anticuerpos específicos, ya que se ha observado la correlación de estos con la presencia de lesiones tuberculosas, su importancia radica en que su aplicación puede llevarse a cabo en zonas de media o alta prevalencia, donde sea posible detectar animales con un estadio de enfermedad avanzada o animales anérgicos, sobre todo por manifestar concentraciones detectables de anticuerpos circulantes y que no estuvieran manifestando reacción a la tuberculina (Rittaco *et al.*, 1991; Wood, *et al.*, 1992).

La identificación del bacilo ácido-resistente por medio del microscopio, y métodos de cultivo que tardan semanas, por lo que hacen necesario desarrollar otro tipo de pruebas que hagan eficiente el diagnóstico usando como base métodos moleculares, cromatográficos e inmunológicos (Pottumarthy *et al.*, 2000). Además de estos métodos convencionales, son empleados otros métodos más vanguardistas y cortos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es un método de amplificación enzimática de DNA (Zumárraga *et al.*, 2001), el método conocido como *spoligotyping* que amplifica por PCR, una región repetitiva (DR) presente únicamente en miembros del complejo *M. tuberculosis*, entre los aislamientos de *M. bovis* de ganado y *M. tuberculosis* de humanos, identifica también la transmisión entre especies y la existencia de reservorios (Rastogi *et al.*, 2001), así como la inmunohistoquímica e hibridación entre los más estudiados e importantes (Adams, 2001; Díaz, *et al.*, 2003). En la actualidad también está cobrando auge la PCR en tiempo real, utilizada en muestras de tejido, que permite hasta la cuantificación de la carga bacteriana inicial, y cuyo principio es que a través del empleo de una sonda fluorescente, permite ser cuantificado el producto amplificado, lo que da por resultado que sea directamente proporcional a la intensidad de la fluorescencia detectada (Taylor *et al.*, 2001)

El control fundamentalmente para la TB se basa en la realización de la prueba de tuberculina y el posterior sacrificio de los animales positivos, y la implementación de guías específicas sobre movilización del ganado. El conocer que los reservorios de vida silvestre constituyen un grave problema, así como la identificación de los sitios donde se desplazan estas poblaciones, permite establecer un programa adecuado de control de acuerdo a los diversos factores que pudieran afectarlo. En algunos países se ha adoptado la vacunación en los tejones para reducir el riesgo de transmisión, sin embargo el implementar esta medida en el ganado, repercutirla en el diagnóstico (Rastogi *et al.*, 2001).

## **1.5. Vacunas contra la tuberculosis bovina**

Como en el caso de otros microorganismos que afectan diversas especies, la vacunación contra las enfermedades que causan, es un factor importante para el control de la enfermedad, por lo que la TB no debería estar exenta de esta estrategia. Hoy la única vacuna aceptada es una cepa de *M.*

*bovis* atenuada por Calmette-Guerin (BCG), importante para la prevención de esta enfermedad, utilizada solo en humanos y en algunos casos experimentales en otras especies. Preparada con bacterias vivas liofilizadas, se ha obtenido a partir de una serie de pases de una cepa virulenta atenuada de *M. bovis* (Pym et al., 2003). En la década de los 20's se observó que la BCG confería resistencia después de 30 días a partir de la inmunización con una dosis única de 50 mg 100 mg, logrando proteger al ganado de infecciones naturales y experimentales, sin embargo su efecto no es prolongado, así mismo se concluyó que la vía de aplicación intradérmica era la adecuada en comparación con otras vías; al vacunar animales recién nacidos y su posterior sacrificio se observó que estaban libres de tuberculosis (Haring et al., 1930). También se observó que a dosis de  $10^4 - 10^6$  UFC para inmunización a becerros recién nacidos inducía niveles significativos de protección contra desafíos con *M. bovis*, protegiendo al 100% contra el desarrollo de lesiones macroscópicas que cuando eran vacunados a las 6 semanas mostrando una eficacia de 90% (Lyaashchenko et al., 2004), en la actualidad las dosis altas de BCG pueden ser menos efectivas para la estimulación de una respuesta inmune protectora (Liebana et al., 2000). Aún con los antecedentes sobre la BCG el uso de la vacunación interfiere con las pruebas intradérmicas por lo que un programa para el control de la TB debe estar fundamentado en el uso de la tuberculina y el posterior sacrificio (Millian et al., 2003).

Constantemente se tiene conocimiento del desarrollo de otras vacunas derivadas de nuevas cepas atenuadas, subunidades proteicas y de DNA recombinante., las cuales han dado resultados en diversos modelos animales, como roedores y que confieren efecto similar que la BCG, sin embargo no se han dejado de lado los esfuerzos en el caracterización de genes virulentos y producción de micobacterias mutantes autotróficas. Se han probado una variedad de antígenos como posibles candidatos para elaborar una vacuna, que pudiera conferir una protección mayor y que no tenga reacción cruzada con la prueba intradérmica, y sobre todo la búsqueda en el desarrollo de una vacuna para ganado que pueda diferenciar entre animales vacunados e infectados (Skinner, et al., 2001, Buddle, et al., 2003), no obstante lo más importante aún es entender primero los procesos que intervienen en la respuesta inmune protectora, y así buscar el desarrollo de vacunas recombinantes que puedan expresar citocinas específicas como IFN- $\gamma$  e IL-2 (López-Antuñano 1997).

Los preparados de filtrado de cultivo, contienen proteínas de *M. bovis* o *M. tuberculosis*, que son potencialmente estimuladores de células T, probados en ratones y bovinos (Wedlock et al., 2000), la razón de usar estas proteínas, es porque no inducen reacción a la prueba de tuberculina y la efectividad de la vacuna no se ve influenciada por previa sensibilización de micobacterias ambientales, sin embargo la respuesta celular no es lo suficientemente fuerte en ganado si no se usa un adyuvante correcto (Buddle et al., 2003).

Es por eso que la vacunación podría ser una herramienta contra la tuberculosis en animales domésticos y sobre todo en animales de países donde existen reservorios silvestres o que no pueden costear programas clásicos de control.

## 1.6. Antígenos micobacterianos

El objetivo general por el cual se busca caracterizar los antígenos de *M. bovis*, es proporcionar una herramienta para las pruebas de diagnóstico, que sea confiable, ya que la prueba de tuberculina, que hoy día sigue siendo la principal instrumento para este fin muestra baja sensibilidad y especificidad. La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados son proteínas solubles, entre las que destacan aquellas secretadas activamente en el medio de cultivo. Se han identificado proteínas inmunodominantes de cepas vacunales, en cobayos inmunizados algunas de las cuales podrían estar ausentes en micobacterias patógenas del complejo *M. tuberculosis*. Así mismo, se ha demostrado que existen proteínas preferentemente expresadas por aislados de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en comparación con cepas vacunales (Bosio, y Orme, 1998)

Numerosas proteínas micobacterianas han sido aisladas y caracterizadas, algunas de las cuales se encuentran asociadas a la célula bacteriana y otras son secretadas al medio de cultivo, sin embargo su purificación se ha hecho difícil, por lo que algunos estudios se han enfocado a desarrollar y caracterizar anticuerpos monoclonales, así como a determinar su papel en la respuesta inmunológica, sobre todo a aquellos que sean específicos para la diferenciación leucocitaria en los rumiantes (Park *et al.*, 2000), esto apoya a que en la actualidad se conozca la existencia de antígenos micobacterianos, de choque térmico y de tipo proteico que son potencialmente estimulantes para ciertas poblaciones celulares como las células T  $\gamma\delta$  (Smyth *et al.*, 2001). Los antígenos específicos que evocan la inmunidad protectora por los linfocitos Th1, aún no son completamente conocidos, sin embargo, se ha observado que las micobacterias vivas, son más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, comparada con las preparaciones de micobacterias muertas (Haslo *et al.*, 1995). Existen además proteínas secretadas de bajo peso molecular, que no son producidas por la cepa vacunal BCG, pero sí por cepas virulentas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, en las cuales se ha observado, la capacidad de ser reconocidas en las fases tempranas de la infección y son los principales blancos de las diferentes poblaciones de células T, capaces de inducir una elevada producción de IFN- $\gamma$ , lo que les permite continuar su estudio para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico y como antígenos potenciales para nuevas vacunas, como el caso del ESAT-6 (Pollock y Andersen, 1997)

La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados son proteínas solubles, secretadas principalmente en el medio de cultivo, otras son inmunodominantes presentes en cepas vacunales solamente y otras solamente se encuentran en aislados de *M. tuberculosis* o *M. bovis* (Bosio y

Orme, 1998). Pese a lo anterior se ha observado que las micobacterias vivas, son más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, en comparación con las micobacterias muertas, por lo que los extractos proteicos de filtrado de cultivo (CFPE's) micobacterianos, producidos por el metabolismo activo bacteriano, son esenciales para la inducción de una inmunidad protectora. Al ser caracterizadas recientemente las proteínas CFPEP17, CFPEP20, CFPEP21, CFPEP22, CFPEP25 y CFPEP28, se observó que son capaces de estimular la producción de IFN- $\gamma$  en cantidades significativas e inducir una fuerte respuesta celular (Weldingh et al., 1998).

El antígeno MPB70, es uno de los principales componentes del CFPE de *M. bovis*, es una proteína, altamente específica de especie y capaz de inducir una inmunidad celular, a través de una respuesta proliferativa y producción de anticuerpos en animales infectados por *M. bovis* además de ser un componente activo del PPD bovino (Hewinson y Russell, 1993). Existen proteínas de bajo peso molecular, que no son producidas por la cepa vacunal BCG, pero sí por cepas virulentas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*, que son capaces de inducir una elevada producción de IFN- $\gamma$ , a través de la estimulación de células T, como la ESAT-6 (Pollock y Andersen, 1997).

Muchos de los antígenos micobacterianos probados han llegado a inducir la producción de IFN- $\gamma$  en la prueba de tuberculina en piel, con los respectivos antecedentes de que la producción de esta citocina es sumamente importante para el desarrollo de inmunidad protectora contra la micobacteria en modelos en ratones, humanos y bovinos (Smyth et al., 2001). Se han sugerido una mezcla de antígenos, antígenos individuales, que deberían ser usados para inmunodiagnóstico de TB (Rastogi et al., 2001).

Uno de los antígenos ampliamente estudiado y descrito en *M. bovis*, es la proteína MPB70, la cual exhibe una alta especificidad de especie y ha demostrado ser un antígeno inmunodominante, capaz de inducir una inmunidad celular, estimular una respuesta linfoproliferativa e inducir la producción de anticuerpos en animales infectados por *M. bovis*, esta es una de los principales componentes del filtrado de cultivo de *M. bovis* y se considera parte del componente activo del PPD bovino (Hewinson y Russell 1993), pero al ser comparado con el antígeno MPB83 no se observa el mismo camino de respuesta, aunque sí una similitud a que se caracteriza por evocar una respuesta de células CD4+ y la consecuente producción de IFN- $\gamma$ , así como por la producción de IgG1, el antígeno MPB70, (Fine y Vynnycky, 1998, Vondermeier et al., 2000.).

De hecho se podría hablar de algunos productos micobacterianos más caracterizados como la lipoproteína 19 kDa tiene varios efectos pro y antibacterianos en los macrófagos, que pueden inducir a la apoptosis celular, baja regulación de MHC de clase II y desencadenar actividad contra la micobacteria, esta lipoproteína 19kDa ha sido identificada como el mejor activador de la inducción a la producción de IL-12 (Stenger y Modlin, 2002).

El antígeno Dip-2 que está caracterizado como una lipoproteína, es expresada en *M. bovis* BCG en bajos niveles, de la cual se conoce que es importante para el desarrollo de inmunidad celular y humoral durante la infección de la micobacteria (Juárez *et al.*, 2001); así mismo se encuentra el complejo 45-47 kDa que es una glicoproteína que induce fuerte respuesta celular y humoral, es obtenida del medio de cultivo de *M. bovis* y que presenta reactividad cruzada con los antígenos de 50-55 kDa de *M. tuberculosis* (Espitia *et al.*, 1995).

Otros antígenos que se derivan del *M. bovis* y se han probado como: hsp65, Ag85A, Ag85B, PstS-3, y 38 kDa, no han conferido una respuesta aceptable (Venkataprasad *et al.*, 1999, Vondermeier *et al.*, 2000, Wilkinson *et al.*, 2000,). Con lo anterior se muestra que dependiendo del antígeno producido por la micobacteria será el tipo de respuesta esperada, ya sea en beneficio a la resolución de la enfermedad, o caso contrario, al desarrollo de la misma.

## 1.7. Patogénesis de la tuberculosis bovina

La principal vía de transmisión de la TB es la aerógena, diseminándose un pequeño número de bacilos, después de que el bacilo es inhalado se aloja en vías aéreas pulmonares y en los macrófagos alveolares que finalmente son infectados al fagocitar a los bacilos (Lawn *et al.*, 2002, Prince *et al.*, 2003). La exposición de bovinos con aerosoles de *M. bovis*, es considerada la ruta más frecuente de infección y 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* desarrollan frecuentemente focos primarios en tejido asociado a intestino (GALT) (Thoen y Steele, 1995).

La tuberculosis primaria en un inicio es asintomática, sin embargo conforme cursa la enfermedad se va observando debilidad gradual, así como pérdida de la condición corporal del animal, que se ve reflejada en la producción, por lo que es importante realizar un ordenamiento cronológico de los eventos inmunológicos para poder entender la enfermedad. (Prince *et al.*, 2003). Se sabe que los mecanismos inmunológicos más importantes que ocurren en el pulmón se pueden clasificar en innatos y adaptativos (Peters y Ernst, 2003). En el primer caso tienen participación, los macrófagos, los neutrófilos y el sistema del complemento, en el segundo caso participan células T y B que son capaces de reconocer antígenos. Las respuestas inmunes adaptativas dependen de las células T cooperadoras (Th CD4) y células T citotóxicas (T<sub>c</sub> CD8) siendo las dos muy importantes en procesos infecciosos donde están involucradas las micobacterias (Prince *et al.*, 2003). No está aún esclarecido el mecanismo por medio del cual la enfermedad resiste en los pulmones, ni el porqué puede perder esa resistencia, que hace que la micobacteria vuelva a crecer y a multiplicarse (Turner *et al.*, 2001).

La infección primaria afecta principalmente el sistema respiratorio particularmente el pulmón, donde se montan respuestas de tipo inmune e inflamatorio (Prince *et al.*, 2003), ya que los bacilos se encuentran suspendidos en las vías aéreas que comunican con los espacios alveolares, las partículas bacilares más pesadas, chocan con la mucosa de la nasofaringe y el árbol bronquial, son removidas a través de los cilios y eventualmente son engullidos ( Morris, 1994, Bernard, *et al.*, 1996), también puede convertirse en una infección sistémica ya que las células fagocíticas infectadas atraviesan la pared bronquial, entran a la circulación linfática y son transportados a los nódulos linfáticos, al parénquima de los pulmones o a otros sitios anatómicos (Wakeham *et al.*, 2000). A través de los mecanismos de respuesta inmune innata el individuo trata de combatir a la micobacteria, con la remoción mucociliar en vías respiratorias altas, y la acción del sistema del complemento donde las micobacterias pueden entrar a los macrófagos vía receptores para los componentes del complemento, el receptor del complemento tipo 1 (CR1) es una proteína monomérica transmembranal que se une a las fracciones C3b y C4b, del complemento. Las micobacterias patogénicas raramente reclutan fragmentos del complemento C2a para formar C3 convertasa, y generar actividad opsonizante de C3 en ausencia de los componentes tempranos activos de la vía alterna del complemento (Shorey, *et al.*, 1997). Otro de los mecanismos de destrucción presentes en los macrófagos, son los receptores de manosa, esta es una proteína transmembranal, con un dominio extracelular que contiene ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos dependientes de calcio característica de lectinas (Taylor y Drickamer, 1993).

De manera general se pueden mencionar dos mecanismos por medio de los cuales se inhibe el crecimiento de la micobacteria, el primero corresponde a la activación de los macrófagos y su posterior interacción de estos con las células T y la producción de citocinas. El otro mecanismo es la fagocitosis del bacilo que es llevada a cabo por el macrófago y posteriormente la muerte de ambos, ya sea, porque hayan sido parcialmente activados o cuando no se haya realizado la activación, esto conduce a que dentro de los macrófagos crezca la micobacteria, pero al morir el macrófago esta es liberada al exterior, lo cual favorece su invasión y crecimiento en otra célula, sin embargo este mecanismo provoca una necrosis caseosa en el tejido anexo, se liberen ácidos grasos tóxicos, bajo pH y un estado de anoxia, lo cual es desfavorable para el crecimiento de la micobacteria (Converse *et al.*, 1996).

Los macrófagos inmaduros que llegan a la corriente sanguínea, ingieren al bacilo pero debido a su estado no están capacitados para destruir a la micobacteria, por otro lado los bacilos no dañan a los macrófagos porque no ha sido posible el desarrollado una respuesta de hipersensibilidad de tipo tardía por falta de la activación de las células T y citocinas (McDonough, *et al.*, 1993, Bloom, 1994). Para poder contrarrestar el efecto nocivo de la micobacteria en gran medida dependerá de la virulencia del microorganismo, y la capacidad de los macrófagos para que puedan destruir a la bacteria y eliminarla, sin embargo entre el 50 y 75% de los individuos que han tenido contacto con

pacientes con tuberculosis activa no adquieren la infección (Lawn et al., 2002). Cuando la bacteria se es fagocitada por los macrófagos, puede encontrarse en diferentes sitios: en fagosomas, fagolisosomas y en el citoplasma o fusionada en vacuolas, pero tiene la capacidad de escapar y aparecer libre en el citoplasma, provocando que se desarrolle la enfermedad. Así mismo también regula la maduración de los compartimentos lisosomales, debida a los sulfolípidos bacterianos que están localizados en la superficie celular. Otro factor son los lipoglicanos del bacilo, capaces de modular la secreción de citocinas y las funciones efectoras de los macrófagos (Rastogi et al., 2001).

Las quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , 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). La formación del granuloma comienza por el desarrollo de infiltrado monocítico, la agregación, maduración y organización de células mononucleares dentro de este, y de la maduración y evolución del granuloma epitelioide, depende de las citocinas y quimiocinas, que inician, organizan y mantienen al granuloma, aunque no se sabe aún como es que lo realizan (Lawn et al., 2002). La presencia de necrosis en las lesiones tuberculosas, se debe a el daño al tejido donde se desarrolla un mecanismo de hipersensibilidad tardía que compromete a los antígenos de la micobacteria, y estos estimulan la activación de las células T y citocinas; los macrófagos tienen la capacidad de eliminar a los bacilos intracelularmente y al mismo tiempo los fagocitos son eliminados por los bacilos o sus productos tóxicos, después de ello se forman lesiones que están constituidas en el centro por tejido caseoso y una capa de tejido granular tuberculoso que contiene macrófagos, linfocitos T y B, células plasmáticas, fibroblastos y un aporte vascular, dentro de este material caseoso los bacilos van muriendo gradualmente pero otros se pueden mantener latentes por mucho tiempo, estas lesiones pueden medir de 0.5 a 1.5 mm de diámetro, esta cubierto por tejido conectivo, y la función principal de estos es tratar de contener a la micobacteria por tiempo indefinido y así evitar la diseminación (Prince et al., 2003, Lawn et al., 2002). El granuloma juega un papel crítico en la respuesta inmune del huésped frente a *M. tuberculosis*, conteniendo al organismo y confinándolo a un estado latente en la mayoría de los individuos infectados (Lawn et al., 2002), por lo que es importante en el proceso inmunopatológico incluir a la inflamación granulomatosa (Prince, et al., 2003).

Los bacilos que llegan a escapar son atrapados por los macrófagos, inhiben su crecimiento y los destruyen, siempre y cuando el número de macrófagos activados sea el suficiente. (Converse et al., 1996). El bacilo del complejo tuberculosis induce severa inflamación granulomatosa caracterizada por el tráfico de numerosas células T activadas a los sitios de infección (Waters et al., 2003). La osteopontina es una glicoproteína secretada por muchas células del granuloma que están implicadas en la regulación de la quimiotaxis, es el mayor estímulo para el desarrollo de

células T y la adhesión celular, todas ellas participan para la formación del granuloma (Dannenberg, 1989). Los centros caseosos se licúan, esto está relacionado con la hidrólisis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos del tejido caseoso, debido a la acción de enzimas hidrolíticas de macrófagos, y a la disminución de los inhibidores de estas enzimas (Lucas, 1988).

La latencia de la enfermedad se cree sea debida a un grado de hipoxia del huésped, ya que el granuloma provoca un ambiente anaeróbico (Prince et al., 2003). Se sabe que la inmunosupresión por fármacos puede reactivar la forma latente de la tuberculosis (Lawn et al., 2002). Estudios realizados en individuos enfermos reflejan resultados de que el sistema inmune se encuentra inmunodeprimido, y se describen principalmente tres estados de respuesta inmune celular, a: granulomas caracterizados por macrófagos epiteloideos, células gigantes y en la periferia células TCD4+, con conteo de bacilos disminuido; b: estado de diferenciación y activación de macrófagos está ausente, linfocitopenia CD4+ y un número mayor de bacilos; c: reclutamiento celular casi ausente, escasos linfocitos T CD4+ y un gran conjunto de bacilos (Lawn et al., 2002).

## **1.8. Respuesta inmune en la tuberculosis bovina**

En la infección intracelular primaria causada por el *M. bovis* tiene gran participación la respuesta inmune innata, como primera barrera de resistencia dentro de las primeras semanas después de la infección, en la cual actúan el complemento, macrófagos y células Natural Killer (NK). Los componentes de la respuesta innata funcionan como ligandos los cuales provocan señales sobre otros componentes celulares, posteriormente se desarrolla la respuesta adaptativa inmune que envuelve a células T y B y la participación de los macrófagos que son capaces de reconocer antígenos y encaminar una respuesta hacia Th1 o Th2 (Wakeham et al., 2000, Prince, et al., 2003). La respuesta inmune a *M. bovis* es multifactorial, incluyendo severas armas del sistema inmune como linfocitos T CD4+ que juegan un papel esencial en la respuesta mediada por células, la cual se caracteriza por la formación de granulomas epiteloideos (Lawn et al., 2002). Las citocinas son moléculas que resultan de la activación de la respuesta celular, aquellas que participan contra las infecciones intracelulares principalmente son interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) (Hernández-Pando et al., 1997, Wakeham et al., 2000). Hoy día se sabe que para que se lleve a cabo la respuesta adaptativa, esta básicamente depende de la respuesta innata del organismo, lo cual afectará el periodo para el control de la infección (Flynn y Ernst, 2000).

### 1.8.1. Función de los macrófagos en la tuberculosis bovina

Primeramente la micobacteria es inhalada, el antígeno en pulmones, es engullido por los macrófagos alveolares a través de la fagocitosis, por medio de esto el macrófago se activa, posterior a esto los macrófagos secretan moléculas como la enzima angiotensina-convertasa (ACE), 1,25-dihidroxitamina  $D_3$  ( $1,25(OH)_2D_3$ ), osteopontina y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , que hacen que se forme el granuloma, y se desencadenen otras respuestas inmunes (Prince, *et al.*, 2003). Todo esto ocurre a partir de que los macrófagos que son las principales células efectoras contra el crecimiento del bacilo, constituyendo alrededor del 85% de las células inmunes en el pulmón, representando así a la respuesta inmune innata. La falta de la fagocitosis micobacterial por cualquier defecto de información, impide que se envíe información a las células T CD4+ para que el microorganismo sea eliminado (Lawn *et al.*, 2002). Se sabe hoy día que en la activación de los macrófagos causada por la micobacteria, tienen participación los receptores TLR (Stenger y Modlin 2002).

### 1.8.2. Importancia de los receptores de linfocitos T (TLRs) en la respuesta inmune

Para una eficiente respuesta inmune contra *M. bovis*, depende de la rápida detección de porciones moleculares asociadas al microorganismo patógeno invasor por parte de la respuesta inmune innata y la activación de la respuesta inmune adaptativa (Buddle *et al.*, 2003), los receptores de linfocitos T (TLRs) contribuyen a que se lleve a cabo la primera, al detectar moldes moleculares asociados a la micobacteria y mediar la secreción de las moléculas efectoras antibacterianas, el conocer exactamente los mecanismos por medio de los cuales se dan estas respuestas tanto en las células huésped y células T, aún son desconocidos en su totalidad, sin embargo se sabe que los TLRs son clave para que se lleve a cabo esta interacción, influyendo en la respuesta adaptativa por sobrerregulación de moléculas inmunomodulatorias que apoyan el desarrollo de la respuesta de células Th 1 (Stenger y Modlin, 2002). Los TLRs reconocen moléculas extrañas específicas de agentes microbianos, incluyendo componentes que contienen carbohidratos y lípidos (lipopolisacáridos y lipopéptidos) y fragmentos de DNA bacterial (Jumperz y Brenner, 2001). La lipoarabinomamana es un glicolípido dominante en la pared celular micobacteriana, la activación de los macrófagos por medio de esta vía se logra en combinación de la molécula adaptadora CD14 y la señal de traducción de la molécula TLR2 (Stenger y Modlin, 2002). Por lo que los TLRs facilitan la transcripción de genes, como los de las citocinas y moléculas coestimuladoras, que regulan la respuesta adaptativa. La combinación de ligandos de TLRs puede

incrementar la diversidad de las respuestas a antígenos microbianos y desencadenar una variedad de modelos moleculares asociados a patógenos que pueden ser detectados por el sistema inmune innato. Se sabe que dependiendo del extracto micobacteriano, el procesamiento de los antígenos puede ser inhibidos por *M. tuberculosis* a través del decremento en la síntesis de moléculas del MHC clase II, de tal manera que *M. tuberculosis* puede interactuar con TLR2, TLR4 u otros TLRs. (Stenger y Modlin, 2002). Cuando los ligandos TLR son secretados por el patógeno, se concentran en el ambiente extracelular y actúan alrededor de células no infectadas, por lo tanto los patógenos bacterianos tienen la habilidad de modular la expresión de los TLRs y así regular la activación del sistema inmune (Stenger y Modlin, 2002).

La producción de intermediarios reactivos del nitrógeno es el mejor mecanismo de defensa de los mamíferos contra la infección con patógenos intracelulares. La señalización de TLR ha sido ligada a la inducción de sintasa óxido nítrico inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (ON). Esta inducción por lipopéptidos bacterianos de ON, se realiza a través de la muerte intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos infectados tras la activación de TLR2, por lo que se indica que este receptor contribuye a la defensa contra la enfermedad en el sitio de infección, y que tiene participación importante en los estados crónicos de la infección cuando la mayoría de la carga micobacteriana ha llegado a ser clara. La señalización de TLR favorece la respuesta inmune Th1, promoviendo la maduración de las células dendríticas y desencadenando la actividad antimicobacteriana (Stenger y Modlin, 2002). Las células dendríticas juegan un papel importante en la Inmunidad Innata como adaptativa, estas contienen una amplia gama de TLRs. Antes de la activación de las células T está la maduración de las células dendríticas, inducida entre otros patógenos por micobacterias y su maduración "*in vivo*" está mediada por los tipos TLR2 y TLR4. Sin embargo los lipopéptidos pueden promover la maduración de estas células dendríticas a través de los productos bacterianos y así participar en la iniciación de la respuesta inmune (Stenger y Modlin, 2002, Schaible y Kafmann, 2000).

### **1.8.3. Inducción de la respuesta inmune**

Los neutrófilos, el complemento y los macrófagos tienen un papel importante en contra de la colonización e invasión microbiana, aunque recientes investigaciones han demostrado que también existe la participación de unas proteínas de defensa llamadas  $\beta$ -defensinas, son pequeñas, péptidos catiónicos, producidas por el epitelio pulmonar de humanos y ratones y en menor grado *in vitro*, cuya principal propiedad es que son bactericidas. Estas además son quimioatrayentes de células dendríticas y células T a los sitios de inflamación y por medio de esto pueden activar la inmunidad adaptativa, contra patógenos pulmonares: En segundo lugar participa la respuesta inmune adaptativa celular (células T y B), en el primer caso las células

Th 1 que secretan principalmente interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y las células citotóxicas Th 2 que secretan IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 entre otras citocinas (Prince *et al.*, 2003), y por otro lado desde que el macrófago es invadido por la micobacteria se provoca la respuesta de células B, a través de la inducción de anticuerpos, que no van a proteger al individuo (Klünner *et al.*, 2001).

#### 1.8.4. Acción de los linfocitos

Los linfocitos T participan en la respuesta inmune adquirida con al menos dos principales funciones, la primera es que produce citocinas que activan funciones efectoras, como el IFN- $\gamma$  que es el mayor activador de las funciones antimicrobianas del macrófago, producida por todas las células T como: CD4+, CD8+, células T  $\gamma\delta$  y células restringidas a CD1 y por otro lado las células T que expresan actividad citolítica mediante la lisis de las células blanco infectadas, la lisis de los macrófagos infectados, no es suficiente para eliminar completamente a la micobacteria. Durante la fase de estimulación de la respuesta inmune el bacilo secreta diversos antígenos que sufren degradación fagosomal, procesamiento y presentación de los productos por el complejo MHC de clase II a las células T CD4+, para así conferir protección contra la tuberculosis, desencadenando otros procesos de la respuesta inmune (Kaufmann y Hess, 2000). Datos importantes en este reconocimiento por parte de estas células, es que expresan receptores de células T  $\alpha\beta$  (TCR), pero reconocen además glicolípidos presentados por moléculas CD1, y otras células T que expresan TCR  $\gamma\delta$  con especificidad de bajo peso molecular, fosfolípidos no proteínicos independientemente de moléculas de presentación conocidas. La importancia de estas moléculas CD1 recae en que las son reconocidas independientemente de las moléculas de presentación, por las células  $\gamma\delta$  (Stenger y Modlin, 1999, Kaufmann y Hess, 2000, Schaible y Kaufmann, 2000). Las células T restringidas a CD1 juegan un papel importante en la respuesta inmune del huésped contra infecciones microbianas, en humanos se ha visto el aumento de la respuesta inmune al presentar en este contexto antígenos lipídicos microbianos en comparación con grupo control. La activación de células NK restringida a la presentación por CD1 con un antígeno glicolípido, aumenta la respuesta a patógenos infecciosos (Jumperz y Brenner, 2001). Básicamente se puede decir que existen dos subpoblaciones importantes de células involucradas en la respuesta inmune y son células T CD4+ y T CD8+ (Wilkinson *et al.*, 2000). Las células T CD4+ son importantes ya que se ha observado que bajos niveles en la sangre, están relacionados con el deterioro de la respuesta de hipersensibilidad retardada e incremento de la diseminación de la enfermedad pulmonar y extrapulmonar, para el caso particular de las micobacterias (Prince *et al.*, 2003). De manera general se puede decir que las células T confieren inmunidad protectora, median acciones tanto de

ayuda, como efectoras, tienen actividad citolítica, promueven la activación de macrófagos y son responsables de la memoria inmunológica (Lawn *et al.*, 2002).

Recientemente se han hecho observaciones donde la participación de otra población celular constituida por células asesinas ha sido aclarada, las células T CD8<sup>+</sup> poseen en su interior granulinsina, que ataca directamente a la micobacteria por lo que se considera estos mecanismos, los más importantes para combatir la infección, realizados por diferentes poblaciones celulares requeridas para conferir una eficiente protección (Lamb, 1998, Stenger y Modlin., 1999, , Gerosa *et al.*, 1999, Wilkinson *et al.*, 2000).

Es importante señalar que en un estado de enfermedad predomina la respuesta de células Th1 y la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  asociadas a una respuesta protectora, en caso contrario, en la enfermedad fibrocavitaria, el tipo de células predominante es el Th2 (Lamb, 1998, Prince *et al.*, 2003). En algunos experimentos se ha observado el incremento relativo del número de células T CD8<sup>+</sup> después de la inoculación de BCG (Klünner *et al.*, 2001).

Sin embargo puede ocurrir la pérdida de las células T, provocada por información de apoptosis celular inducida, depleción de células CD4<sup>+</sup> infectadas y linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> no infectados y que se encuentran alrededor (Lawn *et al.*, 2002). Ambos tipos celulares pueden tener actividad citotóxica, utilizando diferentes mecanismos de lisis, las CD4<sup>+</sup> lo hacen a través de la vía FAS-ligando con el factor de necrosis tumoral relacionado a la molécula FAS (CD95) de los macrófagos, y las CD8<sup>+</sup> lo hacen mediante la formación de poros en las células infectadas, a través de las perforinas (Klünner *et al.*, 2001).

Así mismo se menciona de la participación de las células T  $\gamma\delta$ , que representan una proporción mayor de las células mononucleares en sangre periférica en los rumiantes, (aproximadamente el 75% en animales jóvenes y el 40% en adultos), en comparación a la población de células T  $\alpha\beta$  y que se sabe que tienen un papel muy importante en la respuesta celular inmune en la tuberculosis bovina. Estas células expresan una molécula de superficie WC1 que no es posible encontrar en otros modelos, sin embargo se ha propuesto que regula a las células T  $\gamma\delta$  dependientes de IL-2, aunque aún está en vías de estudio como es que participan en la respuesta protectora contra *M. bovis*, se tienen clasificadas funciones tales como proliferación, células asesinas y actividad citotóxica, (Park *et al.* 2000, Welsh *et al.*, 2002); por otro lado en infecciones experimentales de *M. bovis*, se ha visto la alta activación de esta población y que confiere protección, pero el mecanismo por medio del cual se llegan a activar aún es objeto de estudio (Smyth *et al.*, 2001), sin embargo publicaciones recientes indican que estas células necesitan de moléculas accesorias para la activación y función (Park *et al.*, 2000). Después de su estimulación y activación pueden secretar niveles elevados de IFN- $\gamma$ , cuando cursan por un proceso infeccioso con *M. bovis*, adquiriendo de manera natural, no así cuando se da una estimulación *in vitro*, usando antígenos micobacterianos por lo que su respuesta inmune esta enfocada al tipo Th 1 (Welsh *et al.*, 2002).

### 1.8.5. Papel de las citocinas en la modulación de la respuesta inmune en la tuberculosis

La respuesta inmunológica protectora, dependerá en gran medida del equilibrio entre la inmunidad inespecífica y la específica, con el consecuente predominio de la respuesta Th1 con la producción de IFN- $\gamma$ , sobre la respuesta Th2 (Lamb,1998, Klöpper *et al.*,2001). Después de la activación de los linfocitos T, se producen diferentes citocinas que atraen o activan a otras poblaciones leucocíticas, como: La quimiciocina IL-8 y otras citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  que facilitan el reclutamiento y la activación de células mononucleares (Klöpper *et al.*,2000, Lawn *et al.*, 2002.).

El IFN- $\gamma$  es considerado un activador de células nucleadas y estimula muchas de las funciones efectoras de los fagocitos mononucleares, una de sus funciones *in vivo* es la activación de macrófagos para eliminar patógenos intracelulares como micobacterias (Trinchieri, 2003). En algunos estudios se han mostrado que en ratones con ausencia del gen para IFN- $\gamma$ , se presentaron defectos inmunes, afectando la capacidad de resistencia a parásitos intracelulares (Chensue *et al.*, 1997). La hipersensibilidad retardada, es una respuesta característica en la tuberculosis, que se presenta, de entre 4 y 6 semanas después de la infección inicial. La IL-12 es el principal dirigente de la expansión clonal de linfocitos, que resulta en la producción de IFN- $\gamma$  que activa a los macrófagos (Gerosa *et al.*, 1999, Lawn *et al.*, 2002, Moreira *et al.*, 2000). Después de la inhalación de una dosis infectiva de *M tuberculosis*, puede ocurrir un periodo de latencia por muchos años, después de la exposición se han realizado pruebas de inmunoensayo (ELISA) de fluido broncoalveolar, con esputo y cultivo positivos y se ha demostrado los altos niveles de producción de IFN- $\gamma$  (Moreira *et al.*,2000, Prince *et al.*, 2003).

El TNF- $\alpha$ , es importante para el desarrollo del granuloma que contendrá al agente infeccioso y el control de la enfermedad (Prince *et al.*, 2003). Es una citocina importante en el control de la tuberculosis aguda en ratones, participando en la resistencia hacia la micobacteria, por la activación de macrófagos y la inducción de la expresión de la enzima sintasa óxido nítrico (NOS2) que suele ser tóxico para el microorganismo. Sin embargo en otro estudio pudo observarse que si existen niveles elevados de TNF- $\alpha$ , bajo el uso de *m. bovis* BCG recombinante, puede causar patología excesiva, por lo que dependiendo de los niveles esta citocina puede ser protectora o dañina (Flynn y Chan, 2001). Así por ejemplo seguida a la inmunización intravenosa o subcutánea en ratones con *M. bovis* BCG se ha observado una respuesta inmune de tipo Th1 con la posterior producción de IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , consideradas estas, como importantes mediadores de respuesta inmune contra la infección micobacteriana, y cuyos niveles se ven incrementados

durante los primeros días después de la infección, y por otro lado los niveles de citocinas de tipo Th2 como IL-4 e IL-10 se encuentran ausentes o muy bajos (Wakeham *et al.*, 2000).

La IL-2 es una citocina que actúa como factor de crecimiento para la expansión clonal de linfocitos antígeno específico, modulando la proliferación y la diferenciación de las células Th, células T citotóxicas, células B activadas y células NK, y es secretada por las células Th (Jiménez *et al.*, 2001). La expresión de IL-2 por células T CD4+, durante la respuesta inmune primaria, se ha relacionado a un aumento de la función memoria/efecto con la sensibilidad antigénica incrementada y la expresión de citocinas efectoras en una respuesta secundaria. La inducción de altos niveles de IFN- $\gamma$  y de IL-2 en células mononucleares de sangre periférica, esplenocitos y linfocitos intraepiteliales, de animales que habían sido inmunizados fueron detectados hasta después de 110 semanas posteriores a la inmunización. La expresión de citocinas Th1 en células mononucleares de sangre periférica, bazo e intestino delgado se mantuvieron por más de 2 años después de la inmunización, lo cual sugiere el largo periodo de mantenimiento de las células de memoria específicas al antígeno (Kawahara *et al.*, 2002).

La citocina IL-4 es producida por células T CD4+, mastocitos y basófilos, es elemental para el desarrollo de una respuesta de tipo Th2, esta actúa como factor de crecimiento en células B, células T y mastocitos, incrementa la expresión de moléculas MHC-II en células B, así mismo es necesaria para inducir la respuesta de IgE, y su ausencia conduce a niveles bajos de IgG1 en respuestas inmunes dependientes de células T. Los efectos estimulatorios de IL-4 están regulados por IFN- $\gamma$ , con el cual tiene funciones antagónicas. También puede aumentar la función de los monocitos incrementando la expresión de algunas moléculas proinflamatorias. En estudios recientes se demostró un incremento de IFN- $\gamma$  en suero y localmente IFN- $\gamma$  e IL-4 en células de lavado bronquioalveolar, en pacientes con tuberculosis, lo cual sugiere la presencia de ambos tipos de respuesta tanto Th1 como Th2, así como que en la reactivación de la enfermedad existe un cambio de citocinas de tipo 1 a tipo 2 (Rodees *et al.*, 2000).

La IL-10 es considerada también 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- $\gamma$  en células activas, asociada a la respuesta Th2, sus efectos incluyen reducción en la proliferación de las células T antígeno-específicas, inhibición de IFN- $\gamma$  inducida por IL-2. Son consideradas sus propiedades antiinflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro*. En estudios realizados recientemente en modelos con ratones se observó que si existe una deficiencia de células T a IL-10 se produce un incremento en la producción de IFN- $\gamma$ , lo cual lleva a la muerte del animal por sobreproducción de mediadores inflamatorios como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-12, en infecciones por *Toxoplasma* o *Trypanosoma cruzi*. Cuando se administra IL-10 a macrófagos infectados con la micobacteria, se inhibe la muerte bacteriana, por lo que es considerada como reguladora negativamente (Murray y Young, 1999).

## **2. HIPÓTESIS**

Tanto la vacuna atenuada BCG de *M. bovis* como las proteínas presentes en el extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), son capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra la tuberculosis bovina en vacas vacunadas, no obstante, es posible que la vacuna BCG promueva una mayor y mejor respuesta inmune a través de una significativa expresión y producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 derivada de la sensibilización de una gama mas extensa de linfocitos Th1.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la eficacia de la BCG y del CFPE de *M. bovis* como inmunógenos contra la tuberculosis bovina a través de la expresión del patrón de citocinas Th1 y Th2.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Comparar la expresión de IFN- $\gamma$  en los diferentes grupos de vacunación bajo la estimulación *in vitro* con diferentes antígenos: PPD bovino, Dip-Z, Complejo 45-47, Con A y sin estimular, a través de un kit comercial.
- Caracterizar la secreción de citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10, bajo condiciones de estimulación *in vitro* con los antígenos previamente mencionados, mediante la utilización de RT-PCR,
- Determinar y comparar la protección ofrecida en los diferentes grupos, debida al uso de los diferentes inmunógenos por medio de la inspección de lesiones macroscópicas al momento del sacrificio.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1. Animales y lugar de estudio

Se utilizaron 24 bovinos hembra Holstein de 8-12 meses de edad, que procedían de una zona con prevalencia de tuberculosis bovina, diagnosticados previamente por 4 métodos para la TB: prueba de tuberculina, interferón gama (IFN- $\gamma$ ), inmunoensayo (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estos animales provenían del Estado de Guanajuato, mismos que fueron trasladados al CENID- Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en la Ciudad de México.

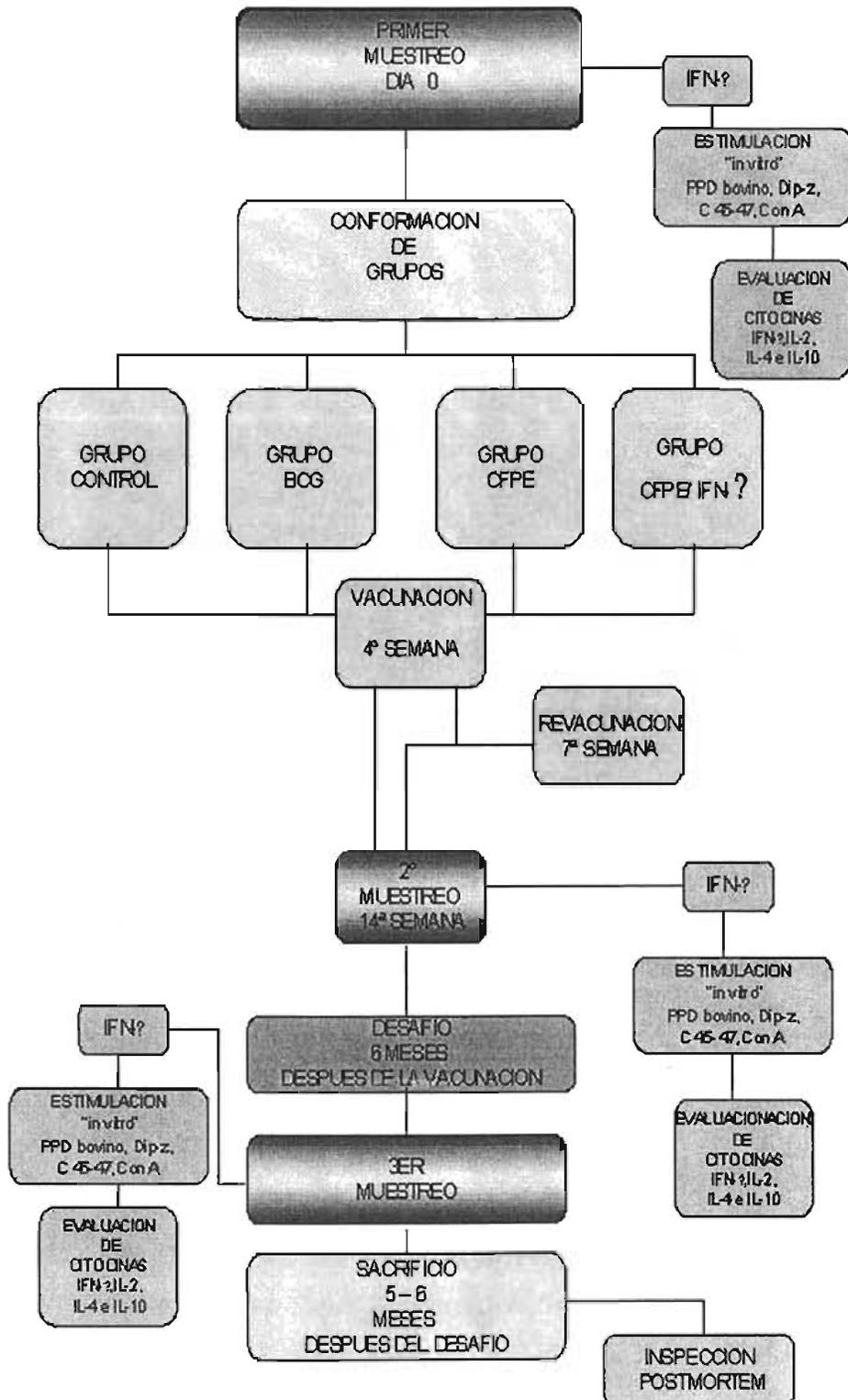
### 5.2. Tratamientos

Se formaron aleatoriamente 4 grupos de 6 animales cada uno, se mantuvieron en estabulación conjunta para posteriormente evaluar individualmente su respuesta inmune. Los animales del grupo 1 se inocularon con PBS (Apéndice) como placebo ya que representó al grupo control. Los animales del grupo 2 fueron vacunados con BCG *M. bovis*. El grupo 3 fue inoculado subcutáneamente en el cuello con 2 dosis de 300 mg de extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE) con un intervalo de 3 semanas entre cada dosis. Los animales del grupo 4 se inocularon con 2 dosis de 300 mg de CFPE y adicionalmente recibieron también 200  $\mu$ g de IFN- $\gamma$  bovino recombinante vía subcutánea que fue administrado dos días antes de que los animales fueran inoculados con el CFPE (Cuadros 5.2. y 5.3).

CUADRO 5.2. ESQUEMA DE TRATAMIENTOS

|            | GRUPO 1 | GRUPO 2 | GRUPO 3 | GRUPO 4            |
|------------|---------|---------|---------|--------------------|
|            | CONTROL | BCG     | CFPE    | CFPE-IFN- $\gamma$ |
| No. ANIMAL | 1       | 3       | 9       | 4                  |
|            | 2       | 6       | 11      | 12                 |
|            | 5       | 7       | 14      | 16                 |
|            | 8       | 10      | 19      | 17                 |
|            | 15      | 13      | 20      | 22                 |
|            | 21      | 24      | 25      | 23                 |

CUADRO 5.3. DIAGRAMA DE FLUJO DE TRATAMIENTOS Y OBTENCION DE MUESTRAS



### 5.3. Prueba de intradermorreacción (ID)

Fueron utilizadas las tuberculinas autorizadas para efectos de la campaña Campaña nacional contra a la tuberculosis y brucelosis (CANTB); PPD bovino elaborado con *M. bovis* cepa AN5<sup>1</sup> y PPD aviar elaborado con *M. avium* cepa D4<sup>1</sup>. Se rasuró el área correspondiente al tercio medio superior del cuello, para posteriormente inocular la tuberculina. El sitio de aplicación superior fue cerca de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior fue aproximadamente a 15 cm de la anterior, esta prueba se aplicó mediante la inoculación intradérmica de 0.1 ml de PPD aviar (área superior) y 0.1 ml de PPD bovino (área inferior), 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 con un cutímetro (Vernier) registrando los valores. La lectura de la prueba se realizó posterior a 72 +/- horas. La diferencia entre la resta de la primera lectura a la segunda, da el resultado de la prueba. Los criterios de interpretación fueron los siguientes: 2mm de aumento: negativo, mayor a 2 y hasta 4 mm de aumento: sospechoso, mayor a 4 mm de aumento: positivo (Norma Oficial Mexicana, 1995).

### 5.4. Determinación de interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

Esta prueba se aplicó al inicio del experimento a los 24 animales empleando un kit comercial (BOVIGAM™ Bovine Gamma Interferon Test<sup>2</sup>), cuyo objetivo principal fue determinar la negatividad de los propios animales a la TB. Su fundamento se basa en evaluar la respuesta inmunológica celular, a través de la estimulación *in vitro* de leucocitos de sangre heparinizada, utilizando como antígeno el PPD de micobacterias. Posterior a la estimulación antigénica, los linfocitos T circulantes que se encuentran en la muestra de sangre secretan IFN- $\gamma$ , que es medido mediante una prueba de ELISA de captura (Domingo *et al.*, 1995; Walravens *et al.*, 2002). Se procedió a la extracción de 10 ml de sangre de la vena caudal en tubos con vacío y con heparina. Las muestras de sangre se cultivaron *in vitro* según el protocolo de Rothel *et al.*, 1990, con 1.5 ml de sangre heparinizada de cada animal en 3 diferentes pozos en placas de cultivo de 24 pozos. Un pozo fue estimulado con 100  $\mu$ l de PPD bovino (20  $\mu$ g/ml), el segundo con 100 $\mu$ l de PPD aviar (20 $\mu$ g/ml) y el tercero fue el control. El cultivo se realizó durante 24 horas, en estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Al final del cultivo se obtuvo el plasma y fue depositado en microtubos para ser congelados a -70°C, hasta la realización de la prueba de ELISA para detectar IFN- $\gamma$ . Para la realización de la

---

<sup>1</sup> PRONABIVE. México, D.F.

<sup>2</sup> CSL. Veterinary. Victoria, Australia

técnica, se adicionaron 50  $\mu$ l de diluyente a la placa, posteriormente se agregaron 50  $\mu$ l de muestras problema a los diferentes pozos que contenían diluyente, las muestras control se agregaron al final de cada placa y se procedió a mezclar su contenido. Se incubaron a temperatura ambiente (25°C) por 60 min +/- 5 min. Pasado este tiempo el contenido fue retirado y se procedió a lavar 6 veces cada placa, los pozos se lavaron con amortiguador de lavado (PBS-Tween 20 al 0.1 %). Más tarde se adicionaron 100  $\mu$ l de conjugado (anticuerpo anti IFN- $\gamma$  bovino), durante 60 min. Se realizó el lavado de la misma forma que se describió y se adicionaron 100 $\mu$ l del cromógeno tetrametilbencidina (TMB), con amortiguador enzima-sustrato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solución reveladora)) a cada pozo. Posteriormente se protegieron las placas de la luz y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Se adicionaron 50  $\mu$ l de solución de paro (0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) por pozo. Se procedió a realizar la lectura de la absorbancia a 450 nm dentro de los 5 minutos después de terminada la reacción. Los valores de absorbancia se utilizaron para poder calcular los resultados y la interpretación de los resultados se realizó como a continuación se describe:

- Se calcularon las medias de los valores de absorbancia de cada muestra de los pozos estimulados con PPD bovino, PPD aviar, ya que cada muestra se trabajó por duplicado.
- Se compararon las medias de los valores de absorbancia de las muestras de PPD bovino con el control negativo de IFN- $\gamma$  del kit. Todas las muestras con PPD bovino con valor inferior a 0.050 fueron consideradas negativas.
- Después fueron cotejadas las medias de los valores de absorbancia de las muestras sin antígeno, con PPD bovino y PPD aviar. Observando que si el valor de absorbancia de la muestra con PPD aviar fue mayor que la de la muestra con PPD bovino, el animal se consideró como negativo a TB.

## 5.5. Evaluación de la inmunidad humoral (ELISA)

Se utilizó suero, colectado de sangre de la vena caudal de los 24 bovinos en tubos de 10 ml con vacío. Siguiendo el protocolo de (Voller, A 1979. Ritacco, V 1990), las placas fueron sensibilizadas con 5 µg de CFPE de *M. bovis* y *M. avium* en 100 µl de solución de adherencia (amortiguador de carbonatos pH 9.6) por pozo. Se incubó durante la noche a temperatura ambiente y se retiró la solución. Se añadieron 100 µl de solución bloqueadora (1% de leche descremada en PBS y 0.1% Tween 20<sup>1</sup>), incubando por 1 h a 37°C. Se realizaron 5 lavados con solución de lavado (PBS con 0.1% Tween 20) (Apéndice), se secaron en estufa a 37°C. A continuación se añadieron 100 µl de cada suero problema diluido 1:50 en solución bloqueadora y se incubaron 1 hr a temperatura ambiente. Se retiró la solución y se realizaron 5 lavados con solución de lavado. Posteriormente se agregó a cada pozo 100 µl de proteína G<sup>2</sup> conjugada con peroxidasa diluido 1: 10 000 en solución bloqueadora, se dejaron incubar 1 hr 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 citratos<sup>1</sup> o citrato-fosfato pH 4.5, (Apéndice) 4mg de orto - fenilendiamina<sup>3</sup>) agregándose al momento 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se detuvo la reacción a los 10 minutos con 50 µl por pozo de solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> 2M<sup>4</sup>). Las lecturas se realizaron a 492 nm.

## 5.6. Diagnóstico de tuberculosis bovina por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 5.6.1. Extracción de DNA de hisopo nasal

Se extrajo el DNA de cada muestra de exudado nasal por el método de Van Soolingen *et al.*, (1998). Se tomó la solución de (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), nuevamente se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Después se agregaron 400 µl de TE 1X más 50 µl de lisozima<sup>5</sup> (TSI) se agitó e incubó a 37°C durante 1 h. Posteriormente se adicionaron 75 µl de SDS 10%/proteínasa K<sup>6</sup> (70 µl de SDS 10% y 5 µl de proteínasa K 10 mg), se agitó e incubó a 65°C durante 1 h. Después se adicionaron 100 µl de NaCl

<sup>1</sup> J.T. Baker S.A. de C.V. Xalostoc, Edo. de México

<sup>2</sup> ICN BIOMEDICAL Inc. Aurora, Ohio, USA

<sup>3</sup> SIGMA, San Luis, USA

<sup>4</sup> Técnica Química, S.A., México, D.F.

<sup>5</sup> SIGMA, San Luis, USA

<sup>6</sup> SIGMA, San Luis, USA

5 M y 100 µl de CTAB 10% (previamente calentada 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 750 µl de una solución de cloroformo/ alcohol isoamílico<sup>1</sup> y se agitó para hacer una solución homogénea, se centrifugó a 12 000 g x 5 min. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo (aproximadamente 600µl) teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia, para evitar la contaminación del DNA. Enseguida, se adicionaron 360 µl de alcohol isopropílico absoluto, dejando la mezcla a – 20 °C durante 30 min, o durante toda la noche. Se centrifugó a 12 000 g x 15 min y se descartó la mayoría del sobrenadante, dejando aproximadamente 20 µl 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 y nuevamente se descartó el sobrenadante y se dejaron 20 µl por encima del DNA. Se centrifugó a 12 000 g durante 1 min y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. En último lugar, se permitió que el DNA se secase a temperatura ambiente, aproximadamente por 20 min y se colocaron los tubos en una centrífuga de vacío a 45°C durante 20 min. El DNA se disolvió en 20 µl de agua milli Q y se almacenó a – 20°C hasta su empleo.

#### 5.6.2. Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Como control positivo se empleó 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 Cousins. 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 µl a las siguientes concentraciones de: dNTP's 10 mM, 1.5 mM de Mg<sub>2</sub>Cl, 20 pM de cada primer, 0.625 U de *Taq* polimerasa<sup>2</sup> 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 etidio al 1%.

#### 5.7. Obtención de muestras en diferentes tiempos para determinar la expresión de citocinas

Fueron realizados 3 muestreos durante el tiempo del experimento, el primero al momento de llegada de los animales (Día 0), el segundo correspondiente al periodo después de la revacunación

---

<sup>1</sup> AMRESCO, Solo, Ohio, USA

<sup>2</sup> Applied Biosystems. New Jersey, USA

(semana 14 ), y el tercer muestreo de entre 5 a 6 meses después del desafío. De los animales se obtuvieron muestras de sangre completa con EDTA [0.081 ml de (k<sub>3</sub>)] de cada animal para observar la expresión de citocinas, mediante la prueba de RT-PCR (Ver Cuadro 5.3.).

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

La sangre completa con EDTA fue obtenida de los 23 animales pertenecientes al experimento. El paquete PBMC se aisló por gradiente (Ficoll-Paque Plus)<sup>1</sup>, en tubos Falcón de polipropileno de 15 ml se agregaron 4 ml de Ficoll-Paque Plus y se depositaron 6 ml de sangre con anticoagulante (EDTA<sup>2</sup>), evitando romper el gradiente, posteriormente se centrifugaron a 2 800 rpm por 30 minutos. A continuación se recuperó la interfase de leucocitos y se depositó en tubos, adicionando 5 ml de solución de Hanks<sup>3</sup>, después se centrifugaron a 2800 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y este procedimiento se repitió nuevamente. Se adicionaron 3 ml de RPMI 1640<sup>4</sup> con 10% de suero fetal bovino (FBS). Para el conteo fue realizado en una cámara de New Bawer

## 5.9. Conteo de leucocitos y ajuste de leucocitos

La viabilidad se determinó tomando 5 µl de células del tubo donde fueron resuspendidas y 45 µl de RPMI y se depositaron en un vial, para obtener un volumen total de 50µl, y una dilución (1:10). De este volumen (50 µl) se procedió a tomar 10 µl de muestra y 10 µl de azul de Tripán, depositándolos en otro vial para poder llevar a cabo el conteo, con una dilución (1:1), posteriormente se ajustó la cantidad de células a 5x10<sup>6</sup> por pozo (placa de 24 pozos).

## 5.10. Estimulación *in vitro* de linfocitos con los antígenos recombinantes

A continuación se estimularon los cultivos celulares agregando: 100µl de PPD bovino, 100µl de PPD aviar (20µg/ml), 2.5 µl de complejo 45-47 (45-47 kDa, APA)\* (0.00125µg/ml), 2.5 µl de DipZ \* (.00125µg/ml), 10 µl de concanavalina A (Con A) (1µg/µl) y células sin estimular, correspondiente al control negativo. Las placas se incubaron por 72 hrs a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Primeramente se cosecharon 200 µl de sobrenadante, para realizar la prueba de IFN-γ. Las células

---

\* Gentilmente donado por la Dra. Clara Inés Esplua Pinzón, Depto. Inmunología. Inst. Invest. Biomédicas. UNAM.

<sup>1</sup> Amersham Biosciences

<sup>2</sup> Becton Dickinson.USA

<sup>3</sup> In Vitro, S.A. México, D.F.

se recuperaron y se centrifugaron a 4000 rpm a temperatura de 4°C por 5 minutos, el sobrenadante se decantó y se le adicionó a las células 1 ml de Trizol<sup>1</sup> y se congelaron a -70°C hasta la extracción de RNA total (Covert y Splitter, 1995; Nuallain *et al.*, 1997). Después de la obtención de los sobrenadantes, estos fueron evaluados para determinar la presencia de IFN- $\gamma$ , por el método anteriormente descrito

### 5.11. Aislamiento de RNA. Técnica de TRIZOL

El RNA total para las reacciones de RT-PCR, se extrajo de las células de sangre periférica, previamente estimuladas. El RNA se extrajo con 200  $\mu$ l de cloroformo-isoamílico, se centrifugo y se recupero la fase acuosa en un microtubo. El RNA se precipitó con 500 $\mu$ l de isopropanol<sup>2</sup>. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 100 % y posteriormente se realizó un segundo lavado con etanol<sup>3</sup> al 75%, el RNA fue resuspendido en 20 $\mu$ l de agua DEPC<sup>4</sup>, se calentó en baño maría a 60°C por 10 min y se determino la concentración en un cuantificador de RNA y DNA, Gene Quant (RNA/DNA calculator)<sup>5</sup> (Chomczynski y Sacchi, 1987).

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

A través de la reacción de la transcriptasa reversa se sintetizó la cadena de cDNA del RNA total aislado de cada muestra estimulada con PPD bovino, PPD aviar, complejo 45-47, DipZ, Con A, y una muestra sin estimular, utilizada como control. Las reacciones de RT, se realizaron en un volumen de 40  $\mu$ l, la mezcla contenía 2  $\mu$ l de Oligo d(T)<sub>18</sub> 1 $\mu$ g<sup>6</sup>, 4  $\mu$ l de 5X First-Strand Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM KCl, 10 mM DTT)<sup>6</sup>; 4  $\mu$ l de mezcla (1 $\mu$ l de cada uno) de desoxiribonucleótidos (dNTP: dGTP, dATP, dTTP, dCTP) 10mM<sup>7</sup>, 2  $\mu$ l de Rnase Inhibitor 40 U<sup>6</sup>, 2  $\mu$ l de la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (200)<sup>6</sup> y 250  $\mu$ g de RNA total. La mezcla se sometió a un ciclo de RT a 70°C por 3 min, 37°C por 60 min y 70 °C por 15 min. (Chumakov, 1994).

El cDNA sintetizado se agregó a las reacciones de la PCR que se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l. El contenido de la mezcla fue 2.5  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X (KCl 500 mM,

---

<sup>1</sup> In vitrogen, LIFE TECHNOLOGIES, California, USA

<sup>2</sup> J.T. Baker. Xalostoc, Edo. de México

<sup>3</sup> Técnica Química, S.A. México, D.F.

<sup>4</sup> AMRESCO, Solon, Ohio, USA

<sup>5</sup> Pharmacia Biotech

<sup>6</sup> Promega Corporation

<sup>7</sup> Applied Biosystems

Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 10 µg/ml)<sup>1</sup>, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 20X (1.5 mM)<sup>1</sup>, 0.5 µl de mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTP: dGTP, dATP, dTTP, dCTP) (1:1:1:1) 10 mM<sup>2</sup>, 0.5 µl de cada primer (Cuadro 5.12.), (10 pmol), 0.12 µl de Amplificasa ADN Polimerasa Termoestable (0.6 U)<sup>2</sup>, 4.5 µl de cada cDNA y agua DEPC cbp 25 µl (Covert y Splitter, 1995).

Las reacciones de la PCR se desarrollaron en un termociclador iClicler de acuerdo a las condiciones establecidas previamente (Cuadro 5.12.) Los resultados de 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).

**Cuadro 5.12. Secuencia de los iniciadores empleados, tamaño del fragmento amplificado para las diferentes citocinas de origen bovino y programas empleados.**

| Nombre de la citocina<br>Referencia Bibliográfica | Secuencia de los Iniciadores           | Tamaño del fragmento<br>amplificado cDNA (pb) y<br>Programa en Termociclador |
|---|--|--|
| IL-2<br>Cerreti <i>et al.</i> , 1986a             | 5'AGA TAC AAC TCT TGT CTT<br>GC 3'     | 457  |
|   | 5'AGT CAT TGT TGA GTA GAT<br>GC 3'     | 95°C 94°C 52°C 72°C 72°C<br>4' 30" 45" 1' 5"<br>30 CICLOS                    |
| IFN-γ<br>Cerreti <i>et al.</i> , 1986b            | 5' TTC AGA GCC AAA TTG TCT<br>CC 3'    | 184  |
|   | 5'CTG GAT CTG CAG ATC ATC<br>CA 3'     | 95°C 94°C 53°C 72°C 72°C<br>4' 1' 1' 1'30" 7"<br>31 CICLOS                   |
| IL-4<br>Heussler <i>et al.</i> , 1992             | 5'CTA TTA ATG GGT CTC ACC<br>TAC CA 3' | 311  |
|   | 3'CTT GCC AAG CTG TTG AGA<br>TTC 5'    | 94°C 94°C 51°C 72°C 72°C<br>5' 30" 45" 1' 5"<br>33 CICLOS                    |
| IL-10<br>Hash <i>et al.</i> , 1994                | 5'GTT GCC TGG TCT TCC TGG<br>CTG 3'    | 471  |
|   | 5'TAT GTA GTT GAT GAA GAT<br>GTC 3'    | 95°C 94°C 53°C 72°C 72°C<br>4' 1' 1' 1'30" 7"<br>30 CICLOS                   |
| β-actina<br>Degen <i>et al.</i> , 1983            | 5'ACC AAC TGG GAC GAC ATG<br>GAG 3'    | 890  |
|   | 3'GCA TTT GCG GTG GAC AAT<br>GGA 5'    | 94°C 94°C 52°C 72°C 72°C<br>5' 50" 50" 1'10" 10"<br>30 CICLOS                |

<sup>1</sup> Biotecnologías Universitarias. México D.F.

<sup>2</sup> Applied Biosystems.

La concentración de los iniciadores, así como la de los reactivos empleados en la realización de la PCR fueron optimizados utilizando DNA de linfocitos de bovinos sanos PPD negativos, libres de TB. Los iniciadores de bovino para la PCR fueron obtenidos de secuencias publicadas y las condiciones de temperatura de alineación y número de ciclos se determinó de acuerdo al Cuadro 5.12. Los iniciadores escogidos para trabajar fueron los siguientes: para el IFN- $\gamma$  la secuencia con productos de amplificación de 184 pb descrita por Cerreti *et al.* 1986a. 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 311 pb 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 positivo de amplificación de la PCR se usó el par de iniciadores de  $\beta$ -actina con productos de amplificación de 890 pb, cuya secuencia es descrita por Degen *et al.* 1983.

### **5.13. Empleo del IFN- $\gamma$ bovino recombinante utilizado como inmunomodulador**

El IFN- $\gamma$  bovino recombinante<sup>1</sup>, fue distribuido bajo la presentación de producto liofilizado con una concentración de 300 ng/ml y una ampolleta de 1 ml de agua destilada estéril para reconstituirse, este fue obtenido a través de pases de sobrenadante de cultivo de tejidos de *E. coli* con expresión de IFN- $\gamma$  bovino recombinante-liofilizado.

### **5.14. Características de la vacuna BCG de *M. bovis* empleada**

Se utilizó una vacuna BCG<sup>2</sup> de *M. bovis* liofilizada derivada de una cepa danesa atenuada de siembra Mérieux derivada de la cepa 1077 para uso intradérmico, utilizando 0.1 ml de vacuna reconstituida, cuya composición es: bacilos vivos atenuados, siembra Mérieux derivada de la cepa 1077 en concentración de 800 000 y 3 200 000 unidades formadoras de colonia (UFC), excipiente dextran-glucosa-tritón WR 1339-albúmina humana, agua inyectable estéril cbp 0.1 ml.

---

<sup>1</sup> Serotec, México.

<sup>2</sup> Aventis Pasteur, S.A.

### 5.15. Obtención de extractos proteicos de filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis* y *M. avium*

Los sobrenadantes de las cepas utilizadas para el experimento fueron *M. bovis* AN5 y *M. avium* D4 los cultivos fueron donados por un laboratorio de Biológicos Veterinarios<sup>1</sup>. Para poder obtener los sobrenadantes, los cultivos se incubaron a 37°C durante 6 semanas, las proteínas presentes en los filtrados de cultivo se precipitaron con cristales de sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] a una saturación final del 80%, con agitación constante a 4°C por 24 h. Al término este tiempo, la solución se centrifugó a 4°C por 60 min. a 10 000 rpm<sup>2</sup>, para empaquetar el precipitado, el cual fue resuspendido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, posteriormente se dializó totalmente contra PBS, en bolsas de diálisis<sup>2</sup>, con punto de corte de 12 a 14 kDa, a 4°C durante 36 horas con 4 cambios de 2 litros cada uno. Para comprobar la ausencia de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se agregó cloruro de bario, el producto final se designó como extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteínas se determinó por el método Bradford, posteriormente fue dividido en alícuotas de 1ml con una concentración de 35 µg/ml de proteína, que fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

### 5.16. Preparación del inóculo bacteriano para el desafío intratraqueal

El cultivo y la cuantificación del inóculo bacteriano se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- UNAM, partiendo de una cepa aislada de campo de *M. bovis*. La cepa fue identificada como no. 9930 y fue ajustada a 10<sup>4</sup> UFC/ml, para el desafío intratraqueal. Esta inicialmente se cultivó en placas de petri con agar Middlebrook 7H11 enriquecido con 10% de OADO (medio de enriquecimiento catalasa-dextrosa). Se tomaron de 3 a 5 colonias con características morfológicas semejantes y se sembraron en 15 ml de caldo Middlebrook 7H9 con 1% de OADC y 0.5 g/l de Tween 80 (para dispersar las bacterias), el cuál se incubó en un periodo de 8 días a 37°C en agitación constante a una velocidad de 100 rpm. Al final de la incubación el cultivo bacteriano fue transferido a un matraz con 135 ml de medio fresco para incubarlas en las mismas condiciones durante 11 días, tiempo requerido para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

La cosecha se realizó a partir del cultivo bacteriano, el cual se centrifugó en tubos de polipropileno de 50 ml durante 15 minutos a 3300 X g 2 veces con PBS 1X (cbp 50 ml). El paquete celular se resuspendió en 11 ml de medio RPMI-1640 con 15% de suero fetal bovino (SFB)<sup>3</sup>, y se paso 2

---

1 Productora nacional de biológicos veterinarios. PRONABIVE. México.

2 Spectra, México.

3 Park Memorial Institute.

veces a través de una aguja de calibre 29G X 13 mm utilizando una jeringa con el propósito de dispersar los agregados bacterianos. La suspensión bacteriana fue fraccionada en microtubos con un volumen de 1 ml y se almacenó a -80°C hasta su empleo.

Para la cuantificación de las unidades formadoras de colonia (UFC), se tomo una alícuota del inóculo preparado, se procedió a descongelar incubándola a temperatura de 37°C durante 40 minutos en baño María. Se realizaron diluciones décuples seriadas (450 µl de diluyente y 50 µl de soluto), sembrando 100 µl en placas de agar 7H11 a partir de la dilución 10<sup>-3</sup> a la 10<sup>-5</sup> por triplicado. Las placas se incubaron durante 3 a 4 semanas a una temperatura de 37°C. El conteo de las UFC se realizó obteniendo la cantidad de UFC por ml, aplicando la ecuación:  $(UFC)(FD)(10) \approx \text{bacterias/ml}$ , donde FD= factor de dilución.

### 5.17. Desafío.

Los animales de los diferentes grupos incluyendo el grupo control fueron desafiados intratraquealmente, a los seis meses después de haber sido inmunizados con BCG, DFPE y CFPE/IFN-γ, el desafío se realizó con una dosis de 10<sup>4</sup> UFC de la cepa virulenta de *M. bovis* no. 9930\*, aislada de casos clínicos. Para ello los animales fueron inoculados directamente en tráquea por medio de una aguja de calibre 18 con la cepa virulenta. Se tomaron muestras de sangre de los animales periódicamente para continuar con la evaluación de la respuesta inmune celular y la expresión de citocinas, la evaluación continuó hasta el sacrificio, que se efectuó entre los 5 y 6 meses después del desafío.

### 5.18. Inspección post-mortem

Para la inspección post-mortem, se analizaron los diferentes órganos y tejidos, así como los nódulos linfáticos y la zona de inoculación (primer tercio craneal de la tráquea). La interpretación fue la siguiente; se le asignó (+) a las lesiones > 0.2 cm y < 0.5 cm de diámetro, (++) a las lesiones > 0.5 cm y < 1.0 cm y (+++) a las lesiones >1.0 cm.

Para examinar los diferentes nódulos linfáticos (NL), éstos fueron seccionados en cortes delgados de 2 a 3 cm de grosor, a manera de exponer el mayor número de superficies de corte.

\* Gentilmente donado por el Dr. José Angel Gutiérrez Pabello. Depto. Bacteriología, FMVZ, UNAM.

En lo que corresponde a los órganos, fueron inspeccionados cuidadosamente el riñón, hígado, bazo y pulmón, siendo este último al que se le examinó visualmente la pleura pulmonar, y con palpación firme con los dedos se revisó todo el tejido pulmonar en búsqueda de tuberculos pequeños, y posteriormente los pulmones fueron incididos al azar en los diferentes lóbulos y se examinó las superficies de corte.

### 5.19. Análisis estadístico

Para demostrar que en un inicio, todos los animales eran iguales respecto a su estado inmunológico celular, fue necesario determinar su respuesta en densidad óptica de cada citocina, de manera tal que los productos de amplificación reflejan una emisión de luz, proporcional al producto amplificado, que es convertido a densidad óptica. Primeramente se utilizó un diseño completamente al azar, de acuerdo al siguiente modelo:

$$\hat{y}_{ij} = \mu + \Psi_i + \epsilon_j$$

En donde:

$\hat{y}_{ij}$  = Respuesta en densidad óptica de cada citocina

$\mu$  = Media general

$\Psi_i$  = Efecto del grupo i, (i= 1,2,3,4 grupos)

$\epsilon_j$  = Error aleatorio asociado a cada observación (j= 1,2,.....,24 animales)

Con un nivel de significancia  $P < 0.05$  en la prueba de la razón de la varianza (F)

Posteriormente se utilizó el siguiente modelo lineal:

$$\hat{y}_{ijk1} = \mu + G_i + \Psi_j + \eta_k + (G*\Psi) + (G*\eta) + (\Psi*\eta) + (G*\Psi*\eta) + (COV I) + \epsilon_1$$

donde :

$\hat{y}_{ijk1}$  = Respuesta en densidad óptica de cada Interleucina

$\mu$  = Media general

$G_i$  = Efecto de grupo i (i = 1,2,3,4 grupos)

|                 |   |  |
|-----------------|---|--|
| $\Psi_j$        | = | Efecto de muestreo j (j = 1,2,3, muestreos)      |
| $\eta_k$        | = | efecto de antígeno k (k = 1,2,3,4,5 antígenos)   |
| $(G*\Psi)$      | = | Interacción grupo- muestra                       |
| $(G*\eta)$      | = | Interacción grupo-antígeno                       |
| $(\Psi*\eta)$   | = | Interacción muestra-antígeno                     |
| $(G*\Psi*\eta)$ | = | Interacción grupo, muestra, antígeno             |
| $(Cov I)$       | = | Efecto inicial de cada animal en densidad óptica |
| $\varepsilon_k$ | = | Error aleatorio asociado a cada observación      |

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico STATISTICA para Windows versión 5.5. Se realizó un análisis de varianza, de acuerdo a los modelos establecidos, seguido de una prueba de Tuckey para diferente tamaño de muestra, utilizando la comparación múltiple de medias a nivel de significancia ( $P < 0.05$ ), para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas, al evaluar la respuesta de citocinas, ante la estimulación de los antígenos durante el primer muestreo de los animales antes de vacunar, contra los siguientes muestreos de animales vacunados y desafiados de cada grupo inmunizado.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Animales de estudio (bovinos)

Se procedió a evaluar la respuesta inmune celular antes de iniciado el experimento, de cada uno de los grupos, a través de la prueba intradérmica, de acuerdo a los criterios establecidos por la Campaña nacional contra la tuberculosis y brucelosis bovina (CANTB) con la finalidad de diagnosticar la TB y por otro lado se evaluó la producción de IFN- $\gamma$ , así como la existencia de anticuerpos antimicrobianos por la técnica de ELISA, utilizando CFPE de *M. bovis* y *M. avium*, estableciendo un punto de corte de 0.3 de densidad óptica (DO), como referencia de reactividad a antígenos micobacterianos (Díaz et al., 2003). Además, a los animales se les realizó la PCR de muestras obtenidas de moco nasal, para poder determinar la presencia de *M. bovis*. En todas las muestras correspondientes a las cuatro pruebas realizadas, los resultados fueron negativos.

### 6.2. Determinación de IFN- $\gamma$

Debido a la importancia de monitorear el comportamiento de la respuesta inmune celular *in vitro*, se evaluó la producción de IFN- $\gamma$ , al inicio del experimento, correspondiente al día 0, posteriormente a la 14<sup>a</sup> semana después de vacunados y de entre 5 y 6 meses después de desafiados.

En la figura 6.2.1. y Cuadro 6.2.1. se observan la producción promedio de IFN- $\gamma$  de cada grupo, obtenidos a partir de sobrenadante de cultivo celular, cuyos valores se expresan en DO, y que corresponden al primer muestreo, al inicio del experimento. Los linfocitos fueron estimulados *in vitro* con PPD bovino, Dip-z, complejo 45-47, Con A y sin estimular que equivale al control, cuyos valores de DO fueron: DO < 0.5 para los linfocitos estimulados con PPD bovino, Dip-z, Complejo 45-47 y el control, mientras que para las muestras estimuladas con Con A, presentaron una DO > 1.9 en todos los grupos. Cabe mencionar que para efectos de manejo de datos, se presentan los promedios de los resultados de cada grupo.

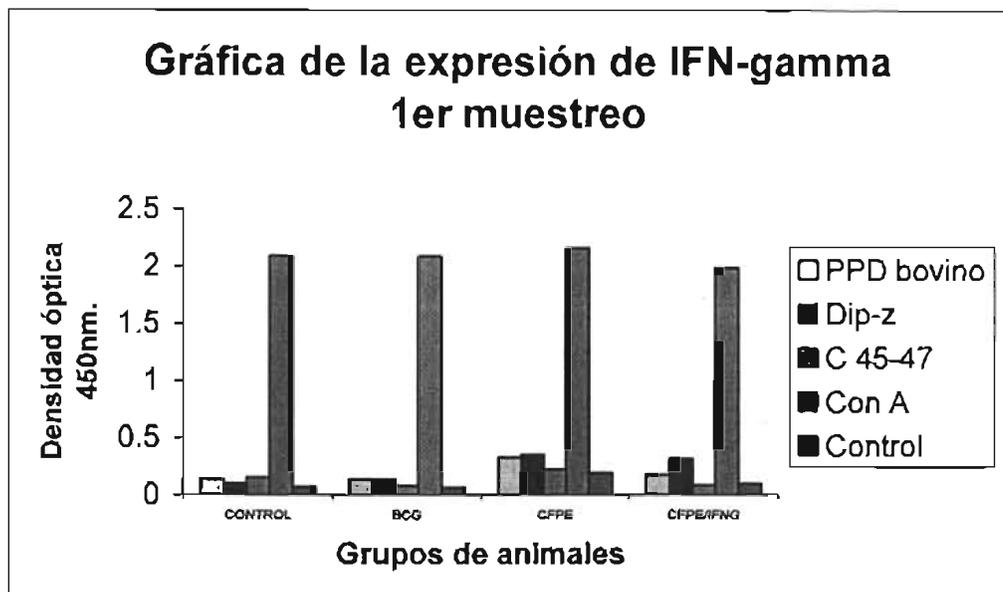


Figura 6.2.1. Valores de DO para la prueba de IFN- $\gamma$ , del primer muestreo. La producción de IFN- $\gamma$  fue cuantificada a partir del sobrenadante de los cultivos de linfocitos estimulados con PPD bovino, Dip-z, Complejo 45-47, Con A y sin estimular al inicio del experimento, expresado en DO a 450 nm.

CUADRO 6.2.1. Cuadro de resultados de producción de IFN- $\gamma$  en el primer muestreo.

| Antígeno   | GRUPOS VACUNAS |         |         |                        |
|------------|----------------|---------|---------|------------------------|
|            | CONTROL c      | BCG c   | CFPE c  | CFPE / IFN- $\gamma$ c |
| PPD bovino | 0.139 a        | 0.137 a | 0.327 a | 0.176 a                |
| Dip-z      | 0.102 a        | 0.135 a | 0.349 a | 0.312 a                |
| C 45-47    | 0.155 a        | 0.082 a | 0.22 a  | 0.084 a                |
| Con A      | 2.081 b        | 2.077 b | 2.146 b | 1.976 b                |
| Control    | 0.072 a        | 0.067 a | 0.189 a | 0.1 a                  |

- a No hay diferencias significativas.
- b Diferencias significativas.
- c No hay diferencias significativas entre grupos.
- d Diferencias significativas entre grupos.

En la figura 6.2.2. y cuadro 6.2.2. se muestran los valores promedio de DO para la prueba de IFN- $\gamma$ , del segundo muestreo, realizado en la 14<sup>ª</sup> semana después de la inmunización, cuyos valores de DO: DO < 0.5 para el sobrenadante de los linfocitos estimulados con PPD bovino, Dip-z, complejo 45-47, y el control, correspondientes a todos los grupos, sin embargo para los estimulados con Con A tuvieron valores de DO > 0.5 en todos los grupos.

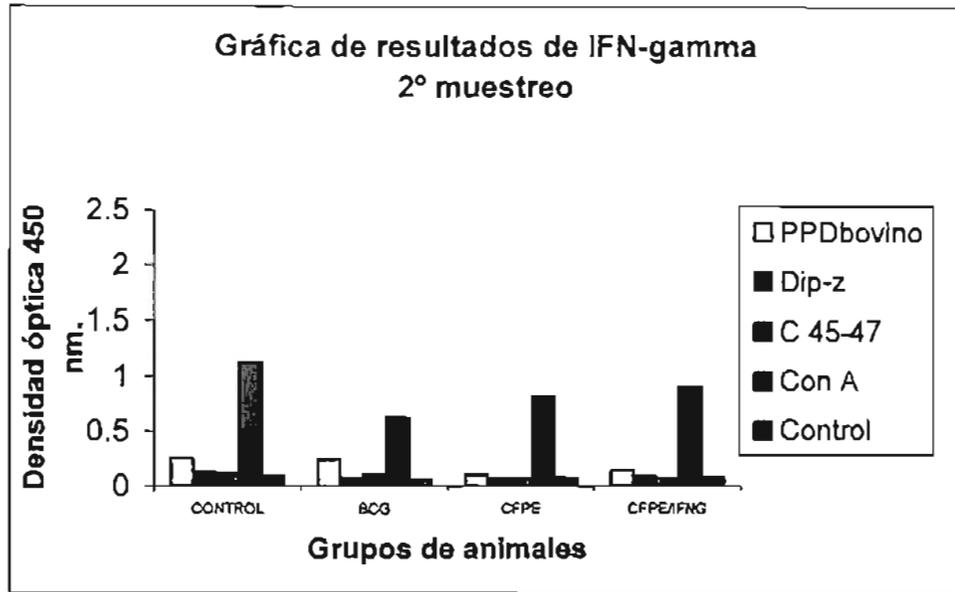


Figura 6.2.2. Valores de DO para la prueba de IFN- $\gamma$ , del segundo muestreo. La producción de IFN- $\gamma$  fue cuantificada a partir del sobrenadante de los cultivos de linfocitos estimulados con PPD bovino, Dip-z , Complejo 45-47, Con A y sin estimular posteriores a la Inmunización y desafío, expresado en DO a 450nm.

CUADRO 6.2.2 Cuadro de resultados de producción de IFN- $\gamma$  durante el segundo muestreo.

| Antígeno   | GRUPOS    |         | VACUNAS |                      |
|------------|-----------|---------|---------|----------------------|
|            | CONTROL c | BCG c   | CFPE c  | CFPE/IFN- $\gamma$ c |
| PPD bovino | 0.255 a   | 0.243 a | 0.109 a | 0.146 a              |
| Dip-z      | 0.131 a   | 0.074 a | 0.069 a | 0.09 a               |
| C 45-47    | 0.112 a   | 0.108 a | 0.068 a | 0.075 a              |
| Con A      | 1.127 b   | 0.624 b | 0.817 b | 0.904 b              |
| Control    | 0.098 a   | 0.063 a | 0.072 a | 0.077 a              |

a No hay diferencias significativas.

b Diferencias significativas.

c No hay diferencias significativas entre grupos.

d Diferencias significativas entre grupos.

En la figura 6.2.3. y el cuadro 6.2.3. se observan los promedios de valores de respuesta en DO para la prueba de IFN- $\gamma$ , que corresponde de 5 a 6 meses después del desafío de los animales y antes del sacrificio, cuyos valores de DO fueron:  $DO < 0.5$  para el sobrenadante de los linfocitos estimulados con PPD bovino, en los grupos control, BCG y CFPE-IFN-g, sin embargo para el grupo CFPE fue  $DO \leq 0.5$ ; para los linfocitos estimulados con Dip-z  $DO > 0.5$ , en los grupos control, BCG y CFPE-IFN-g, siendo  $DO < 0.5$  para el grupo inmunizado con CFPE; en el caso del complejo 45-47 para todos los grupos fue  $DO > 1.0$ ; para Con A la  $DO > 0.5$  en los grupos BCG y CFPE-IFN-g; solo para el control del grupo CFPE la  $DO > .05$

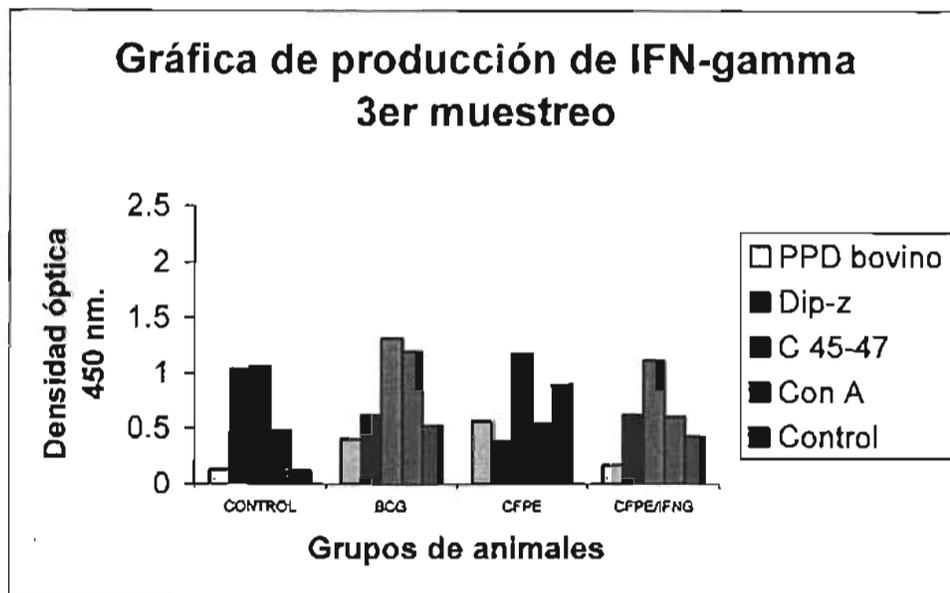


Figura 6.2.3. Valores de DO para la prueba de IFN- $\gamma$ , del tercer muestreo. La producción de IFN- $\gamma$  fue cuantificada a partir del sobrenadante de los cultivos de linfocitos estimulados con PPD bovino, Dip-z, Complejo 45-47, Con A y sin estimular antes del sacrificio de los animales, en DO de 450nm.

CUADRO 6.2.3. Cuadro de resultados de producción de IFN- $\gamma$  durante el tercer muestreo.

| Antígeno   | GRUPOS    |         | VACUNAS |                      |
|------------|-----------|---------|---------|----------------------|
|            | CONTROL c | BCG d   | CFPE d  | CFPE/IFN- $\gamma$ d |
| PPD bovino | 0.138 a   | 0.409 a | 0.563 b | 0.167 a              |
| Dip-z      | 1.037 b   | 0.622 b | 0.386 a | 0.622 b              |
| 45-47      | 1.061 b   | 1.311 b | 1.18 b  | 1.11 b               |
| Con A      | 0.487 a   | 1.193 b | 0.544 b | 0.606 b              |
| Control    | 0.131 a   | 0.525 b | 0.896 b | 0.428 a              |

- a No hay diferencias significativas.
- b Diferencias significativas.
- c No hay diferencias significativas entre grupos.
- d Diferencias significativas entre grupos.

### 6:3. Expresión de citocinas por grupo y por muestreo

#### 6.3.1. Primer muestreo

Estos valores fueron obtenidos del promedio por grupo de la intensidad relativa porcentual en respuesta de las diferentes citocinas con respecto a  $\beta$ -actina del grupo control. En la figura 6.3.1., es posible observar los productos de amplificación de  $\beta$ -actina (890 pb), en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio al 1%, correspondiente a las células sin estimular utilizadas como

control de todos los animales, donde los 24 animales mostraron amplificación para esta citocina con diferente intensidad.

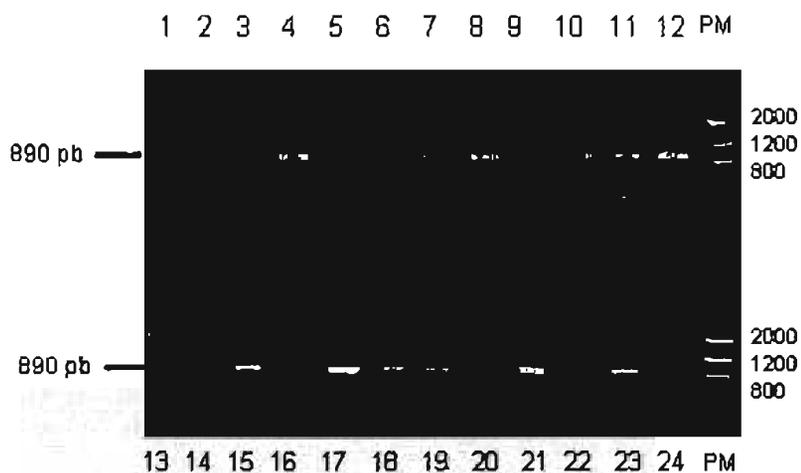


Figura 6.3.1. Gel de productos de amplificación de la PCR.  $\beta$ -actina ( producto de 890 pb), Carriles 1-24 muestras de células sin estimular, Carriles PM marcadores de peso molecular.

En la figura 6.3.2. se observan los productos de amplificación del IFN- $\gamma$  (184 pb) de muestras de los animales, donde se pudo determinar su expresión, observable en los carriles 3, 5, 6, 7, 8 y 13.

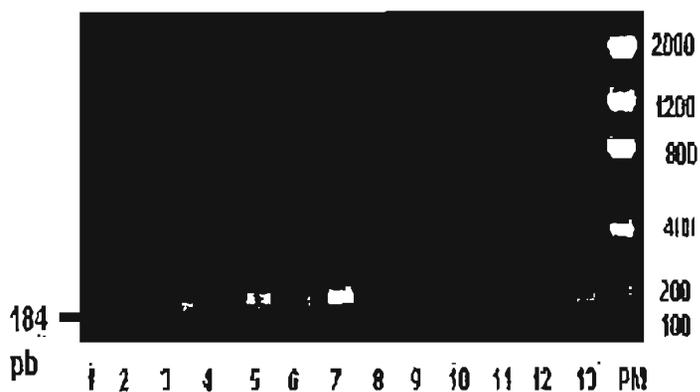


Figura 6.3.2. Gel de productos de amplificación de la PCR. IFN- $\gamma$  (184 pb). Carriles 1, 6 y 11 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2, 7 y 12 muestras estimuladas con Dip-z. Carriles 3, 8 y 13 muestras estimuladas con complejo 45-47. Carriles 4 y 9 muestras estimuladas con Con A. Carriles 5 y 10 muestras sin estimular. Carril PM marcador de peso molecular.

La figura 6.3.3. es representativa donde se visualizan los productos de amplificación de la IL-2 (457 pb ) de muestras de los animales durante el segundo muestreo del grupo BCG. En los carriles 3, 11 y 13 es posible observar los productos de amplificación para esta citocina.

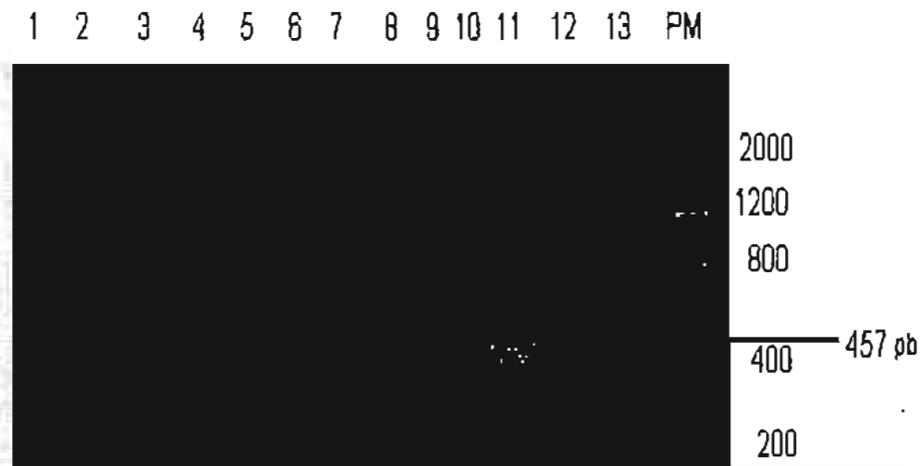


Figura 6.3.3. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-2 (457 pb ). Carriles 1, 8 y 11 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2,7 y 12 muestras estimuladas con Dip-z. Carriles 3, 8 y 13 muestras estimuladas con complejo 45-47. Carriles 4 y 9 muestras estimuladas con Con A. Carriles 5 y 10 muestras sin estimular. Carril PM marcador de peso molecular.

En la figura 6.3.4. es posible observar los productos de amplificación de la IL-4 (311 pb) de muestras de animales durante el 3er muestreo. En los carriles 2, 6 y 10 se observa la expresión de esta citocina. En la figura 6.3.5. los productos de amplificación de la IL-10 (471 pb), se pueden observar de muestras de animales obtenidas durante el 3er muestreo. En los carriles 2, 9, 10, 16, 25 y 26 se observan los productos de amplificación para esta citocina.

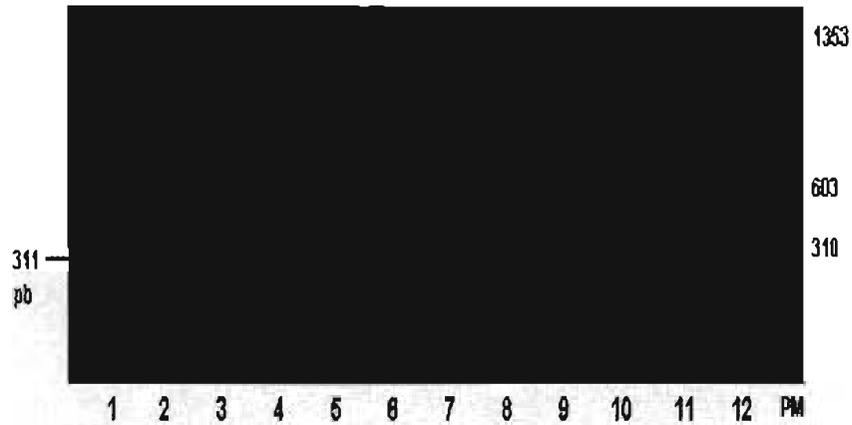


Figura 6.3.4. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-4 (311 pb ). Carriles 1, 6 y 11 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2, 7 y 12 muestras estimuladas con Dip-z. Carriles 3, 8 muestras estimuladas con complejo 45-47. Carriles 4 y 9 muestras estimuladas con Con A. Carriles 5 y 10 muestras sin estimular. Carril PM marcador de peso molecular.

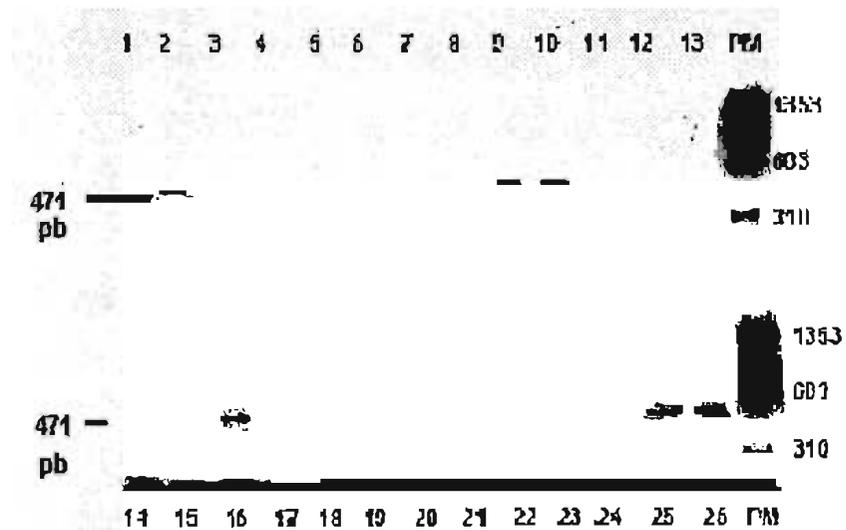


Figura 6.3.5. Gel de productos de amplificación de la PCR. IL-10 (471 pb ). Carriles 1, 6, 11, 16, y 21 muestras estimuladas con PPD bovino. Carriles 2, 7, 12, 17 y 22 muestras estimuladas con Dip-z. Carriles 3, 8, 13, 18 y 23 muestras estimuladas con complejo 45-47. Carriles 4, 9, 14, 19 y 24 muestras estimuladas con Con A. Carriles 5, 10, 15 y 20 muestras sin estimular. Carril PM marcador de peso molecular.

En la figura 6.3.1.1. y cuadro 6.3.1.1. se puede observar al inicio del experimento, la respuesta a la estimulación *in vitro* de los linfocitos, con los diferentes antígenos, estos respondieron induciendo una expresión de la citocina IFN- $\gamma$ , seguida de la citocina IL-2 en menor proporción que en el caso de la anterior, pero en particular la respuesta ante la estimulación con el complejo 45-47 provocó una respuesta similar de ambas citocinas, incluso una expresión escasamente perceptible de la citocina IL-10, que en el caso de estimulación con los otros antígenos no se provocó una respuesta indicadora, siendo así el mismo caso para IL-4. En general la expresión de las citocinas fue no significativa.

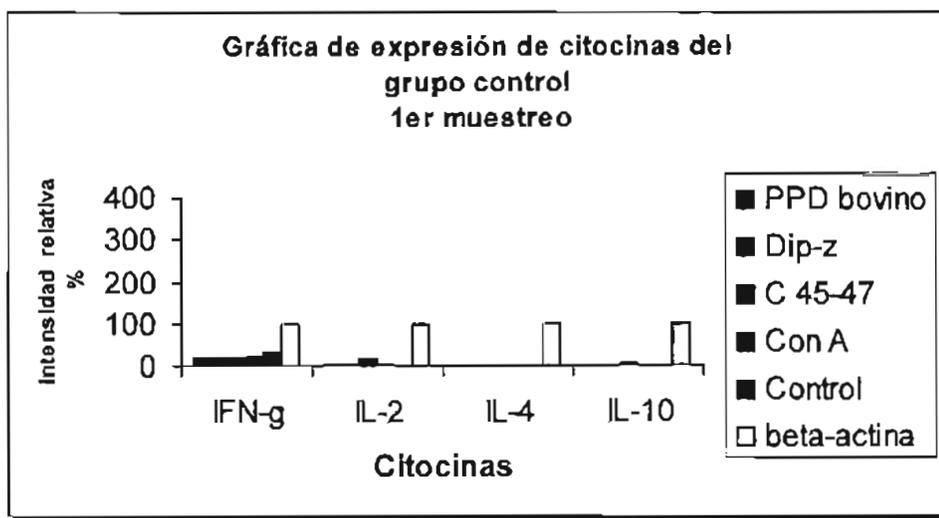


Figura 6.3.1.1. Resultados de PCR para el grupo control en el primer muestreo. Se observa la expresión promedio de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etíldo.

CUADRO. 6.3.1.1. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ c | IL-2 c  | IL-4 c | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|--------|---------|
| PPD bovino      | 17.19 a         | 4.64 a  | 0.84 a | 0.25 a  |
| Dip-z           | 16.77 a         | 4.83 a  | 0.44 a | 0.28 a  |
| C45-47          | 19.69 a         | 20.69 a | 1.15 a | 3.82 a  |
| Con A           | 24.32 a         | 3.72 a  | 0.41 a | 0.13 a  |
| Control         | 32.31 a         | 1 a     | 0.33 a | 0.01 a  |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100    | 100     |

- a No hay diferencias significativas entre antígenos.
- b Diferencias significativas entre antígenos.
- c No hay diferencias significativas entre citocinas.
- d Diferencias significativas entre citocinas.

En la figura 6.3.1.2. y Cuadro 6.3.1.2. se observa en los animales del grupo BCG, la respuesta a la estimulación *in vitro* de los linfocitos, con los diferentes antígenos, estos respondieron induciendo una expresión de la citocina IFN- $\gamma$ , de manera significativa, sobre todo para el caso de PPD bovino, pero en el caso de la IL-2, IL-4 e IL-10 no hubo respuesta significativamente perceptible.

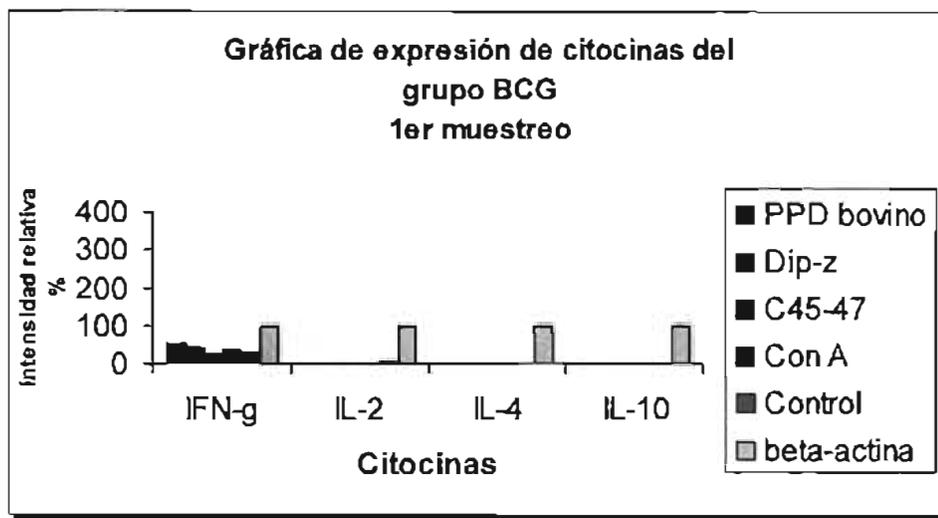


Figura 6.3.1.2. Resultados de RT-PCR para el grupo BCG en el primer muestreo. Se observa la expresión promedio de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio.

CUADRO. 6.3.1.2. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 c | IL-4 c | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|--------|--------|---------|
| PPD bovino      | 53.12 b         | 0.85 a | 2.45 a | 1.56 a  |
| Dip-z           | 39.96 a         | 0.3 a  | 1.41 a | 1.48 a  |
| C45-47          | 24.59 a         | 0.19 a | 0.29 a | 1.14 a  |
| Con A           | 37.41 a         | 0.18 a | 0.48 a | 0.32 a  |
| Control         | 28.6 a          | 2.86 a | 0.42 a | 0.22 a  |
| $\beta$ -actina | 100             | 100    | 100    | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

En el caso de los animales asignados al grupo CFPE, el promedio de respuesta en intensidad relativa, presentó una respuesta ante todos los antígenos de IFN- $\gamma$ , sobre todo al ser estimulados con Con A, Dip-z y con PPD bovino, de manera significativa; en una menor proporción respuesta de IL-2, así como IL-4 e IL-10, ambas respuestas menores al 10% de la respuesta de las dos primeras, visible en la figura 6.3.1.3. y Cuadro 6.3.1.3.

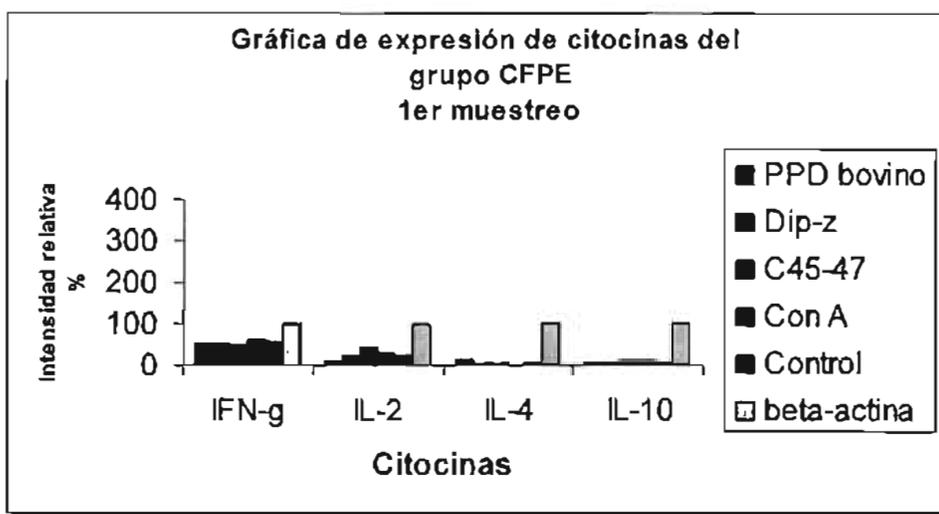


Figura 6.3.1.3. Resultados de RT-PCR para el grupo CFPE en el primer muestreo. Se observa la expresión promedio de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etidio.

CUADRO. 6.3.1.3. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 c  | IL-4 c  | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|---------|---------|
| PPD bovino      | 51.12 b         | 9.52 a  | 13.46 a | 3.87 a  |
| Dip z           | 53.47 b         | 22.47 a | 5.29 a  | 2.39 a  |
| C45-47          | 45.89 a         | 41.84 a | 6.18 a  | 7.64 a  |
| Con A           | 64.03 b         | 27.22 a | 2.33 a  | 7.75 a  |
| Control         | 56.39 b         | 21.79 a | 6.72 a  | 4.92 a  |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100     | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

Es observable en la figura 6.3.1.4. y Cuadro 6.3.1.4. que los animales que serían asignados al grupo CFPE, el patrón de respuesta a la estimulación *in vitro* de sus linfocitos, con los diferentes antígenos, estos respondieron induciendo una expresión de la citocina IFN- $\gamma$ , de manera no significativa y muy similar entre todos los antígenos menos el control; se presentó el mismo caso

de la IL-2 en mayor proporción que en el caso de la citocina anterior, pero principalmente bajo la estimulación del PPD bovino; las respuestas para IL-4 e IL-10 son poco perceptibles, por no tanto no significativas.

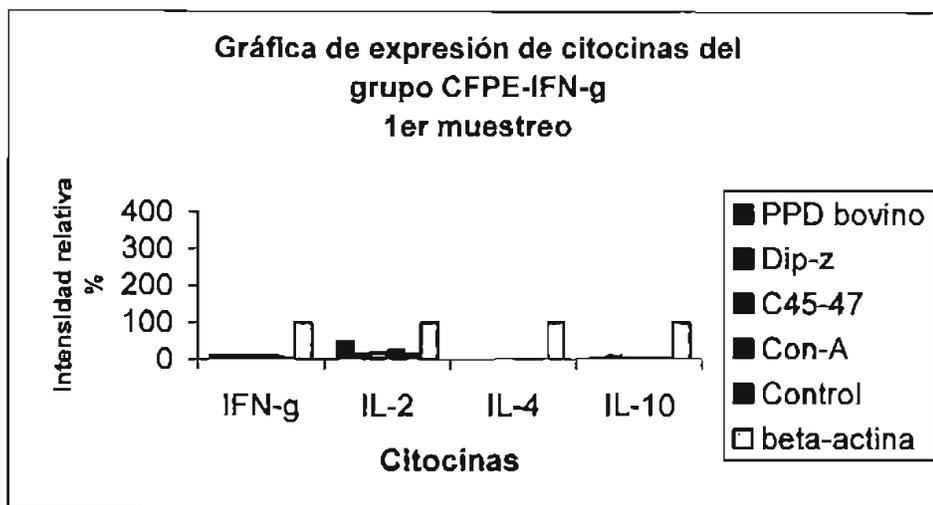


Figura 6.3.1.4. Resultados de RT-PCR para el grupo CFPE-IFN-g en el primer muestreo. Se observa la expresión promedio de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio.

CUADRO. 6.3.1.4. Expresión de citocinas en porcentajes de Intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ c | IL-2 c  | IL-4 c | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|--------|---------|
| PPD bovino      | 10.66 a         | 48.39 a | 2.76 a | 3.37 a  |
| Dip z           | 12.95 a         | 16.42 a | 3.65 a | 9.62 a  |
| C45-47          | 12.95 a         | 20.69 a | 4.76 a | 1.59 a  |
| Con A           | 10.01 a         | 24.58 a | 1.9 a  | 5.63 a  |
| Control         | 5.09 a          | 14.44 a | 1.14 a | 1.66 a  |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100    | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

### 6.3.2 Segundo muestreo

Los resultados que a continuación se expresan, muestran el patrón de respuesta de citocinas, ante la estimulación *in vitro* de los linfocitos con los mismos antígenos utilizados al principio del experimento. Estos valores fueron obtenidos posteriores a la conformación de grupos, en la

semana 14 correspondiente a la inmunización, se muestran en intensidad relativa porcentual con respecto a  $\beta$ -actina.

En la Figura 6.3.2.1. y Cuadro 6.3.2.1. se observan los valores de respuesta, del grupo control correspondiente a los animales que no recibieron inmunización y donde es visible en primer lugar el aumento en la expresión del IFN- $\gamma$ , sobre todo al ser estimulados con PPD bovino y Con A, con los otros antígenos la respuesta fue inferior; para IL-2 la respuesta fue visible con la estimulación de PPD bovino y el complejo 45-47, y en menor proporción con los otros antígenos; IL-4 tuvo un expresión mayor para aquellas que fueron estimulados con PPD bovino, sin embargo con los otros antígenos hubo una respuesta disminuida; en el caso de IL-10 las respuestas fueron muy similares para los antígenos PPD bovino, Dip-z, Complejo 45-47 y Con A, para el control la respuesta fue disminuida, en general no hay diferencias significativas entre los resultados con las citocinas IL-2, IL-4 e IL-10.

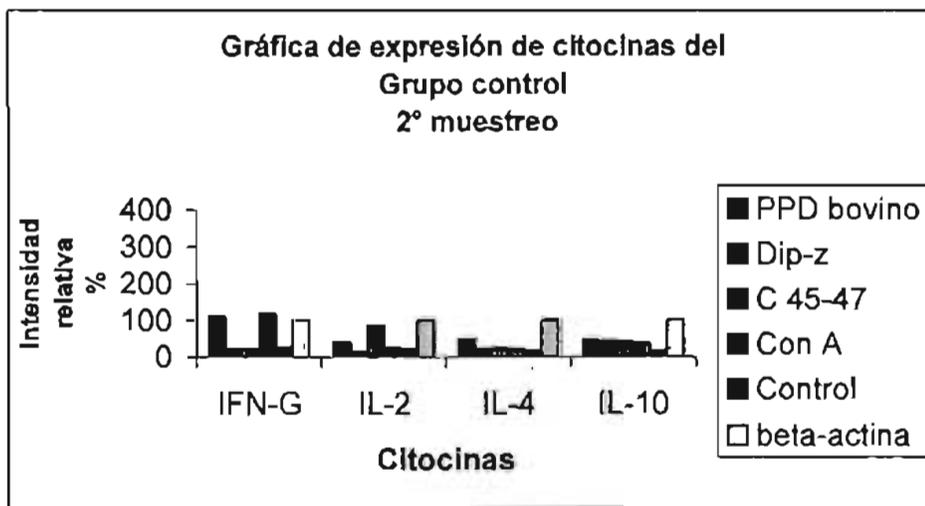


Figura.6.3.2.1. Resultados de RT-PCR para el grupo control en el segundo muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como el porcentaje de la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etíldio.

CUADRO. 6.3.2.1. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 c  | IL-4 c  | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|---------|---------|
| PPD bovino      | 111.46 b        | 40.86 a | 47.25 a | 45.69 a |
| Dip-z           | 20.67 a         | 13.9 a  | 21.31 a | 43.01 a |
| C45-47          | 22.26 a         | 86 b    | 24.24 a | 41.08 a |
| Con A           | 119.58 b        | 25.21 a | 20.29 a | 36.97 a |
| Control         | 28.07 a         | 20.36 a | 15.16 a | 16.4 a  |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100     | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

Es posible observar en la figura 6.3.2.2. y Cuadro 6.3.2.2. los resultados de la expresión de las citocinas, donde destaca la expresión de IFN- $\gamma$ , de manera significativa, sobre todo de aquellos animales estimulados con PPD bovino y Dip-z; IL-2 tuvo una respuesta muy baja para todos los antígenos; IL-4 la respuesta fue ligeramente superior a la IL-2, pero poco perceptible; IL-10 tuvo una respuesta muy similar entre todos los antígenos, sin embargo su respuesta fue mayor en comparación con IL-2 a IL-4, pero menor que el promedio de IFN- $\gamma$ , por lo tanto no hay diferencias significativas.

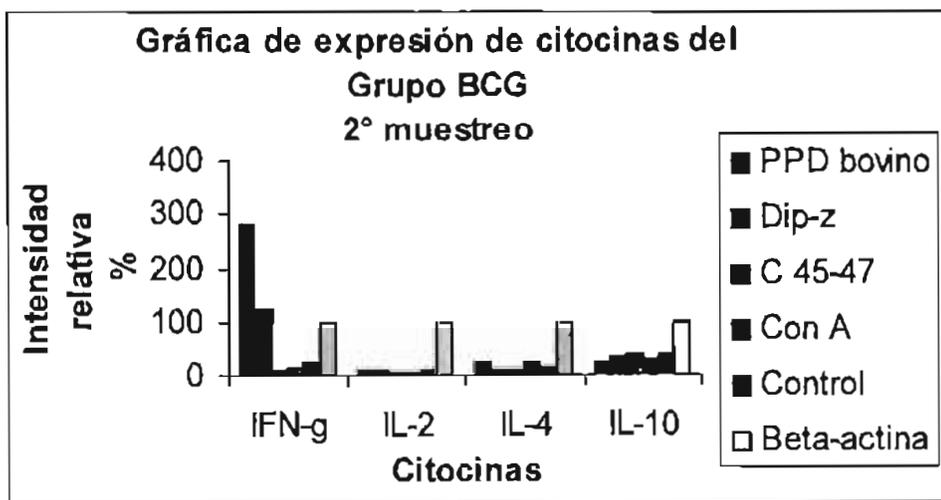


Figura.6.3.2.2. Resultados de RT-PCR para el grupo BCG en el segundo muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la Intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etidio.

CUADRO. 6.3.2.2. Expresión de citocinas en porcentajes de Intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 c  | IL-4 c  | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|---------|---------|
| PPD bovino      | 282.25 b        | 11.79 a | 26.84 a | 25.4 a  |
| Dip-z           | 123.38 b        | 9.53 a  | 9.38 a  | 35.81 a |
| C 45-47         | 7.9 a           | 5.59 a  | 8.73 a  | 37.42 a |
| Con A           | 16.45 a         | 6.8 a   | 26.67 a | 30.07 a |
| Control         | 24.37 a         | 8.63 a  | 14.28 a | 38.1 a  |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100     | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

En el grupo correspondiente a CFPE, figura 6.3.2.3. y cuadro 6.3.2.3. no hubo respuesta de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, e IL-10 ante ninguno de los antígenos, sin embargo si hubo respuesta apenas perceptible, por lo tanto no significativa, de IL-4 para las células estimuladas con Dip-z y Con A.

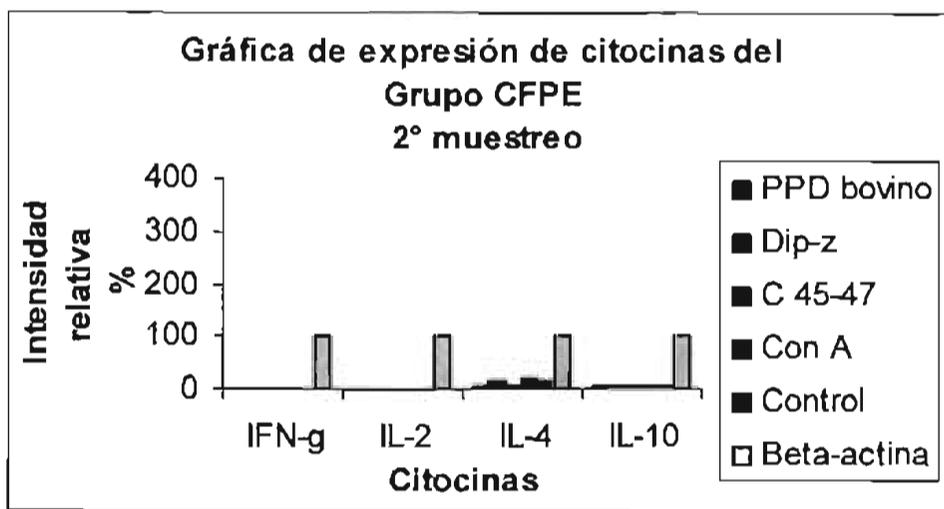


Figura. 6.3.2.3. Resultados de RT-PCR para el grupo CFPE en el segundo muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los geles, teñidos con bromuro de etíldio.

CUADRO. 6.3.2.3. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ | c | IL-2 | c | IL-4  | d | IL-10 | c |
|-----------------|---------------|---|------|---|-------|---|-------|---|
| PPD bovino      | 0             | a | 1.07 | a | 6.04  | a | 4.8   | a |
| Dip-z           | 0             | a | 0.44 | a | 15.85 | b | 4.52  | a |
| C45-47          | 0             | a | 0.83 | a | 5.33  | a | 5.85  | a |
| Con A           | 0             | a | 1.11 | a | 18.55 | b | 5.2   | a |
| Control         | 0             | a | 0.57 | a | 16.36 | b | 2.47  | a |
| $\beta$ -actina | 100           |   | 100  |   | 100   |   | 100   |   |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

En la figura 6.3.2.4. se observa nula expresión de respuesta de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10, ante todos los antígenos para la estimulación con todos los antígenos; IL-4 tuvo una respuesta significativa para las células estimuladas con PPD bovino, y en segundo término para el resto de los otros antígenos.

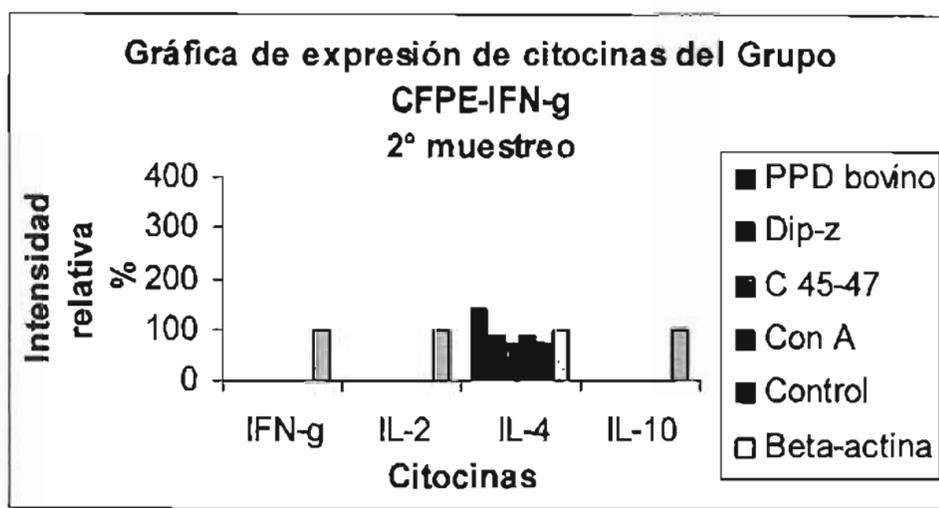


Figura. 6.3.2.4. Resultados de RT-PCR para el grupo CFPE-IFN- $\gamma$  en el segundo muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio.

CUADRO. 6.3.2.4. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ | c | IL-2 | c | IL-4   | d | IL-10 | c |
|-----------------|---------------|---|------|---|--------|---|-------|---|
| PPD bovino      | 0             | a | 0    | a | 140.76 | b | 0     | a |
| Dip-z           | 0             | a | 0    | a | 89.31  | b | 0     | a |
| C 45-47         | 0             | a | 0    | a | 75.16  | b | 0     | a |
| Con A           | 0             | a | 0    | a | 90.12  | b | 0     | a |
| Control         | 0             | a | 0    | a | 74.54  | b | 0     | a |
| $\beta$ -actina | 100           |   | 100  |   | 100    |   | 100   |   |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

### 6.3.3. Tercer muestreo

Los siguientes resultados demuestran los valores promedio por grupo de la respuesta a la estimulación *in vitro* de los linfocitos con los antígenos utilizados desde el comienzo del experimento son expresados en intensidad relativa porcentual con respecto a  $\beta$ -actina. Estos

valores fueron obtenidos después del desafío de entre 5 y 6 meses y antes del sacrificio de los animales.

En la siguiente figura 6.3.3.1. y cuadro 6.3.3.1. es posible observar la respuesta de las diferentes citocinas a la estimulación con los antígenos descritos previamente donde IFN- $\gamma$  e IL2, mostraron una eficiente producción de estas ante todos los antígenos evaluados, ya que entre ellos tuvieron respuesta similar se considera que no hubo diferencias significativas, sin embargo estas diferencias se hicieron observables comparadas con IL-4 e IL-10 donde no hubo evidencias de expresión representativas.

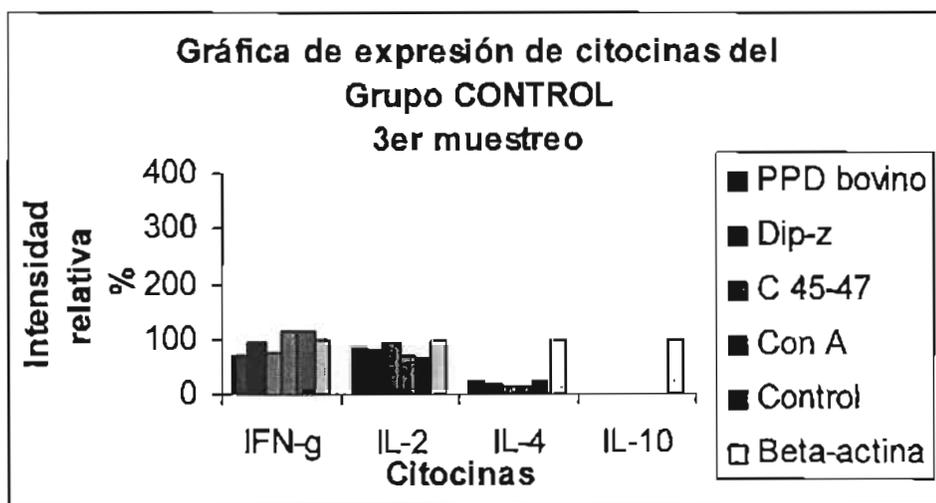


Figura. 6.3.3.1. Resultados de RT-PCR para el grupo control en el tercer muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio.

CUADRO. 6.3.3.1. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 d  | IL-4 c  | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|---------|---------|
| PPD bovino      | 69.87 b         | 85.84 b | 24.63 a | 0 a     |
| Dip-z           | 94.81 b         | 81.65 b | 16.56 a | 0 a     |
| C 45-47         | 74.74 b         | 96.04 b | 15.5 a  | 0 a     |
| Con A           | 114.38 b        | 72.07 b | 15.08 a | 0 a     |
| Control         | 112.86 b        | 64.2 b  | 21.29 a | 0 a     |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100     | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

Los resultados de la figura 6.3.3.2. y cuadro 6.3.3.2. revelan una respuesta significativa de IFN- $\gamma$  ante la estimulación de todos los antígenos pero sobresalen el complejo 45-47 y Con A; seguida de la expresión IL-2 que es ligeramente perceptible en comparación con IFN- $\gamma$ , pero en similar nivel entre todos los antígenos para esta citocina; los valores para IL-4 casi no se expresaron; para IL-10 no hubo expresión, ante ningún antígeno.

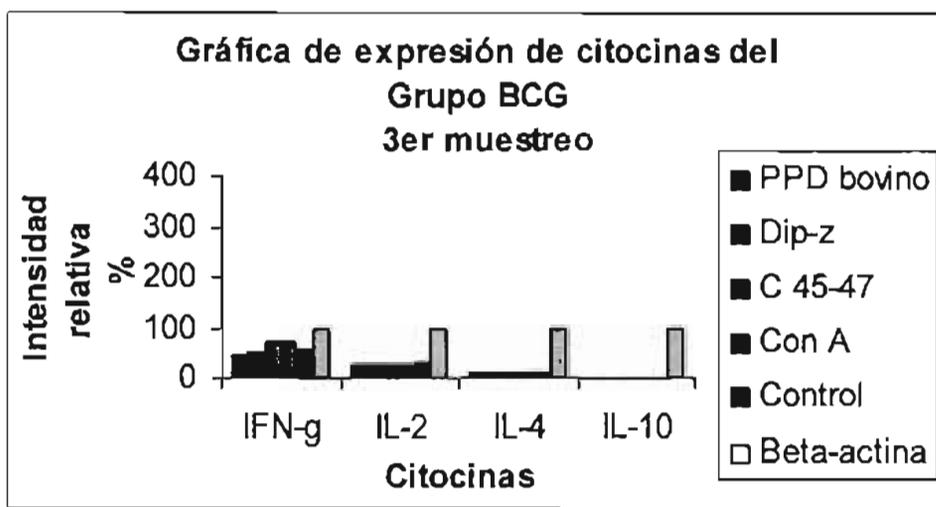


Figura. 6.3.3.2. Resultados de RT-PCR para el grupo BCG en el tercer muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, tefidos con bromuro de etidlo.

CUADRO. 6.3.3.2. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 c  | IL-4 c  | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|---------|---------|
| PPD bovino      | 44.66 a         | 24.87 a | 10.76 a | 0 a     |
| Dip-z           | 51.53 b         | 25.12 a | 7.96 a  | 0 a     |
| C 45-47         | 69.48 b         | 25 a    | 8.3 a   | 0 a     |
| Con A           | 70.46 b         | 25.29 a | 8.04 a  | 0 a     |
| Control         | 58.17 b         | 28.3 a  | 7.85 a  | 0 a     |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100     | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

En la figura 6.3.3.3. y cuadro 6.3.3.3. se muestran los resultados del grupo inmunizado con CFPE, donde la respuesta de expresión de IFN- $\gamma$  es poco evidente para todos los antígenos, pero ligeramente mayor para el antígeno PPD bovino; IL-2 solo respondió al estímulo con PPD bovino; IL-4 no tuvo respuesta; IL-10 respondió a todos los antígenos de manera poco perceptible, donde para todas las citocinas no fue significativa su respuesta..

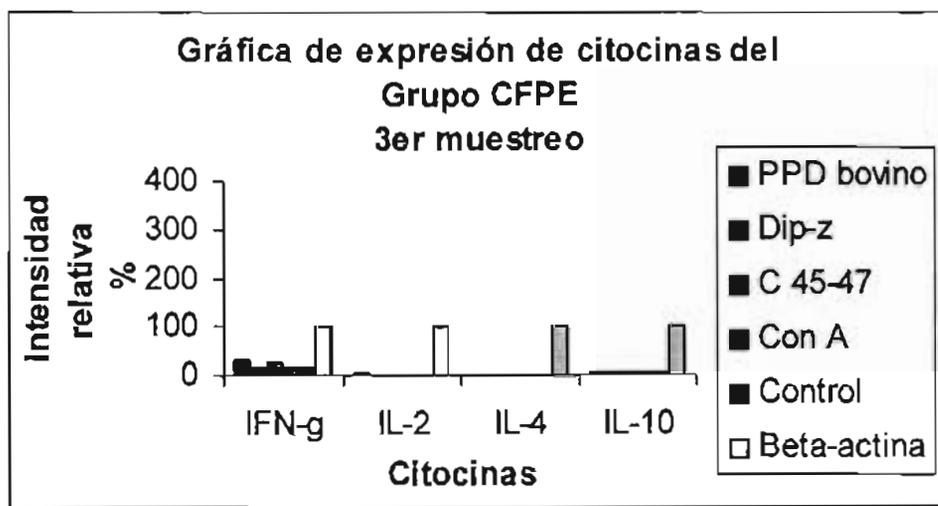


Figura. 6.3.3.3. Resultados de RT-PCR para el grupo CFPE en el tercer muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etidio.

CUADRO. 6.3.3.3. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 c  | IL-4 c  | IL-10 c |
|-----------------|-----------------|---------|---------|---------|
| PPD bovino      | 33.35 a         | 3.59 a  | 1.02 a  | 3.11 a  |
| Dip-z           | 14.04 a         | 1.46 a  | 0.56 a  | 4.34 a  |
| C 45-47         | 24.93 a         | 0.059 a | 0.059 a | 3.55 a  |
| Con-A           | 16.89 a         | 2 a     | 0.74 a  | 4.36 a  |
| Control         | 14.92 a         | 0.6 a   | 0.9 a   | 5.19 a  |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100     | 100     |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

La figura 6.3.3.4. y cuadro 6.3.3.4. muestra los resultados de la respuesta de IFN- $\gamma$ , donde reflejo diferencias significativas en valores superiores al total de  $\beta$ -Actina, al ser estimuladas con todos los antígenos; IL-2 e IL-4 tuvieron una respuesta mínima para todos los antígenos, a comparación con la citocina IFN- $\gamma$ ; e IL-10 en general tuvo una respuesta menor a IFN- $\gamma$ , pero mayor que IL-2 e IL-4, para todos los antígenos, por lo tanto si hubo diferencias significativas.

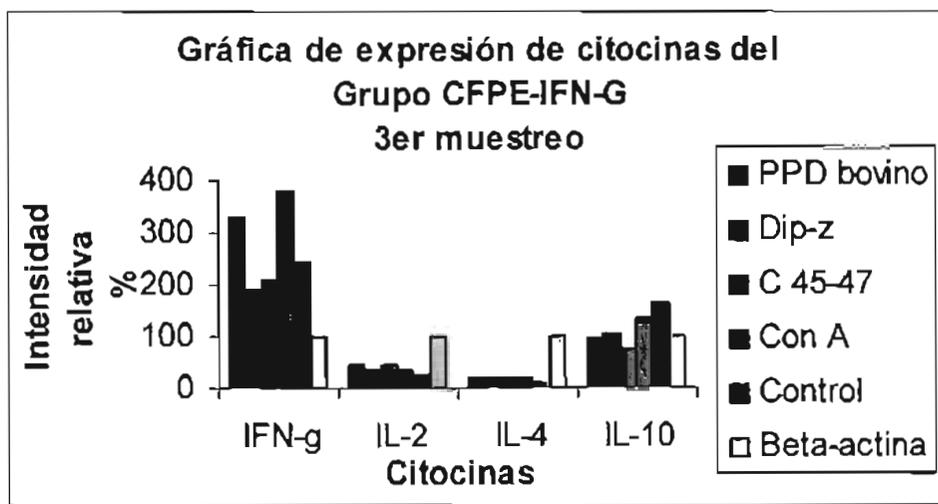


Figura. 6.3.3.4. Resultados de RT-PCR para el grupo CFPE- IFN- $\gamma$  en el tercer muestreo. Se observa la expresión promedio por grupo de las citocinas estudiadas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10). Los resultados están representados como la intensidad relativa de las bandas en los gels, teñidos con bromuro de etíldo.

CUADRO. 6.3.3.4. Expresión de citocinas en porcentajes de intensidad relativa de  $\beta$ -actina.

| ANTIGENO        | IFN- $\gamma$ d | IL-2 c  | IL-4 c  | IL-10 d  |
|-----------------|-----------------|---------|---------|----------|
| PPD bovino      | 331.38 b        | 42.96 a | 17.59 a | 94.73 b  |
| Dip-z           | 192.27 b        | 33.55 a | 19.71 a | 107.13 b |
| C 45-47         | 208.89 b        | 44.12 a | 21.56 a | 76.09 b  |
| Con A           | 378.42 b        | 36.41 a | 18.4 a  | 136.02 b |
| Control         | 243.25 b        | 26.15 a | 11.87 a | 163.41 b |
| $\beta$ -actina | 100             | 100     | 100     | 100      |

a No hay diferencias significativas entre antígenos.

b Diferencias significativas entre antígenos.

c No hay diferencias significativas entre citocinas.

d Diferencias significativas entre citocinas.

## 6.4. Inspección Post-mortem

Se obtuvieron los siguientes resultados en órganos, NL y zona de inoculación: El grupo 1, que permaneció como control, siendo el que mostró mayor número y grado de lesiones, además en todos los animales de este grupo se observaron lesiones, el tipo de lesión que presentaron todos los NL fue de linfadenitis supurativa, ampliamente diseminadas, los más afectados fueron los NL cervicales profundos, observándose lesión en cuatro animales de este grupo con un diámetro > 2.5 cm. En tres animales los NL mediastínicos tuvieron lesión > 0.8 cm de diámetro. En 2 animales los NL retrofaríngeos medios, presentaron lesiones de > 0.5 cm hasta 3.0 cm. En los NL cervicales superficiales (antes pre-escapulares), solo dos animales presentaron lesión de > 0.3 a 1.0 cm. Un solo animal tuvo lesión en NL retrofaríngeo lateral con una lesión > 2.5 cm y otro una lesión en NL mandibular de 1.0 cm aproximadamente. En lo que respecta a la zona de inoculación hubo lesión en tres animales de tamaño > 0.5 cm hasta 3.0 cm de aspecto purulento. En el pulmón de un solo animal se observó una lesión < 0.5 cm de aspecto ligeramente purulento, en el lóbulo caudal derecho.

El grupo 2, vacunado con BCG, fue el que menos lesiones mostró de todos los grupos, encontrándose dos animales totalmente libres de lesiones, un animal con lesión solo en la zona de inoculación, un animal con lesión única en NL mediastínicos < 0.7cm y otro animal con pequeñas lesiones en NL cervicales profundos y mediastínicos < 0.3 cm. Y por último, solo un animal mostró lesión en los siguientes: NL retrofaríngeos medios < 1.0 cm, NL cervicales profundos > 1.0 cm y en NL traqueobronquiales y mediastínicos < 1.0 cm

En lo que corresponde al grupo 3, inmunizado con CFPE de *M. bovis*, las lesiones fueron menos extensas y de menor grado en los NL, la mayoría de estos fueron muy localizadas, cercanas a la zona de inoculación y la lesión fue de linfadenitis supurativa. Solo un animal presentó lesión > 1 cm de diámetro en un NL, otro animal tuvo lesión en 5 NL, 2 de estas < 0.7 cm y 3 lesiones < 0.3 cm. Solo un animal fue completamente libre y tres animales con mínimas lesiones. Los NL afectados fueron los siguientes: 5 animales tuvieron lesión en NL cervicales profundos con un diámetro < 0.3 cm y solo uno > 1.0 cm. En 2 animales los NL retrofaríngeos medios, presentaron lesiones < 0.5 cm. Ningún animal mostró lesión en la zona de inoculación.

En el grupo 4, inmunizados con CFPE más IFN- $\gamma$ , solo un animal se encontró libre de lesiones sugestivas a TB; los demás animales, sí mostraron lesiones pero comparado con el grupo control las lesiones no fueron tan frecuentes, y se encontraron localizadas y de menor tamaño. El NL más afectados en este grupo fueron los cervicales profundos, encontrando lesiones < 0.2 cm hasta > 0.1 cm en cinco animales. Los resultados a la necropsia se muestran mas claramente en la cuadro 6.4.1.

Cuadro 6.4. Resultado a la necropsia de la distribución de lesiones tuberculosas macroscópicas

| GRUPO   | Edad al vacunarse (meses) | No. Animal | CABEZA                     |                          |                   |                 | CUELLO          |         |        | TORAX                   |                    |      |        | ABDOMEN           |                |                               |                 | CANAL          |               |  |
|---|---------------------------|------------|----------------------------|--------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|---------|--------|-------------------------|--------------------|------|--------|-------------------|----------------|-------------------------------|-----------------|----------------|---------------|--|
|   |                           |            | N.L. Retrofaringeo lateral | N.L. Retrofaringeo medio | N.L. Mandibulares | N.L. Parotídeos | N.L. Cervicales | Tráquea | Pulmon | N.L. Tráqueobronquiales | N.L. Mediastínicos | Bazo | Hígado | N.L. Mesentéricos | N.L. Hepáticos | N.L. Cervicales superficiales | N.L. Inguinales | N.L. Subilíaco | N.L. Poplíteo |  |
| CFPE's  | 9                         | 9          | +                          |                          |                   |                 | +               |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 14                        | 11         |                            |                          |                   |                 |                 |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 14                        | 14         |                            | +P                       | ++P               | +P              | +               |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 17                        | 19         |                            |                          |                   |                 | +               |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 12                        | 20         |                            | ++A/P                    |                   |                 | +++A/P          |         | +/- D  |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
| CFPE's + INF.                                   | 17                        | 25         |                            |                          |                   |                 | +               |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 9                         | 4          |                            |                          |                   |                 | +               |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 15                        | 12         |                            | +G                       | +                 | +G              | +++A/P          | ++P     |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 12                        | 16         |                            |                          |                   |                 |                 |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 14                        | 17         |                            |                          |                   |                 | +               |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
| BCG   | 16                        | 22         |                            |                          |                   |                 | ++A/P           |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 18                        | 23         |                            |                          |                   |                 | +++A/P          | ++      |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 9                         | 3          |                            |                          |                   |                 |                 | +       |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 8                         | 6          |                            |                          |                   |                 | +               |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 9                         | 7          |                            |                          |                   |                 |                 |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
| CONTROL   | 12                        | 10         |                            |                          |                   |                 |                 |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 9                         | 13         |                            | ++A/P                    |                   |                 | +++A/P          |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 14                        | 24         |                            |                          |                   |                 |                 |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 8                         | 1          |                            | ++A/P                    | ++A/P             |                 | +++A/P          | ++P     |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
|   | 8                         | 2          |                            | +++A/P                   |                   |                 | +++A/P          |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
| MURIO ANTES DEL DESAFÍO DE UNA NEUMONIA CRONICA |                           |            |                            |                          |                   |                 |                 |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
| 11  | 8                         |            | +++A/P                     |                          |                   | +++A/P          |                 |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
| 10  | 15                        |            |                            |                          |                   |                 | +++P            |         |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |
| 16  | 21                        |            |                            |                          |                   |                 | +++A/P          | +++P    |        |                         |                    |      |        |                   |                |                               |                 |                |               |  |

A. aumento de tamaño  
P. aspecto piogranulomatoso  
G. granuloma calcificado  
+ ligeramente lesionado  
++ moderadamente lesionado  
+++ muy lesionado  
- sin cambios patológicos aparentes  
N.L. Nódulo linfático  
M. Lesiones Multifocales  
D adherencias  
♣ Localizada en pleura

## 7. DISCUSION

Se ha tornado difícil el poder realizar un diagnóstico preciso de la TB, ya que aún la enfermedad no está completamente comprendida y aunado a esto las herramientas de diagnóstico que se utilizan, tienen el inconveniente de que identifican a aquellos animales que han tenido contacto con micobacterias atípicas, así como en las fases tempranas de la infección que aun no se ha establecido una respuesta inmune adaptativa, sin embargo es de tomar en cuenta que existen diversos patrones de respuesta inmune en la TB, dependiendo de la especie y aún entre el mismo individuo, el tiempo de exposición a la enfermedad y de la cepa patógena de desafío (Lugo, 2003). El empleo de la prueba ID, es la mayormente difundida a nivel mundial para el diagnóstico de la enfermedad, con sensibilidad de 70% y su especificidad de 60%, esto ha provocado que se desarrollen otras técnicas, como la prueba para la determinación de IFN- $\gamma$ , que se caracteriza por representar mayor sensibilidad y especificidad en relación a la ID (Domingo *et al.*, 1995).

Al inicio del experimento, se realizaron las pruebas de ID, ELISA, IFN- $\gamma$  y PCR, para comprobar la salud de los animales, y la ausencia de la TB, ya que provenían de una zona con baja prevalencia de tuberculosis bovina, los resultados de todas ellas fueron negativos, en todos los animales, tal y como se esperaba, ya que la prueba de PCR al ser muy sensible y específica, pudo haber detectado en caso de existir, animales en apariencia sanos (Zumárraga *et al.*, 2001).

En investigaciones previas se ha reportado la importancia de la edad de los animales al momento de la inmunización con BCG, ya que juega un papel muy trascendental para que se pueda desarrollar una inmunidad protectora en esta y otras enfermedades, ya que entre menor sea la edad, mayor será el rango de protección, de manera general se puede mencionar que los animales de este estudio, al momento de ser vacunados eran menores de 14 meses, y al sacrificio no mostraron lesiones extensas, ni de gran tamaño. (Lyashchenko *et al.*, 2004), esto es de importancia ya que existe un riesgo mayor de infectarse cuando los animales entran al ciclo productivo, que es alrededor de 2.5 años, y que en caso de estar vacunados les conferiría protección contra la infección natural.

Durante la respuesta inmunitaria en la tuberculosis participan una gran cantidad de poblaciones celulares, y una amplia red de mediadores solubles, el éxito en la eliminación del bacilo, depende de una correcta integración de las defensas del hospedador hacia infecciones intracelulares, donde se involucra una respuesta inmune innata así como una inmunidad adaptativa mediada por células. El control inmunológico de la infección por *M. bovis*, está basado en una respuesta de células T tipo 1 (Th1). La protección inmunitaria específica contra *M. bovis* se inicia tras la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, capaces de secretar IFN- $\gamma$ , pero existen otras subpoblaciones celulares involucradas durante la infección por tuberculosis como

linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos T $\gamma$  $\delta$ ; que están involucrados en la respuesta temprana y proveen una fuente de quimiocinas y también secretan IFN- $\gamma$  (Stenger y Modlin, 1999).

En la realización de la investigación, fue necesario vacunar y desafiar de manera experimental bovinos, para poder evaluar la expresión de citocinas; entre estas moléculas existe un grupo importante, cuya función es la de modular la respuesta inmune, a través de un patrón de respuesta principalmente Th1, y así tratar de controlar la enfermedad o por otro lado permitir el avance de la misma. A través de la técnica de RT-PCR fueron evaluadas: IFN- $\gamma$ , IL-2, que corresponden al patrón Th1, y las del patrón Th2: IL-4 IL-10. Después de la aplicación de una dosis de desafío de 10<sup>4</sup> UFC, de tal manera que semejara una infección natural, en algunos estudios se ha reportado que a bajas dosis para el desafío inducen el primer tipo de respuesta ( Ng *et al.*, 1997).

Después de vacunar y desafiar a los animales, leucocitos de estos animales fueron estimulados *in vitro* con PPD bovino, Dip-z, Complejo 45-47, Con A y un grupo sin estimular, para posteriormente, utilizar los iniciadores adecuados, para cada citocina. Se sabe que la expresión del mRNA es una medida apropiada de la producción de citocinas, ya que la mayoría de los genes de las citocinas son regulados a través de la transcripción y su expresión se correlaciona directamente con los niveles de proteína (Covert y Splitter, 1995; Ng *et al.*, 1997). Esta prueba de RT-PCR, ha sido empleada por algunos investigadores como herramienta para detectar la transcripción de mRNA de citocinas bovinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Covert y Splitter, 1995), El uso de la RT-PCR se fundamenta porque los niveles de expresión de citocinas son mejor detectados cuando se utilizan este tipo de pruebas (Kelso *et al.*, 1991), que se caracterizan por su elevada sensibilidad, ya que detecta pequeñas concentraciones de las citocinas buscadas en PBMC (Ito y Kodama, 1994), como en el caso de IFN- $\gamma$  e IL-2 en cultivos celulares cuando los bovinos son inoculados con *M. bovis* ( Ng *et al.*, 1997).

Cuando se procedió a analizar los resultados se observó que en el grupo vacunado con BCG se estimó haber logrado una respuesta inmune protectora, donde se correlacionaron los niveles de producción de IFN- $\gamma$  con el patrón de respuesta de las citocinas que se enfocó hacia Th1, se ha determinado que BCG es un potente estimulador de células CD4<sup>+</sup> y un pobre estimulador de células CD8<sup>+</sup> (Kaufmann y Hess, 2000), en comparación con la observación de las lesiones al momento del sacrificio, se encontró una correlación también directa en dos animales del grupo, ya que no tuvieron ninguna lesión y del resto de los animales sus lesiones fueron moderadas. En animales vacunados experimentalmente con *M bovis* BCG, se ha visto protección contra el desarrollo de lesiones (Waddington y Ellwood, 1972), así como la reducción en el tamaño de las lesiones, de tal manera que aquellos animales no vacunados desarrollaran lesiones (Buddle *et al.*, 1995a), como ha sido demostrado en nuestro experimento. La BCG induce una elevada producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, y con el uso de BCG los bovinos tienen hasta un 75% de protección

contra la inducción experimental intratraqueal con *M. bovis* (Lyashchenko *et al.*, 2004), esto fue observado dentro de este grupo, en la inspección post-mortem. La expresión de IFN- $\gamma$  ha sido observada después de 2 semanas de haber sido vacunados con BCG, induciendo protección (Buddle *et al.*, 2002), por lo que es esencial para promoción de la protección inmunológica contra la tuberculosis bovina (Wedlock *et al.*, 2002), esta observación no es aplicable en su totalidad en este caso, porque esto no correlacionó con la prueba para determinación de producción de IFN- $\gamma$ , pero en la PCR si correlacionó en este grupo. Así mismo la dosis de vacunación con BCG se encontró dentro de los rangos recomendados para conferir protección, ya que algunos autores mencionan que dosis menores inducen mejor protección (Buddle *et al.*, 2002), Cabe señalar que la vía de inoculación es importante ya que aquellos animales que son vacunados intratraquealmente o subcutáneamente pueden desarrollar lesiones (Buddle *et al.*, 1995b), no fue el caso para los animales del estudio. Por otro lado algunas observaciones demuestran que el adyuvante utilizado en la vacuna puede mediar la respuesta hacia Th1 o Th2, observando que el dextran induce fuertemente la expresión de IL-2 (Wedlock *et al.*, 2002), ciertamente la vacuna BCG contenía dextran, pero no indujo una expresión de IL-2, sin embargo de IFN- $\gamma$ , de manera general sumando el efecto de los antígenos, pudo ser observada.

Con lo que respecta al grupo CFPE mostró eficacia en la protección contra el desarrollo de lesiones extensivas en diferentes órganos, ya que las lesiones se presentaron en pocos órganos y de ligeramente lesionados a moderadas; en cuanto a la producción de IFN- $\gamma$  y la valoración del patrón de citocinas estas correlacionan positivamente, hacia un patrón de respuesta tipo Th1. Se ha observado que el uso de CFPE de *M. bovis*, tiene la capacidad de estimular la respuesta inmune y proteger contra la infección, sin embargo puede diferir en la producción de altos niveles de anticuerpos y bajos niveles de citocinas del patrón Th1, por lo que es considerada en segundo termino después de la BCG, ahora bien cuando se usa en combinación con IL-2 reduce las lesiones en pulmón, sin embargo el tipo de respuesta predominante bajo estas condiciones suele ser Th2, (Wedlock *et al.*, 2000). El CFPE obtenido de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* contiene proteínas que altamente estimulan las células T de ratón y así como las de bovinos (Wedlock *et al.*, 2002)

Para el grupo vacunado con CFPE/IFN- $\gamma$ , solo un animal del grupo no presento lesiones y en los demás se observó que las lesiones fluctuaban de moderadas a muy lesionado en los órganos afectados, con características de calcificación, se dice que la mineralización de las lesiones se ha podido detectar después de los 35 días de provocar la infección por *M. bovis*, cuando los animales han sido vacunados con CFPE (Wedlock *et al.*, 2000), con respecto a la producción de IFN- $\gamma$  se puede mencionar que sus valores correspondieron al patrón de secreción de citocinas, donde la citocina mayormente expresada fue IFN- $\gamma$ , sobrepasando el valor relativo de  $\beta$ -actina (100%), sin

embargo por otro lado también se llegó a expresar de manera significativa IL-10, pero en menor proporción a la citocina antes descrita.

En el grupo control la producción de IFN- $\gamma$  no fue significativa después del desafío salvo en aquellas muestras que fueron estimuladas con los antígenos Dip-z y complejo 45-47, donde sus valores fueron significativos, sin embargo estos valores no correlacionaron directamente con los expresados en la PCR, ya que pudo observarse un patrón de respuesta Th1, con la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-2.

La expresión de IFN- $\gamma$  está asociada con la reducción del crecimiento del bacilo en ratones (Wilkinson *et al.*, 2000), sin embargo en los grupos BCG, CFPE/IFN- $\gamma$  correlacionó esta información ya que fueron los grupos con menos lesiones, y sus niveles de expresión de citocinas para IFN- $\gamma$  fueron elevados, pero en el grupo control sus niveles de expresión fueron elevados, y al sacrificio, sus lesiones abundantes.

De manera experimental se ha visto el uso de vacunas recombinantes, que han demostrado baja protección comparadas con BCG, la especificidad de la respuesta inmune celular dependerá en gran medida del reconocimiento de los antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (Carpenter *et al.*, 1997). En otros casos, diversos antígenos han sido estudiados, pero existen diferencias en la respuesta y eficacia en la protección contra la infección por *M. bovis* (Fine, 1989). Ahora bien dependiendo del antígeno, se estimulan las diferentes clonas de células T y por lo tanto serán regulados los tipos de respuesta de citocinas Th1 o Th2, estos patrones suelen cambiar dependiendo del modelo animal, por lo que en bovinos puede ocurrir la presentación de ambos patrones de respuesta, ya que la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10 en ganado se regula de diferente manera, como en el caso del grupo vacunado con CFPE/IFN- $\gamma$ , donde aparentemente se presentaron ambos patrones, después del desafío (Brown *et al.*, 1998), en presencia de todos los antígenos. El PPD bovino induce IFN- $\gamma$  e IL-2 (Ng *et al.*, 1997), el PPD bovino aplicado y el Esat-6 al ser utilizados como inmunógenos, promueven la protección del individuo por medio de la producción de IFN- $\gamma$  (Pym *et al.*, 2003), en este caso todos los antígenos indujeron ambos patrones de respuesta.

Se menciona que el uso con mitógenos pueden estimular potencialmente células que nunca han sido estimuladas así como células de memoria (Brown *et al.*, 1998), como Con A que estimula linfoblastos bovinos (Ng *et al.*, 1997), sin embargo pudo observarse que no en todas las muestras fue ese el caso, de manera general la mayoría de ellas no fueron perceptibles, sus expresiones.

## 8. CONCLUSIONES

1. La vacuna de BCG indujo una buena protección. La vacunación con CFPE's, produjo una protección aceptable, ya que las lesiones sugestivas a tuberculosis fueron observadas en NL cercanos a la zona de inoculación, siendo más pequeñas y más escasas en comparación al grupo control, con tendencia del NL a encapsular las micobacterias, sin mostrar lesiones extensivas en otras partes del cuerpo. No existió un adecuado sinergismo entre el CFPE's e IFN- $\gamma$ , como se mostró en el grupo 4, a pesar de ser el IFN- $\gamma$  pieza clave en la CMI, siendo éste fundamental para lograr una correcta protección contra la enfermedad.
2. En cuanto a la capacidad del antígeno a estimular la expresión de citocinas, de manera general se puede decir que el PPD bovino es el que estimula una expresión mayor de IFN- $\gamma$ , seguido de los antígenos complejo 45-47 y Dip-z, que también inducen a la expresión de IFN- $\gamma$ , sin embargo estos mismos antígenos estimulan la expresión de otras citocinas dependiendo del grado avance de la enfermedad, que pudo ser observado conforme los resultados del desafío.
3. Con respecto a las vacunas utilizadas, la vacuna BCG indujo una buena expresión de IFN- $\gamma$ , por lo que hace pensar que hoy día sigue confiriendo a una buena protección y en un segundo lugar la utilización de la vacuna CFPE.
4. No en todos los casos se observó la expresión de mRNA de IFN- $\gamma$  en aquellas células estimuladas con Con A, como se reporta en algunas publicaciones de investigación, en bovinos y modelos murinos.
5. También en algunos casos, los resultados de la prueba de IFN- $\gamma$ , no concuerdan con los resultados de RT-PCR para esta citocina

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Morris, RS., Pfeiffer D.U., Jackson, R.; The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections; Vet. Microbiol. 1994; 4:153-170.
- Bouvet, E., Cassalino, E., Mendoza-Sassi, G., Lariven, S., Valee, E., Pernet, M., Gottot, S., Vachon, F.; A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. A case control study; AIDS 1993; 7:1453-1460.
- Milian, S.F., Anaya, E.A.M., Gallegos, T.R.M.; A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species ; Prev. Vet. Med. 2003; 58:1-13.
- Espitia, C., Elinos, M., Hernández-Pando, R., Mancilla, R.; Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-Kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: Demonstration by Immunogold electron microscopy; Infec. Immun. 1992; 6:2998-3001.
- Torres, A., Juárez, M.D., Cervantes, R., Espitia, C.; Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS—1); Microb. Pathog. 2001; 30:289-297.
- Colangeli, R., Heijbel, A. Williams, A.M., Manca, C., Chan, J., Lyashchenko, K., Gennaro, M.L.; Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*; J. Chromatogr. B 1998; 714:223-235.
- Bedwell, J., Kairo, S.K., Behr, M.A., Bygraves, J.A.; Identification of subtrains of BCG vaccine using multiplex PCR; Vaccine 2001; 19:2146-2151.
- Buddle, B.M., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Andersen, P., de Lisle G.W.; Use of ESAT-6 in interferon- $\gamma$  test for diagnostic of bovine tuberculosis following skin testing; Vet. Microbiol. 2001; 80:37-46
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.; TH1 AND TH2. Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties; Ann. Rev. Immunol. 1989; 7:145-173.
- Skinner, M.A., Wedlock, D.N., Buddle, B.M.; Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*; Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2001; 20:112-132.

- Morris, J.A., Thorns, C.J., Wolley, J.; The identification of antigenic determinants on *Mycobacterium bovis* using monoclonal antibodies; *J. of Gral. Micr.* 1985; 131:1825-1831.
- Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C.; The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis; *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2001; 20:21-54.
- Kochi, A.; The global situation and the new control strategy of the World Health Organization; *Tubercle* 1991;72:1-6.
- Bloom, B.R.; *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and control*; ASM Press Washington D.C. 1994.
- Marchal, G.; El resurgir de la tuberculosis.; *Mundo Cient.* 1992;136 13:520-528.
- Bloom, B.R. and Murray C.J.L.; Tuberculosis: commentary on a reemergent killer; *Science* 1992; 257:1055-1064.
- Daborn, J.M., Grange, J.M.; HIV/AIDS and its implications for the control animal tuberculosis; *Br. Vet. J.* 1993;149:405-417.
- Casal, R.M.; Tuberculosis. Enfermedad reemergente; *Ciencia e Investigación* no. 265.33-34; Octubre; Edición española de *Scientific American* 1998.
- Kissane, J.M. Chapter 22; Lung and mediastinum en *Anderson's Pathology*; Edit. By John M. Kissane 1985;1: 852-860.
- Chapman C & Hall MEDICAL; Chapter 7; Pathology; Edit by Ian C.Cree 1997; 150-155.
- Stenger, S. and Modlin, R.L.; T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*; *Curr. Opin. Microbiol.* 1999; 2:89-93.
- Collins, C.H., Grange, J.M., Yetes, M.D.; *Organization and practice in tuberculosis bacteriology*; Cambridge 1985; Botterworths.
- Kaufmann, S.H.E. and Hess J.; Immune response against *Mycobacterium tuberculosis*: implicacions for vaccine development; *J. Biotechnol.* 2000; 88:13-17.
- Jumperz, J.E. and Brenner, M.B.; CD1 specific cells T in microbial immunity; *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13:471-478.
- Rastogi, N.; Mycobacteria as intracellular pathogens: current notions of pathogenicity, virulence, and drug resistance and their relationship to effective therapy. In *Antimicrobial agents and intracellular pathogens* 1993; CRC Press, Boca Raton, Florida, 245-300.

- Chávez, G.G.; Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observada en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y de *M. avium* sp silvaticum. Tesis Doctorado; Fac. de Veterinaria 1993;Universidad de Zaragoza, España.
- Thoen, O.C.and Steele J.H. 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.
- Amadori,M., Tagliabue, S., Lauzi, S., Finazzi, G., Lombardi, G., Telo, P., Pacciarini, L., Bonizzi, L.; Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by micobacteria of the *avium/intracellulare* group; J. Vet. Med. B. 2002; 49:89-96.
- Cosivi, O., Daborn C.J., Grange, J.M.; Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries; Emerging Infect. Dis. 1998; 4:59-70.
- Ashford, E.,Whiney, P., Raghunathan and Cosivi, O.;Epidemiology of select mycobacteria that infect humans and other animals in Review Scientific et technique OIE. Edit por Board Consejo Editorial 2001; 20: 325-337.
- SENASICA.SAGARPA; Dirección General de Salud Animal; Cuestionario FAO/OIE/OMS-2002.México.
- Lisslie, I.W.; Cross infection with mycobacterial between animal and man; Bull. Int. Union Against Tuberc. 1968;41:285-288.
- Karlson, AG; Carr, DT.; Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*; Ann. Intern. Med. 1970; 72:979-983.
- Szewzyk, R., Svenson, S.B., Hoffner, S.E., Bolske, G.,Wahlstrom, H., Englund,L.,Engval, A., Kellenium, G.; Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* infections in human and animal in Sweden; J. Clin. Microbiol. 1995; 33:3183-3185.
- Rhodes, SG.,Buddle, BM., Hewinson,RG., Vordermeier, HM., Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease; Immunology 2000; 99:195-202.
- Vondermeier, M.,Cockle, P.J., Whelan, AO., Rhodes, S., Chambers, MA., Clifford, D., Huygen, Tascon, R., Lowrie, D., Colston, MJ., Hewinson, RG.; Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test; Vaccine 2000;19: 1246-1255.

- Fifis, T., Corner, L.A., Rothel, J.S., Wood, P.R.; Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens; Scand. J. Immunol. 1994; 39:267-274.
- Nayak, s., Verma, R., Joshi, B., Venkatesan, K.; Aspects of humoral and cell-mediated immune responses in calves experimentally infect with *Mycobacterium bovis* strain; Indian J. of Anim. Sci. 2001;8:726-730.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.P.R.; A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aus. Vet. J. 1990; 67:134-137.
- Prince, J E., Kherad, F., Corry, Dv.; Immunologic lung disease; J. Allergy and Immunol. 2003; 111:613-623.
- Ritacco, V., López, B., De Kantor, I.N., Barrera, L., Errico, F., Nader, A.; Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis; Research in Vet. Sci. 1991;50:365-367.
- Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Fifis, T.; A field evaluation of serological and cellular diagnostic test bovine tuberculosis; Vet. Microbiol. 1992; 31:71.
- Zumárraga, R.J., Paolicchi, F., Garbaccio, S., Gioffré, A., Cataldi, A.; Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido de terneros; Vet. Arg. XVIII 2001; 179:668-676.
- Adams, L.G.; *In vivo* and *in vitro* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection; Rev.: Sci. tech. : mycobacterial infections in domestic and wild animals 2001; 20: 304-317.
- Díaz, O.F., Banda, R.V., Jaramillo, M.L., Arriaga, D.C., González, S.D., Estrada, Ch. C.; Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares; Vet. Méx. 2003; 34:13-26.
- Taylor, M.J., Hughes, M.S., Skuce, R.A., Neill, S.D.; Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR; J. Clin. Microbiol. 2001; 39:1271-1278.
- Pym, A.S., Brodin, P., Majlessi, L.; Rocombinat BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis; Nat. Med. 2003; 9:533-539.
- Haring, C.M., Traum, J., Hayes, F.M., Henry, B.S.; Vaccination of calves against tuberculosis with BCG Hilgardia 1930; 4:307-394.
- Lyaashchenko K., Whelan, A.O., Greenwald, R.; Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*; infec. Immun. 2004; 72: 2462-2467.

- Liebana E., Aranaz. A., Alwell, F.E., Nair, J., Neill, S.D., Smyht, A.J., Pollock, J.M.; Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells; *Immunology* 2000;99:23-29.
- Buddle, BM., Pollock, JM., Skinner, MA. and Wedlock, DN.; Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens; *International J. for Parasitol.* 2003;33:555-566.
- López-Antuñano, F.J.; Usos y efectos del bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (vacunación con BCG); *Salud Pública Méx.* 1997; 39:156-161.
- Wedlock, N., Vesosky, B., Skinner, M.A.; Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate protein and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis; *Infect. Immun.* 2000; 68: 5809-5815.
- Bosio, C.M., Orme, I.M.; Effective nonsensitizing vaccination with culture filtrate proteins against virulent *Mycobacterium bovis* infection in mice; *Infect. Immun.* 1998; 66: 5048-5051.
- Park, YH., Yoo, HS., Yoon, JY., Yang, SJ., An, JS., Davis, WC.; Phenotypic and functional analysis of bovine  $\gamma\delta$  lymphocytes; *J. Vet. Sci.* 2000; 1:39-48.
- Smyth, AJ., Welsh, M., Girvin, RM., Pollock, JM.; In vitro responses of  $\gamma\delta$  T cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: predominant involvement of WC1+ cells; *Infect. Immun.* 2001;69:89-96.
- Haslo, K., Andersen, A., Nagai, S., Gottschau, A., Sorensen T, Andersen, P.; Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*; *Infect. Immun.* 1995;63:804-810.
- Pollock, J.M., Andersen, P.; The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis; *J. Infect. Dis.* 1997; 1251-1254.
- Weldingh, K., Rosenkrands, I., Jacobsen, S., Rasmussen, P.B., Elthay, M.J., Andersen, P.; Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins; *Infect. Immun.* 1998; 66:3492-3500.
- Hewinson, R.G., Rusell, W.P.; Processing and secretion by *Escherichia coli* of a recombinant form of the immunogenic protein MPB70 of *Mycobacterium bovis*; *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139:1253-1259.
- Fine, EM. and Vynnycky, E.; The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g. BCG) vaccines; *Vaccine* 1998;16:1923-1928.
- Stenger, S. and Modlin, RL.; Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors; *Curr. Opin. Immun.* 2002;14:452-457.

- Espitia, C., Espinosa, R., Saavedra, R., Mancilla, R., Romain, F., Laqueyrie, A., Moreno, C.; Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50 to 55 kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45-47 Kilodalton antigens; *Infect. Immun.* 1995; 63:580-584.
- Venkataprasad, N.; Coombes, A.G.A.; Singh, M.; Rohde, M.; Wilkinson, K.; Hudecz, F.; Davis, S.S. and Vordermeier, H.M.; Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbed on lamellar particles of lactide polymers; *Vaccine* 1999;17: 1814-1819.
- Wilkinson, K.A., Belisle, J.T., Mincek, M., Wilkinson, R.J. and Toossi, Z.; Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by microspheres; *J. Immunol. Methods* 2000; 235:1-9.
- Lawn, S.D., Butera, S.T., Shinnick, T.M.; Tuberculosis unleashed: the impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Infect.* 2002; 4: 635-646.
- Peters, W. and Ernst, J.D.; Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*; *Microbes and Infection* 2003; 5:151-158.
- Bernard, P.D., Dulbecco, R., Eisen, H.V.; *Tratado de microbiología*; 4ª ed. Edt. Masgon 1996; Barcelona, España .
- Wakeham, J., Wang, J. and Xing, Z.; 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.* 2000; 68,12: 6946-6953.
- Shorey, J.S., Carroll, M.C., Brown, E.J.; A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria; *Science* 1997; 227:1091-1093.
- Taylor, M.E., Drickamer, K.; Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor; *J. Biol. Chem* 1993;268:399-404.
- Converse, P.J., Dannenberg, A.M., Estep, J.E., Sugisaki, K., Abe, Y., Schofield, B.H., Pitt, M.L.M.; Cavitory tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli; *Infect. Immun.* 1996; 64:4776-4787.
- McDonough, K.A., Kress, Y. and Bloom, B.; Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages; 1993;61:2763-2773.
- Jiménez, M.M., Báez, S.R., Linares, C.M., Chávez, S.R., Lascrain, S.R., Zenteno, G.E.; Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis; *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2001;14:39-49.

- Waters, WR., Rahner, TE., Palmer, MV., Cheng, D., Nonnecke, BJ., Whipple, DL.; Expression of L- selectin (CD62L), CD44, and CD25 on activated bovine T cells; *Infec. and Immun* 2003; 71: 317-326.
- Dannenberg Jr, A.M.; Immune mechanism in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis; *Rev. Infect. Dis.* 1989;11:suppl.2.
- Lucas, S.B.; Histopathology of leprosy and tuberculosis an overview; *British Med. Bull.* 1988;44:584-599.
- Hernández-Pando, R., Orozco, E.H., Arriaga, K., Sampieri, A., Larriva-Sahd, J., Madrid-Marina, V.; Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 $\alpha$ , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997;90:607-617.
- Schaible, UE. and Kaufmann, SHE., CD1 molecules and CD1-dependet cells T in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity?; *Semin. Immunol.* 2000; 12:527-535.
- Klünner, T., Bartels, T., Vondermeier, M., Burger, R., Schäfer, H.; Immune reactions of CD4- and CD8 positive T cell subpopulations in spleen and lymph nodes of guinea pigs after vaccination with *Bacillus Calmette Guerin* ; *Vaccine* 2001;19:1968-1977.
- Lamb, JR.; Peptide-mediated regulation of allergen-specific immune responses; *Res Immunol.* 1998;149:235-240.
- Gerosa, F; Nisii, C, Righetti, S; Micciolo, R; Marchesini, M; Cazzadori, A and Trinchieri, G; CD4<sup>+</sup> T Cell Clones Producing both Interferon- $\gamma$  and Interleukin-10 Predominate in Bronchoalveolar Lavages of Active Pulmonary Tuberculosis Patients; *Clin. Immunol.* 1999; 92:224-234.
- Welsh, MD., Kennedy, HE., Smyth, AJ., Gyrvin, RM., Andersen, P., Pollock, JM.; Responses of bovine WC1+  $\gamma\delta$  T cells to protein and nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*; *Infec. Immun.* 2002; 70:6114-6120.
- Trinchieri, G.; Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity; *Immunol.* 2003; 3:133-146.
- Chensue, S.W., Warmington, K., Ruth, J.H., Lukacs, N., Kunkel, S.L.; Mycobacterial and Schistosomal antigen-elicited granuloma formation and interleukin-4 in bovine tuberculosis; *Infect. Immun.* 1997; 159: 5393-5400.
- Flynn, J.L., Chan, J.; Minireview. Tuberculosis: latencia and reactivation; *Infect. Immun.* 2001; 69:4195-4201.
- Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., Kiyono, H., Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N., Honda, M.; Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant

- Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen ; *Vaccine* 2002; 21:158-166.
- Murray, P.J., Young, R.A.; Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice; *Infect. Immun.* 1999; 67:3087-3095.
  - Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
  - Domingo, M., Liébana, E., Carrera, J., Vilafranca, M., Casal, J., Aranaz, A., Altamira, J., Vidal, D., Marco, A., Panel, J. M., Mateos, A, Domínguez, L.; Eficacia comparativa de la intradermorreacción y de la prueba de liberación de  $\gamma$ -interferón para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo; *Med. Vet.* 1995; 12:307-316.
  - Walravens, K., Marche, S., Rosseels, V., Wellemans, V., Boelaert, F., Huygen, K., Godfroid, J.; IFN- $\gamma$  diagnosis tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87:401-406.
  - Voller, A., Bidwell, D.E., Barlett, A.; The enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) in A guide with abstracts of microplate applications London (UK); Edited by Dynatech Laboratories, Inc. 1979.
  - Ritacco, V.; Further evaluation of an direct enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis; *J. Vet. Med. Series B* 1990; 37:19-27.
  - Van Soolingen D, Van Der Zanden, A., De Has P., Noordhoek, G., Kiers, a., Fourdrine, N., Portels, F., Kolk, A., Kremer, K., Van Embden, J.; Diagnosis of *Mycobacterium microtti* infection among humans by using novel genetic markers; *J. of Clin. Microbiol.* 1998; 6:1840-1845.
  - Covert, J. and Splitter, G.; Detection of cytokine transcriptional profiles bovine peripheral blood mononuclear cells and CD4+ lymphocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction; *Vet. Immunol. Immunopathl.* 1995; 49:39-50.
  - Naulláin, E.M.O., Davis, W.C., Costello, E., Pollock, J.M. and Monaghan; 1997; 56:65-76.
  - Chomczynski, P.Y. and Sacchi, N.; Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; *Anal Biochem.* 1987; 162:156-159.
  - Beltan, E., Horgen, L., Rastogi, N.; Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria; *Microbial. Pathogenesis* 2000; 28:313-318.
  - Cerreti, D.P., Mckereghan, K., Larsen, A., Cosman, D., Gillis, S., Baker, P.E.; Cloning sequence, and expresión of bovine interferon gamma; *J. Immunol.* 1986<sup>a</sup>; 16-36:4561-4564.

- Cerreti, D.P., Mckereghan, K., Larsen, A., Cantrell, M.A., Anderson, D., Cosman, D., Gillis, S., Baker, P.E.; Cloning sequence, and expression of bovine interleukin-2; Proc. Natl. Aca. Sci. USA 1986b; 83:3223-3227.
- Heussler, V.T., Eichorn, M., Dobbelaere, D.A.; Cloning of a full-length cDNA encoding bovine interleukin-4 by polymerase chain reaction; Gene 1992; 114:272-278.
- Hash, S.M., Brown, W.C., Ficht, A.R.; Cloning of a full-length cDNA encoding bovine interleukin-10 using the polymerase chain reaction; Gene 1994; 114:272-278.
- Degen, J.L., Newbauer, M.G., Freizner, S.J., Seyfreid, C.E., Morris, D.R.; Regulation of protein synthesis in microgen-active bovine lymphocytes analysis of actin-specific and total mRNA accumulation and utilization; J. Biol. Chem. 1993; 12:153-162.
- Bosio, CM., Orme, IM.; Effective nonsensitizing vaccination with culture Filtrate proteins against virulent *Mycobacterium bovis* infection in mice; Infect. Immun. 1998; 66:5048-5051.
- Pollock, JM., Andersen, P.; Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle; Infect. Immun. 1997; 65:2587-2592.
- Hewinson, RG, Rusell, WP.; Processing and secretion by *Escherichia coli* of a recombinant form specific diagnosis of tuberculosis; J. Infect. Dis. 1997; 175:1251-1254.
- Juárez, MD., Torres, A., Espitia, C.; Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mpt83* and *mpt70* genes; FEMS Microbiol. Lett. 2001; 203:95-102.
- Moreira, A L.; Tsenova, L.; Murray, P J.; Freeman, S.; Bergtold, A., Chiriboga L., and Kaplan, G.; Aerosol infection of mice with recombinant BCG secreting murine IFN- $\gamma$  partially reconstitutes local protective immunity; Microb. Pathog. 2000; 29:175-185.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology; J. Clin. Microbiol. 1997; 35:907-914.
- Lugo; M.T.A.; Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en tuberculosis bovina (tesis maestría), FESC-Cuautitlán. UNAM. México 2003.
- NG, K.H., Alwell, F.E., Weslock, D.N., Watson, J.D., Buddle, B.M.; Antigen-induced interferon- $\gamma$  and interleukin-2, responses of cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*; Veterinary Immun. Immunopathol. 1997; 57:59-68.
- Pym, AS., Brodin, P., Majlessi, L.; Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., Griffiths, K.E., Marchal, G., Leclerc, C., Cole, S.T.; Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. J. Infect. Dis. 1997; 175:1251-1254.

- Kelso, A.; Troutt, A.B., Maraskovsky, E., Gough, N.M., Morris, L., Pech, M.H., Thomson, J.A.; Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones; *Immunol. Rev.* 1993; 123:85-114.
- Ito, T., Kodama, M.; Detection of bovine interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction; *Vet. Immunol. Immunopath.* 1994; 40:93-103.
- Buddle, B.M., Keen, D., Thompson, A., Jowet, G., McCarthy, A.R., Heslop, J.; Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination killed *Mycobacterium vaccae*; *Res. Vet. Sci.* 1995; 59:10-16.
- Buddle, B.M., Skinner, M.A., Wedlock, D.N., Collins, D.M., de Lisle, G.W.; New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife; *Vet. Immunol. Immunopath.* 2002; 87:177-185.
- Wedlock, D.N., Keen, D.L., McCarthy, A.R., Andersen, P., Buddle, B.M.; Effect of different adjuvants on the immune responses of cattle vaccinated with *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins; *Vet. Immunol. Immunopath.* 2002; 86:79-88.
- Buddle, B.M., Keen, D.L., Thompson, A., Jowet, G., McCarthy, A.R., Heslop, J., de Lisle, G.W., Stanford, J.L., Alwell, F.E.; Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae* 1995b; *Res. Vet. Sci.* 59:10-16.
- Wilkinson, K.A., Martin, T.D., Reba, S.M., Aung, H., Redline, R.W., Boom, W.H., Toossi, Z., Fulton, S.A.; Latency associated peptide of transforming growth factor  $\beta$  enhances *Mycobacterioid* immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/mice; *Infec. Immun.* 2000; 68:6505-6508.
- Carpenter, E., Liney, F., Eamonn, G.; Cellular responses and *Mycobacterium bovis* BCG growth inhibition by bovine lymphocytes. *Immun. Cell. Biol.* 1997; 75:554-560.
- Fine, P.E.M.; The BCG history: Lessons from the past and implications for the future; *Rev. Inf. Dis.* 1989; 11: (Suppl. 2), S353-S359.
- Brown, W.C., Rice-Ficht, A.C., Estes, D. Mark; Bovine type 1 and type 2 responses; *Vet. Immun. Immunopath.* 1998; 63:45-55.

## 10. APENDICE

Agua con dietil-pirocarbonato (DEPC).

- 1) 100  $\mu$ l de dietil-pirocarbonato
- 2) cbp 1000 ml de agua Mili-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 ( destilada)

Solución bufferada de fosfatos (PBS) 1X.

- 1) NaCl 8.0 gr
- 2) K<sub>2</sub>HPO 1.2 gr
- 3) KH<sub>2</sub>PO 0.34 gr
- 4) cbp 100 ml

TAE 50 x (TRIS-ácido acético- EDTA).

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

Gel de agarosa al 1.5%.

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

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

CTAB

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

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

- 1) 3.8 gr/L de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>)
- 2) 1.93 gr/L de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Amortiguador de lavado. Buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2 con NaCl y 0.1% de Tween 20.

- 1) 1.10 gr/L de fosfato de sodio dibásido ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ )
- 2) 0.32 gr/L de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_3$ )
- 3) 8.5 gr/L de cloruro de sodio
- 4) 1 ml de Tween 20
- 5) 1000 ml de agua destilada

Solución bloqueadora. 3% de leche descremada en PBS y 0.1% Tween 20.

- 1) 1.10 gr/L de fosfato disódico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 2) 0.32 gr/L de fosfato de sodio dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- 3) 8.5 gr/L cloruro de sodio (NaCl)
- 4) .5 ml/L Tween 20
- 5) 3 gr para 100 ml de leche descremada en polvo

Solución de revelado. Amortiguador de citratos 0.05 M pH 4.5.

- 1) 4.6 gr/L de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )
- 2) 7.64 gr/L de citrato trisodium ( $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 3) 4 mg/ 10 ml de orto-fenilendiamina
- 4) 4  $\mu\text{l}$  / 10 ml agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Ácido sulfúrico 2 M ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

- 1) 55.5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cbp 500 ml

## 11. ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| APC           | Célula presentadora de antígeno                             |
| BCG           | Bacilo Calmette- Guérin                                     |
| CFPE          | Extracto protéico de filtrado de cultivo                    |
| CMI           | Inmunidad mediada por células                               |
| Con A         | Concanavalina A   |
| CTAB          | N-acetil-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 |
| ID            | Intradermoreacción  |
| IFN- $\gamma$ | Interferón- gamma   |
| IL            | Interleucina  |
| iNOS          | Sintasa de óxido nítrico inducible                          |
| LAM           | Lipoarabinomanana   |
| MHC           | Complejo mayor de histocompatibilidad                       |
| mRNA          | Ácido ribonucleico mensajero                                |
| NK            | Célula asesina natural                                      |
| NO            | Óxido nítrico   |
| NOS2          | Sintasa de óxido nítrico                                    |
| OMS           | Organización Mundial de la Salud                            |
| PBMC          | Células mononucleares de sangre periférica                  |
| PMN           | Polimorfonucleares  |
| PPD           | Derivado protéico purificado                                |
| PRONABIVE     | Productora nacional de biológicos veterinarios              |
| RT-PCR        | Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa   |
| SDS           | Duodecil sulfato de sodio                                   |
| SFB           | Suero fetal bovino  |
| TB            | Tuberculosis bovina   |
| Tc            | Linfocito T citotóxico                                      |
| TCR           | Receptor de células T                                       |
| Th            | Linfocito T cooperador                                      |
| TNF- $\alpha$ | Factor de necrosis tumoral- alfa                            |
| TNF- $\beta$  | Factor de necrosis tumoral-beta                             |
| UFC           | Unidades formadoras de colonias                             |