



Expresión Diferencial de la *Molécula de Señalización de Activación de Linfocitos (SLAM)* en Macrófagos Bovinos Infeccionados con *Mycobacterium bovis*.

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario y Zootecnista

Por

Elihú Aranday Cortés

Asesores: Dr. José Ángel Gutiérrez-Pabello
MC. Antonio Javier Vallecillo Maza



México, D. F. 2005

m. 349376



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

*Félix Aranday López
Ma. Isabel Cortés Medina*

Los quiero con toda el alma.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Aranday Cortés Eliché

FECHA: 11 octubre 2005

FIRMA: F. Aranday

AGRADECIMIENTOS

A mi hermana **Haydeé** y a mi hermano **Félix** por su ejemplo, su interés, sus buenos consejos y sobre todo por su gran amor.

A **Víctor Hugo** por su infinita amistad y a **Karla** por su compañía y amor.

Al **Dr. José Ángel Gutiérrez-Pabello** por su confianza y las oportunidades brindadas y al **MC. Antonio Vallecillo** por su ayuda e interés, pero sobre todo a ambos por su amistad.

A la **Dra. Silvia Elena Buntinx Dios** por su interés en mí y en mi trabajo y a los **Doctores René Rosiles Martínez** y **Jorge F. Pino Hermosillo** por sus enseñanzas.

A mis amigos **Guillermina Ortiz**, **Betsabé Ángeles**, **Jaime Monrroy**, **David Chávez**, **Kristian Cano** y **Randy Jiménez** por los excelentes momentos que he pasado junto a ustedes.

A mis amigos y compañeros de equipo del Laboratorio de Investigación en Tuberculosis: **Alejandro Benítez**, **Xochitl Vega**, **Irasema Yela** y **Silvia Espinosa** y del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

A **Omar Ramírez**, **Yesenia González** y al **Tte. Alejandro Incháustegui** por su tiempo y ayuda.

A los integrantes de mi jurado por su disponibilidad y atenciones proporcionadas.

Y no por ser la última es menos importante: a **Natalia** por sus sonrisas, la tranquilidad que me da al estar a su lado y su alegría.

Mejores son dos que uno; porque tienen mejor paga de su trabajo. Porque si cayeren, el uno levantará a su compañero; pero ¡ay del solo! Que cuando cayere, no habrá segundo que lo levante. También si dos durmieren juntos, se calentarán mutuamente; más ¿cómo se calentará uno solo? Y si alguno prevaleciere contra uno, dos le resistirán; y cordón de tres dobleces no se rompe pronto.

Libro de Eclesiastés 4: 9-12

Esta tesis fue financiada por lo proyectos:

CONACYT 34833-B

PAPIIT IN 219999

PAPIIT IN 237002-3

El autor recibió beca por parte del:

Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación

PROBETEL

Reconocimiento al Cor. M. C. Ramón Arturo Valdés Espinosa Sub Director de Investigación de la Escuela de Graduados en Sanidad perteneciente a la Escuela Médico Militar por el apoyo brindado en el uso del termociclador en tiempo real y a la Dra. Iris Estrada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional que amablemente donó la cepa de *Mycobacterium bovis* BCG tipo Danesa.

CONTENIDO	Página
ÍNDICE	V
LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS	VIII
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	2
1.1 TUBERCULOSIS BOVINA	3
1.2 MOLÉCULA DE SEÑALIZACIÓN DE LINFOCITOS	
SLAM o CD150	5
1.2.1 FUNCIONES DE SLAM	8
2.0 ANTECEDENTES	10
3.0 JUSTIFICACIÓN	10
4.0 HIPÓTESIS	11
5.0 OBJETIVOS	11
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS	12
6.1 MICROORGANISMO	12
6.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO	12
6.3 MACRÓFAGOS BOVINOS	13
6.4 INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS	13
6.5 EXTRACCIÓN TOTAL DE ARN	14
6.6 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	14
6.7 CUANTIFICACIÓN DE ARNm DE SLAM POR REACCIÓN EN	
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	14
6.7.1 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	15
6.7.2 EFICIENCIA DE LA AMPLIFICACIÓN	16
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16

7.0 RESULTADOS	17
7.1 EFICIENCIA EN LA AMPLIFICACIÓN DE SLAM Y G3PDH EN PCR TIEMPO REAL CON SYBR® GREEN I	17
7.2 CURVA DE DISOCIACIÓN PARA SLAM Y G3PDH CON SYBR® GREEN I	17
7.3 CUANTIFICACIÓN DE SLAM DE MACRÓFAGOS BOVINOS INFECTADOS CON <i>M. bovis</i>	20
8.0 DISCUSIÓN	24
9.0 REFERENCIAS	31
10.0 ANEXOS	37
10.1 ANALISIS ESTADISTICO	37
10.1.1 DATOS	38
10.1.2 ANALISIS DE VARIANZA	38
10.1.3 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS FACTORES	39
10.1.3.1 INTERACCIÓN: GENOTIPO- INFECCIÓN	39
10.1.3.2 INTERACCIÓN: GENOTIPO-TIEMPO DE INFECCIÓN	40
10.1.3.3 INTERACCIÓN: INFECCIÓN-TIEMPO DE INFECCIÓN	41
10.1.4 CÁLCULO DE PRUEBA DE TUKEY	42

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Página

Figuras:

1. Representación esquemática de los miembros de la familia SLAM 7
2. Sinapsis inmunológica y SLAM 8
3. Análisis de alineación de SLAM bovino, murino y humano 9

Gráficas:

1. Validación del método $2^{\Delta\Delta C_T}$ 17
2. Análisis de la curva de disociación de SLAM y G3PDH 19
3. Expresión de SLAM en macrófagos infectados con *M. bovis* de vacas identificadas como resistentes a parásitos intracelulares 21
4. Expresión de SLAM en macrófagos infectados con *M. bovis* de vacas identificadas como susceptibles a parásitos intracelulares 22
5. Expresión de SLAM por fenotipo de animal después de la infección con *M. bovis* 23
6. Expresión de SLAM por tratamiento y hora post-infección 25
7. Expresión de SLAM en cada una de las vacas después de la infección de *M. bovis* 26
8. Expresión de SLAM en los grupos de vacas identificadas como resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares después de la infección con *M. bovis* 27

RESUMEN

ARANDAY CORTÉS, ELIHÚ. Expresión Diferencial de la *Molécula de Señalización de Activación de Linfocitos (SLAM)* en Macrófagos Bovinos Infeccionados con *Mycobacterium bovis*. (Bajo la dirección del MVZ. José Ángel Gutiérrez Pabello y el MVZ. Antonio Javier Vallecillo Maza)

Al considerar la tuberculosis bovina como un problema de salud pública y causa de pérdidas millonarias en la agroindustria de muchos países como México, se hace necesaria la generación de conocimiento sobre los mecanismos de resistencia natural en contra de *Mycobacterium bovis*. Las citocinas características de una respuesta T_H1 son esenciales para la defensa en contra de patógenos intracelulares, incluyendo micobacterias. La molécula de señalización de activación de linfocitos (SLAM, CD150) es una proteína transmembranal que promueve la proliferación de células T y la producción de INF- γ . El objetivo de este trabajo fue cuantificar la expresión de SLAM en macrófagos de origen bovino, infectados con *M. bovis* mediante RT-PCR en tiempo real. De 6 donadores, *Bos taurus* previamente identificados como animales susceptibles (3) y resistentes (3) a parásitos intracelulares, se aislaron monocitos, los cuales fueron infectados con dos cepas de *M. bovis* (9926 y BCG) a una MOI de 10:1 y estimulados con partículas de látex para evaluar tres tiempos post-infección (0 h, 8 h y 16 h). A partir del total de ARN de estas células se sintetizó el ADNc que fue utilizado en el PCR en tiempo real en el que se utilizó SYBR Green I como sistema de detección. La cuantificación de SLAM se realizó mediante el método de cuantificación relativa ($2^{\Delta\Delta C_T}$) usando ADNc de células no infectadas como calibrador y G3PDH como normalizador. *M. bovis* indujo la expresión de SLAM en macrófagos bovinos siendo ésta dependiente del individuo, de la virulencia del patógeno y del tiempo post-infección, además la expresión de SLAM en animales identificados como resistentes a parásitos intracelulares fue mayor en comparación con los animales identificados como susceptibles lo que sugiere que SLAM puede estar involucrada en la capacidad del individuo para montar una mejor respuesta inmune celular contra *M. bovis*.

1.0 Introducción

Hace 123 años, el alemán Robert Albert Koch describía ante la Sociedad Médica de Berlín los experimentos que realizó siguiendo los postulados de Henle que lo llevaron a identificar al bacilo causante de la tuberculosis. Evento que no solamente fue de gran importancia médica sino que también originó enorme interés en el público en general, ya que en esos tiempos casi un tercio de la mortalidad en adultos del mundo occidental era causada por la tuberculosis.¹

En la actualidad según datos de la Organización Mundial de la Salud, la tuberculosis es una de las enfermedades más importantes en el ámbito mundial, ya que es la principal causa de muerte por agente infeccioso, con aproximadamente 2 millones de personas cada año. Cerca de un tercio de la población mundial (6 mil 500 millones) está infectada con el bacilo tuberculoso y cada año alrededor 10 millones de personas en el mundo desarrollan la enfermedad^{2,3} con lo que se ha estimado que mil millones de personas podrían infectarse en los próximos 50 años, 200 millones padecerían la enfermedad siendo mortal para 70 millones de ellas.^{2,4}

Por otra parte, durante el Congreso Británico de Tuberculosis en 1901⁵ y en el cuarto Congreso Mundial de Tuberculosis en 1908, Koch proponía que el bacilo causante de la tuberculosis humana era distinto al causante de la tuberculosis bovina y por lo tanto la infección en humanos no podía ser transmitida por estos animales, considerando innecesario tomar medidas en contra de este tipo de tuberculosis.² Después de numerosos debates científicos, los veterinarios M'Fadyean, Ravel y Bang comenzaron a dudar de las enseñanzas de Koch con relación a la transmisibilidad de la enfermedad del bovino al humano y concluyeron que la tuberculosis bovina era un riesgo para la salud humana, tomando en cuenta a la leche como principal vector de transmisión de algunas formas de tuberculosis humana.⁵

Mientras la mayoría de las infecciones en humanos son causadas por *M. tuberculosis*, de los 2 millones aproximados de personas que mueren anualmente por esta enfermedad se estima que del 4 al 8% de los casos son causados por *M. bovis*.⁶ Sin embargo pocos son los estudios que puedan asegurar la prevalencia de *M. bovis* en humanos infectados, debido a que los medios utilizados en el diagnóstico de la tuberculosis aplicados en humanos, favorecen el crecimiento de *M. tuberculosis* y no permiten determinar con precisión el tipo de micobacteria involucrada en una

infección dada.⁵⁵ Además, los rasgos clínicos, radiológicos y patológicos que provoca *M. tuberculosis* son indistinguibles de los que causa *M. bovis*.⁷

Por mucho tiempo se ha sugerido que el riesgo de infección en humanos con *M. bovis* en México proviene de la leche no pasteurizada,⁸ ya que el 41.3% de la leche producida en este país no pasa por una planta pasteurizadora.⁹ Sin embargo existe la controversia de que el consumo de leche no pasteurizada sea la principal causa de infección, debido a que la tuberculosis en bovinos se presenta principalmente en nódulos linfáticos del tracto respiratorio y pulmones, y solo un 1% de las vacas infectadas secreta el bacilo en su leche.⁵ Por lo que la infección de animales a humanos ocurre también por la inhalación de aerosoles que contengan el bacilo.⁶

1.1 Tuberculosis Bovina

La tuberculosis es causada por diferentes especies de micobacterias que forman parte del complejo tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*,¹¹ este último es el causante de la tuberculosis bovina; una enfermedad infecto-transmisible, de curso crónico y progresivo que afecta a los animales y al hombre, por lo que se considera una zoonosis. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos, mermando así la condición física y productiva del animal enfermo.¹⁰

La patogenia de la infección ocurre en condiciones similares tanto en el hombre como en el bovino, comenzando con la entrada de la bacteria a los pulmones por vía aerógena y la posterior fagocitosis por los macrófagos alveolares que son considerados la primera línea de defensa ante el microorganismo. Sin embargo el papel del macrófago en la tuberculosis es un intrigante dilema, por un lado es la célula en la cual la micobacteria puede sobrevivir, multiplicarse y diseminarse,^{5,6,7,12,13,14} y por el otro se convierte una célula clave para el control y destrucción de este patógeno.^{12, 13, 15, 16, 17}

El macrófago cumple con varias funciones tanto en la inmunidad inespecífica como en la adquirida, destacándose: la fagocitosis y subsiguiente degradación de material extraño, células apoptóticas, microorganismos y células neoplásicas; la secreción de citocinas, quimocinas y otros mediadores solubles, así como la presentación de antígenos a los linfocitos T.¹⁸

Para llevar a cabo estas funciones el macrófago está equipado con una amplia gama de receptores que determinan el control de funciones tales como: crecimiento, migración, reconocimiento, endocitosis, activación, diferenciación y secreción,¹⁹ actividades todas ellas importantes en el papel que desempeña en una respuesta inmune, ya que el macrófago puede actuar como una de las primeras células que responden en contra de microorganismos invasores, como micobacterias, antes de que una respuesta inmune específica sea montada por medio de linfocitos T. Si a pesar de los mecanismos innatos de defensa del macrófago, la micobacteria llega a establecerse dentro de éste y empieza a secretar antígenos, estos son presentados a los linfocitos T. Los macrófagos, después de procesar y presentar un antígeno, ayudan a iniciar una respuesta inmune adquirida a través de los linfocitos T. Esta interacción entre el macrófago infectado con la micobacteria y el linfocito, en especial CD4⁺, es uno de los eslabones más importantes en la respuesta inmune en contra de micobacterias,¹² asistido por linfocitos T CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$ TCR⁺ y linfocitos T $\alpha\beta$ dobles negativos restringidos a CD1.^{13, 20}

Sin embargo, las especies patógenas de micobacterias son parásitos intracelulares que sobreviven al hábitat hostil del macrófago.¹⁶ Estos microorganismos tienen algunos factores de virulencia conocidos para salvaguardarse del macrófago, entre los que están: evadir los mecanismos de eliminación, como la unión del fagosoma con los lisosomas e interferir con la formación de radicales reactivos del oxígeno e intermediarios de nitrógeno,²¹ evitar el reconocimiento de macrófagos infectados por linfocitos T CD4⁺, esto lo logran al inhibir el procesamiento y presentación de sus antígenos sobre Moléculas de Histocompatibilidad clase II (moléculas MHC clase II), además de modular la apoptosis.²² Gracias a esto, la micobacteria sobrevive y se multiplica dentro del macrófago.

La capacidad que tenga el sistema inmunológico del individuo para resolver o controlar la infección, le confiere a éste una resistencia natural en contra de la enfermedad y por lo tanto sobrevivir a la misma. En este sentido se ha descrito la participación de las células T, en especial el papel que tienen los linfocitos T CD4⁺ y su secreción de citocinas características de una respuesta de linfocitos T cooperadores 1 (T_H1); donde el interferón gamma (INF- γ) juega un papel importante en

contra de la tuberculosis, ya que *in vitro* se ha demostrado que el control de *M. bovis* y *M. tuberculosis* está mediado por macrófagos que han sido activados por ésta citocina.^{14, 15, 17, 20, 23}

El INF- γ que es secretado principalmente por linfocitos T activados y células asesinas naturales (NK), promueve la activación de macrófagos, media la inmunidad en contra de virus y bacterias, aumenta la presentación de antígenos, coordina la interacción entre el endotelio y los linfocitos, regula el equilibrio entre L T_H1 y L T_H2, controla la proliferación celular y la apoptosis. Es el más importante de los activadores de macrófagos, de hecho, fue considerado durante mucho tiempo como el factor activador de macrófagos (MAF).²⁵

Los mecanismos para el control de patógenos intracelulares como: la producción de óxido nítrico (NO), radicales reactivos del oxígeno^{23, 25} y la sobre expresión de moléculas MHC II en el macrófago¹⁷ dependen de INF- γ .²⁵ Por esto no es sorprendente que ratones deficientes en la producción de INF- γ o en sus receptores, sean sumamente susceptibles a la infección de bacterias intracelulares como *M. bovis*.^{14, 23, 25}

1.2 Molécula de Señalización de Activación de Linfocitos (SLAM) o CD150

La activación de células T y su sucesiva expansión requiere además de la participación del TCR, de la intervención de señales co-estimuladoras que provienen de moléculas accesorias con el fin de regular o modular algunas funciones en su activación, como el nivel y patrón de citocinas producido. Una de estas moléculas accesorias es SLAM,²⁶ cuyas principales funciones son la proliferación de células T, producción de INF- γ por clones T_H1 y otras involucradas en la inmunomodulación.^{27, 28} Esta glicoproteína transmembranal de 70 kDa, perteneciente a la súperfamilia de Inmunoglobulinas (Ig) y antes considerada parte de la subfamilia CD2,²⁷ hoy en día es considerada una familia independiente de receptores inmunológicos que tienen la habilidad de regular la función de algunas células del sistema inmunológico.²⁹

SLAM es expresada en diferentes poblaciones de leucocitos, estas incluyen: linfocitos T de memoria, diferencialmente en linfocitos T_H1 y T_H2, timocitos inmaduros, una proporción de linfocitos B, células T $\gamma\delta$, basófilos,^{26, 27, 29} células dendríticas,^{30, 31} además de que rápidamente es inducida en células T después su activación,²³ células NK activadas y macrófagos.^{32, 33}

La familia SLAM cuenta con seis miembros llamados: SLAM (CD150), 2B4 (CD244), CD84, Ly-9, NTB-A o Ly-108 y un receptor con actividad citotóxica (CRACC o 19A), todos ellos con una organización similar de tres segmentos: extracelular, transmembranal y citoplasmático. (Figura 1) El segmento extracelular esta formado de 2 o 4 dominios similares a las Ig por los que interactúa con ligandos específicos. En el caso de SLAM, CD84 y CRACC se pueden ligar a un receptor igual localizado en otra célula.²⁹ También por este segmento SLAM es un receptor específico para el virus de sarampión en humanos, y otros morbilivirus como son el virus del distemper canino y rinderpest bovino.³⁴ El segmento citoplasmático presenta varios aminoácidos de tirosina que sirven como sitios activos para proteínas citoplasmáticas de señalización intracelular asociadas a SLAM (SAP) en el caso de linfocitos T y a su homólogo EWS/FLI1 transcrito activado 2 (EAT-2) en el caso de macrófagos.^{29, 35, 36} Aunque la función precisa de EAT-2 en macrófagos es desconocida, se sospecha que sustituya funcionalmente a SAP en estas células.^{37, 38}

Una mutación de SAP es causante de la enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X (XLP) en humanos, también conocida como Síndrome de Purtilo o Enfermedad de Duncan, que es una disfunción inmunológica caracterizada por una inapropiada respuesta a la infección por el virus Epstein-Barr (EBV) provocando: mononucleosis, necrosis de hígado, disgamaglobulinemia y desordenes linfoproliferativos severos como linfomas de Burkitt. Todo esto causado por una acumulación de linfocitos reactivos a EBV debido a una anomalía en la respuesta de células T y NK.³⁵ De ésta manera se deduce que SLAM puede ser de gran importancia para que se lleve una respuesta inmune apropiada y que SAP puede actuar como un regulador negativo de sus funciones.

1.2.1 Funciones de SLAM o CD150

SLAM desempeña un papel importante dentro de la sinapsis inmunológica al cumplir funciones de adhesión y señalización entre la célula T y la célula presentadora de antígenos (APC). De éstas, las más investigadas son las que tienen que ver con la co-estimulación sobre células T y su proliferación, así como con el control en la producción de INF- γ .^{26, 27, 28, 29, 33, 36} (Figura 2)

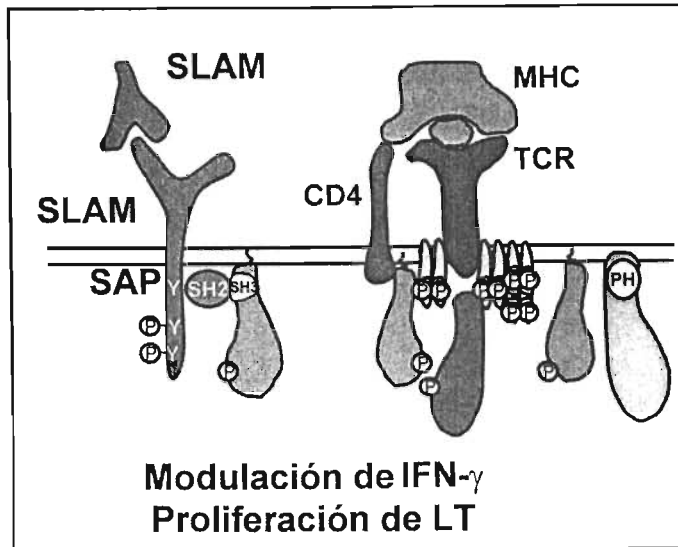


Figura 2. Modelo que muestra la participación de SLAM en la sinapsis inmunológica y el efecto de la señalización de SLAM en la activación de linfocitos T. (Modificado de Veillet A, and Latour S. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:277)

CD150 ha sido estudiado en el modelo humano y murino donde ha mostrado que posee diversas funciones, estas incluyen: co-estimulación de células T y B,²⁶ aumento en la producción de INF- γ por células T,²⁷ redirección de clones T_{H2} a los fenotipos T_{H1} o T_{H0}, alteración en la susceptibilidad de células B a la apoptosis inducida por Fas,³⁶ regulación en la citotoxicidad de células T,³² control en la liberación de citocinas proinflamatorias por células dendríticas^{30, 31} y producción de IL-6, IL-12, TNF- α y NO en macrófagos.³³

La transducción de la señal en las células del sistema inmune es una interacción entre proteínas de la superficie celular, que convierten un estímulo en la activación de genes para dar una respuesta. La forma por la que SLAM controla las señales de activación celular, es por medio de SAP en linfocitos y EAT-2 en APC, ambas esenciales para regular la fosforilación de tirosina en su

segmento intracelular.³⁵ Estudios en humanos con XLP y en ratones deficientes de SAP (ratones SAP^{-/-}) han demostrado el papel de éste en la regulación de las funciones de SLAM. Los linfocitos T de ratones SAP^{-/-} tienen un incremento en la producción de INF- γ en respuesta a la estimulación de su TCR por un antígeno, además muestran una disminuida respuesta T_H2 (que normalmente resulta en la producción de IL-4, IL-10 e IL-13) después de una infección con *Leishmania major*.³⁶ Por otro lado, ratones deficientes en SLAM (ratones SLAM^{-/-}) son evidencia de que esta proteína es necesaria para el buen funcionamiento de los macrófagos, ya que en un estudio se observó, una disminución en la producción de IL-12, TNF- α y NO y un aumento en la producción de IL-6 en los macrófagos SLAM^{-/-} cuando fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS) y al ser infectados ratones C57BL/6 SLAM^{-/-} con *L. major* sus macrófagos perdieron la habilidad de sobrevivir a la infección debido a los reducidos niveles de IL-12, TNF- α y NO.³³

Aunque las funciones de SLAM han sido descubiertas en modelos diferentes al de bovino, cabe destacar que hay una zona conservada en la secuencia de aminoácidos críticos en el dominio intracitoplasmático del humano, el ratón³⁹ y el bovino. (Figura 3) Lo que hace suponer que las funciones descritas, pudieran darse también en el caso del bovino.

		301		351
SLAM Murino	KSL	TIYQAQVQ	KSGPQEKKLH DALTDQDPCT TIYVAATEPA PESVQEPNPT	TVYASVTL PES
SLAM Bovino	KSL	TIYQAQVQ	TSGSVQKKPD PLPA.QDPCT TIYVAATEPV PEPIQESGSF	TVYASVTL PES
SLAM Humano	KSL	TIYQAQVQ	KPGPLQKKLD SFPA.QDPCT TIYVAATESV PESVQETNSI	TVYASVTL PES

Figura 3 Representación esquemática de los aminoácidos críticos en el segmento citoplasmático de CD150 bovino y su alineación con las secuencias de CD150 del ratón y el hombre. El cuadro gris encierra los motivos de unión altamente específicos con SAP (TIYxxV) mientras que el motivo TVYxxV (negrillas) es un sitio débil de unión también con SAP.

Tomando en cuenta la participación que tiene SLAM para regular la función de algunos tipos celulares y que la inmunidad a patógenos intracelulares, como las micobacterias, requiere de la producción de INF- γ para la activación de los monocitos y los macrófagos, de tal forma que aumenten los mecanismos necesarios para la eliminación de los microorganismos fagocitados; la producción de esta proteína por el macrófago es de gran importancia, ya que podría regular su activación y contribuir a la resistencia en contra de la micobacteria.

2.0 Antecedentes

En el año de 1995, Benjamín G. Cocks reporta un receptor, denominado SLAM, involucrado en la activación de células T en humanos. Sin embargo, los métodos de identificación empleados en sus experimentos, no detectaron esta proteína en macrófagos.²⁶

Cuatro años después, en 1999, Gutiérrez-Pabello encuentra evidencia de la existencia de SLAM en poblaciones celulares altamente enriquecidas con macrófagos bovinos⁴⁰ y para el 2001, Tatsuo, *et al.* reportan la secuencia de SLAM a partir del total de ARN proveniente de células mononucleares de sangre periférica de bovino,³⁴ abriendo así la puerta a la investigación de esta molécula en poblaciones celulares de este animal. Ese mismo año, García *et. al.* investiga la expresión y regulación de SLAM en humanos infectados con *M. leprae* y su relación con una respuesta T_H1.⁴⁹ En el 2004, el mismo grupo estudia la influencia de la expresión de SAP en la producción de INF- γ en la infección de *M. tuberculosis*.⁴¹

Los trabajos realizados por García, en donde se asocia la sobre expresión de SLAM con los individuos que tiene una mejor respuesta y control en contra de *M. leprae* y *M. bovis*,^{41,42} hacen pensar que existe una relación entre la expresión de esta proteína con la resistencia natural a parásitos intracelulares.

En otro sentido, en 2003, Vallecillo identifica bovinos resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares, específicamente *M. bovis*, mediante el ensayo bactericida,⁴³ mismos que fueron utilizados en el presente trabajo.

3.0 Justificación

Como ya se ha explicado, la tuberculosis bovina no solo es un riesgo para la salud pública, sino también causa, directa e indirectamente, grandes pérdidas económicas en la agroindustria de algunos países. En México, la tuberculosis bovina es trascendental porque representa una barrera no arancelaria para la libre comercialización de animales y productos derivados exportados a otros países. Cada año México exporta a los Estados Unidos entre ochocientas mil y un millón trescientas mil cabezas de ganado bovino, lo que significa un ingreso de alrededor de 450 millones de dólares a los productores nacionales de ganado.^{10,44} Cuando un animal infectado es detectado, se toman medidas que limitan el paso de animales provenientes de México. Esto trae como

consecuencia descontrol en el mercado interno y disminución de los precios; y no menos importante, es la disminución de los parámetros productivos, muerte de los animales, desecho prematuro y decomisos de animales infectados. Los estados interesados en continuar exportando bovinos, deben establecer regiones de baja prevalencia, menor al 0.5%, a fin de mejorar las posibilidades de exportación.

Considerando que para elevar la producción y mejorar la calidad sanitaria de los productos de origen animal, así como mantener e incrementar la exportación de ganado bovino en pie hacia otros países y permitir a la ganadería nacional desarrollarse en mejores condiciones sanitarias, se hace necesaria la generación de conocimiento sobre los mecanismos de resistencia natural a patógenos de importancia en salud veterinaria como es el caso de *M. bovis*.

Con este trabajo se pretende contribuir al mejor entendimiento de la respuesta inmune que se monta en contra de este patógeno. Esto, como una de las estrategias para conseguir en un futuro el perfeccionamiento o creación de métodos de diagnóstico y vacunas en contra de la tuberculosis, así como también considerar la capacidad del animal en controlar con eficiencia una infección en la selección de las especies domésticas, lo que en su conjunto nos conducirá al control y erradicación de esta enfermedad.

4.0 Hipótesis

La infección por *Mycobacterium bovis*, induce la expresión diferencial de SLAM en macrófagos de bovino; siendo ésta dependiente de cada individuo.

5.0 Objetivos

Cuantificar la expresión de SLAM en macrófagos de origen bovino, infectados con *Mycobacterium bovis*.

6.0 Materiales y Métodos

6.1 Microorganismos

Para llevar a cabo las infecciones se utilizó la cepa patógena *M. bovis* 9926, la cual se aisló de tejido pulmonar con lesiones sugestivas a tuberculosis de un animal procedente de Acatic, Jalisco, sacrificado en septiembre de 1998, así como la cepa apatógena *M. bovis* BCG tipo Danesa. Ambas cepas se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H11 (Bacto[®] Mycobacteria 7H11 agar, Difco Laboratorios, Detroit MI USA) enriquecido con 10% de ácido oléico, catalasa y dextrosa (BBL[™] Middlebrook OADC Enrichment, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA) y se incubaron a 37 °C.

6.2 Preparación del inóculo

De las cajas de agar, se tomaron 5 colonias y se sembraron en 30 ml de caldo Middlebrook 7H9 (BBL[®] Middlebrook 7H9 Broth base, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD USA) con 10% de OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA) incubándose por un periodo de 8 días a 37°C en agitación orbital. Al final de la incubación, cada cultivo bacteriano fue transferido a un matraz con 270 ml de medio fresco para incubarlo en las mismas condiciones. De cada una de las cepas de *M. bovis* se realizó, previamente, una cinética de crecimiento bacteriano para establecer el día en el cual se alcanzaría la fase logarítmica.⁴⁴ Cuando los cultivos de cada una de las dos cepas seleccionadas alcanzaron el período establecido para su cosecha, se centrifugó el cultivo bacteriano a 2500 x g por 15 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se suspendió dos veces en PBS (cloruro de sodio 1.5mM, fosfato de sodio monobásico 9.1 mM, fosfato de sodio dibásico 1.25 mM) y se centrifugó en las condiciones antes descritas por 10 min. Después de retirado el sobrenadante, se suspendió en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI Medium 1640 Invitrogen[™] Corporation Grand Island, NY USA) complementado (aminoácidos esenciales 0.1mM, piruvato de sodio 1mM, L-glutamina 2mM y bicarbonato de sodio NaHCO₃ 20mM) mas 15% de suero fetal bovino (Gibco[™] Invitrogen Corporation Grand Island NY USA) Para dispersar los agregados bacterianos, se pasó dos veces la suspensión de bacterias con una jeringa a través de una aguja 27G x 13 mm. La suspensión obtenida se transfirió en cantidades de 1 ml a tubos con capacidad de 1.5 ml, se guardaron por 12

h a -20°C y posteriormente el lote de inóculos se almacenó a -80°C hasta su uso. Para determinar la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), de cada cepa se descongeló un tubo por incubación a 37°C y se le realizaron una serie de diluciones décuples seriadas de la suspensión bacteriana sembrándose por triplicado 100 µl de ésta en placas de agar Middlebrook 7H11 enriquecido con 10% de OADC. Las placas se incubaron de tres a cuatro semanas a 37 °C. La cantidad de UFC se obtuvo por ml, aplicando la siguiente ecuación:

$$(UFC)(FD)(10) = \text{bacterias/ml}$$

en donde: *UFC* = unidades formadoras de colonias y *FD* = factor de dilución

6.3 Macrófagos bovinos

Se obtuvieron macrófagos derivados de monocitos, a partir de sangre venosa periférica bovina con ácido cítrico-dextrosa (ACD) (citrato trisódico 75 mM, ácido cítrico 41.6 mM y glucosa 135 mM; pH 5.0) de 6 donadores, *Bos taurus*, clínicamente sanos, PPD negativos, en etapa productiva y previamente identificados como animales susceptibles (3) y resistentes (3) a parásitos intracelulares.⁴³ Las células fueron aisladas por centrifugación usando un gradiente de Percoll (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) y fueron cultivadas en matraces de teflón de acuerdo a la técnica descrita anteriormente.^{42,45} Las muestras se obtuvieron de animales pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

6.4 Infección de macrófagos

Después de trece días de maduración de los macrófagos, se infectaron 2×10^6 macrófagos con *M. bovis* usando una multiplicidad de Infección (MOI) de 10:1. Posteriormente los matraces conteniendo a las células, se centrifugaron a 200 x g por 10 min e incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 4 h. Después de que transcurriera el tiempo necesario para la fagocitosis, las células se lavaron con PBS para remover las bacterias extracelulares (éste momento se consideró el tiempo cero) y se incubaron nuevamente durante 8 y 16 horas utilizando las mismas condiciones. Se utilizaron como controles, macrófagos sin infectar, así como macrófagos estimulados con partículas de látex (Sigma-Aldrich CO: St. Louis MO USA 1.1 µm) para poder descartar la expresión del gen como consecuencia de la fagocitosis. Estos macrófagos fueron tratados de la

misma manera para poder mantener comparaciones válidas.⁴⁶ La obtención y la infección de los macrófagos se realizaron por duplicado.

6.5 Extracción total de ARN

ARN total fue aislado de macrófagos no infectados, estimulados con perlas de látex e infectados (MOI 10:1) después de las 0, 8 y 16 h post-infección. El aislamiento de ARN se realizó con el reactivo Tripure[®] (Roche Diagnostics Corporation Indianápolis, IN USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras fueron tratadas con DNasa (QIAGEN[®] Valencia, CA USA) y purificadas mediante columna (QIAGEN[®] Valencia, CA USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprobó la integridad del ARN mediante gel de agarosa (Gibco BRL Life Technologies Grand Island NY USA) al 1% y se cuantificó por espectrofotometría en agua libre de nucleasas (Gibco BRL Life Technologies Grand Island NY USA) a una densidad óptica a 260 nm.

6.6 Síntesis de ADN complementario

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

6.7 Cuantificación de ARNm de SLAM por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Para la detección de SLAM se diseñaron los iniciadores sentido 5'-ATG CCC AAG TCC AGA CAT CAG GTT-3' y antisentido 5'-ACA CTG GCA TAG ACC GTG AAG GAA-3' (no. de acceso GenBank AF329970) y para el control interno gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) sentido 5'-CAT GTT TGT GAT GGG CGT GAAA CCA-3' y antisentido 5'-TAA GTC CCT CCA CGA TGC CAA AGT-3' (no. de acceso GenBank U85042) en el programa IDT's PrimerQuestSM desarrollado por Whitehead Institute for Biomedical Research. El PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM[™] 7000 Sequence Detection System-SDS versión del programa 1.1 (PE

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando SYBR[®] Green I (10,000x Cambrex Bio Science Rockland Inc USA) como sistema de detección. La reacción de amplificación se llevo a cabo en un volumen final de 25 µl los cuales contenían SYBR[®] Green I (0.165x), Buffer PCR 1x (20 mM Tris-HCL pH 8.4 y 50 mM KCl), MgCl₂ (4 mM), dNTPs (200 µM cada uno), iniciadores (0.5 nM de cada uno), Platinum[®] Taq ADN polimerasa (1.25 U) (Invitrogen[™] São Paulo, SP Brasil) y 5 µl del ADNc diluido. Estas se colocaron en placas ópticas de 96 pozos después de una activación de la enzima a 95°C por 10 min bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 15 seg, alineación a 60°C por 15 seg, extensión a 72°C por 40 seg; al final de los 35 ciclos se le dio una extensión de 5 min a 72°C. Finalizado el PCR, la temperatura fue incrementando de 60°C a 95°C para construir una curva de disociación. Se colocó una reacción control sin template de ADNc (NTC) en cada placa y cada muestra se ejecutó por cuadruplicado.

6.7.1 Método de cuantificación

En el PCR por tiempo real, los valores de fluorescencia son medidos cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en la reacción. Entre más template presente una reacción al comienzo del PCR, menor es el número de ciclos que se necesitan para alcanzar un punto en el que la fluorescencia es medida por encima de la fluorescencia normal de la reacción (C_T).^{47, 48} Existen dos métodos para la cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real. El método de cuantificación absoluta y el método de cuantificación relativa.⁴⁹ En el primer método, se compara el C_T de la muestra desconocida con una curva estándar de una muestra cuantificada por medios independientes y con un número de copias conocidas. Para preparar éstas, Plásmidos, ARN sintetizado *in vitro* o ADN genómico son usados comúnmente. La concentración es medida a 260 nm y se convierte a número de copias usando el peso molecular de ADN o ARN. En el método de cuantificación relativa, se compara el C_T de la muestra desconocida en contra de una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestras provenientes de células no infectadas). Todas las cuantificaciones, también son normalizadas con un control endógeno como G3PDH para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de ARN y en la eficiencia de reacción en la transcripción reversa. Este método es similar al de la cuantificación absoluta por curva estándar, excepto que en este método se utilizan formulas aritméticas para alcanzar el

mismo resultado.⁴⁹ Este último método fue seleccionado debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido.⁵⁰

Primero, el C_T del producto de SLAM (C_T SLAM) y del control interno G3PDH (C_T G3PDH) son determinados para cada muestra. La diferencia que resulta de C_T SLAM y C_T G3PDH es llamada ΔC_T ; y se calcula para normalizar las diferencias en la extracción de ARN y en la eficiencia de la reacción de síntesis de ADNc. El ΔC_T de cada muestra es restado del ΔC_T del calibrador. Esta diferencia es llamada $\Delta\Delta C_T$. Por último, la expresión de SLAM normalizada con el control interno (G3PDH) y relativa al calibrador, se calcula por $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Así, la diferencia en la expresión de SLAM se expresa como n -veces relativa al calibrador. Las ecuaciones para calcular $\Delta\Delta C_T$ para el método de cuantificación relativa son:

$$C_T \text{ SLAM} - C_T \text{ G3PDH} = \Delta C_T.$$

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

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

6.7.2 Eficiencia de la amplificación

Para que el método de cuantificación relativa sea válido, la eficiencia en la amplificación de SLAM y el control interno, G3PDH, deben ser aproximadamente iguales. Para determinar esta eficiencia, cinco diluciones decuples seriadas de un producto de PCR, cuantificado a 260 nm y conteniendo el fragmento esperado para cada gen, fueron amplificadas por triplicado bajo las condiciones arriba descritas para obtener los valores de C_T . Con esto, se obtuvieron los valores de ΔC_T que fueron graficados en contra de la cantidad total de fragmento de PCR y se calculó la regresión lineal. El valor absoluto de la pendiente graficada debe ser menor a 0.1. Una vez probado esto, se puede utilizar el método de cuantificación relativa comparativo sin la necesidad de correr una curva estándar en cada placa.^{53, 54}

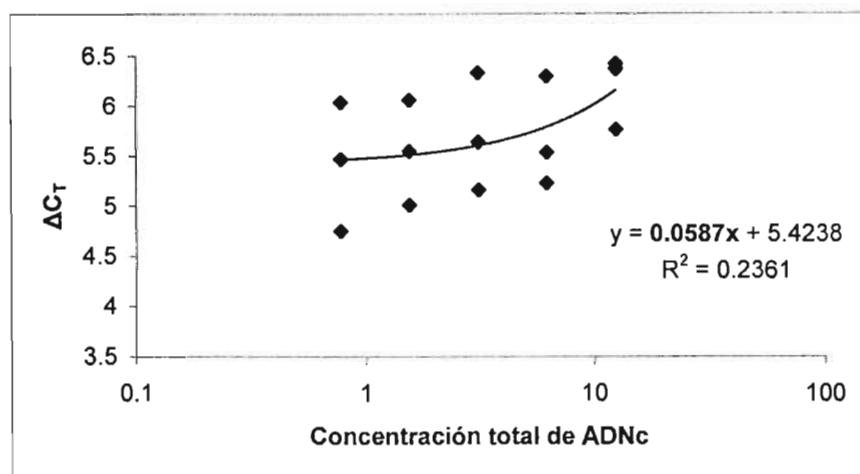
6.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó en los programas SPSS SYSTAT versión 11.0, Excel y GraphPad Prism versión 4.0. Se usó ANOVA y Tukey para analizar la diferencia en la expresión y la interacción entre los factores y sus niveles. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.05$. (Anexo)

7.0 Resultados

7.1 Eficiencia en la amplificación de SLAM y G3PDH en PCR tiempo real con SYBR® Green I

Para determinar la eficiencia en la reacción, se amplificaron cinco diluciones decuples seriadas por triplicado de un ADNc conteniendo los fragmentos de interés. El ΔC_T resultante de la diferencia entre SLAM C_T y G3PDH C_T de las diferentes diluciones, fue graficado en contra de la concentración total de ADNc (ARN total) obteniendo un valor de la pendiente de 0.058 (Gráfica 1) por lo que se puede calcular $\Delta\Delta C_T$ para utilizar el método de cuantificación relativa.



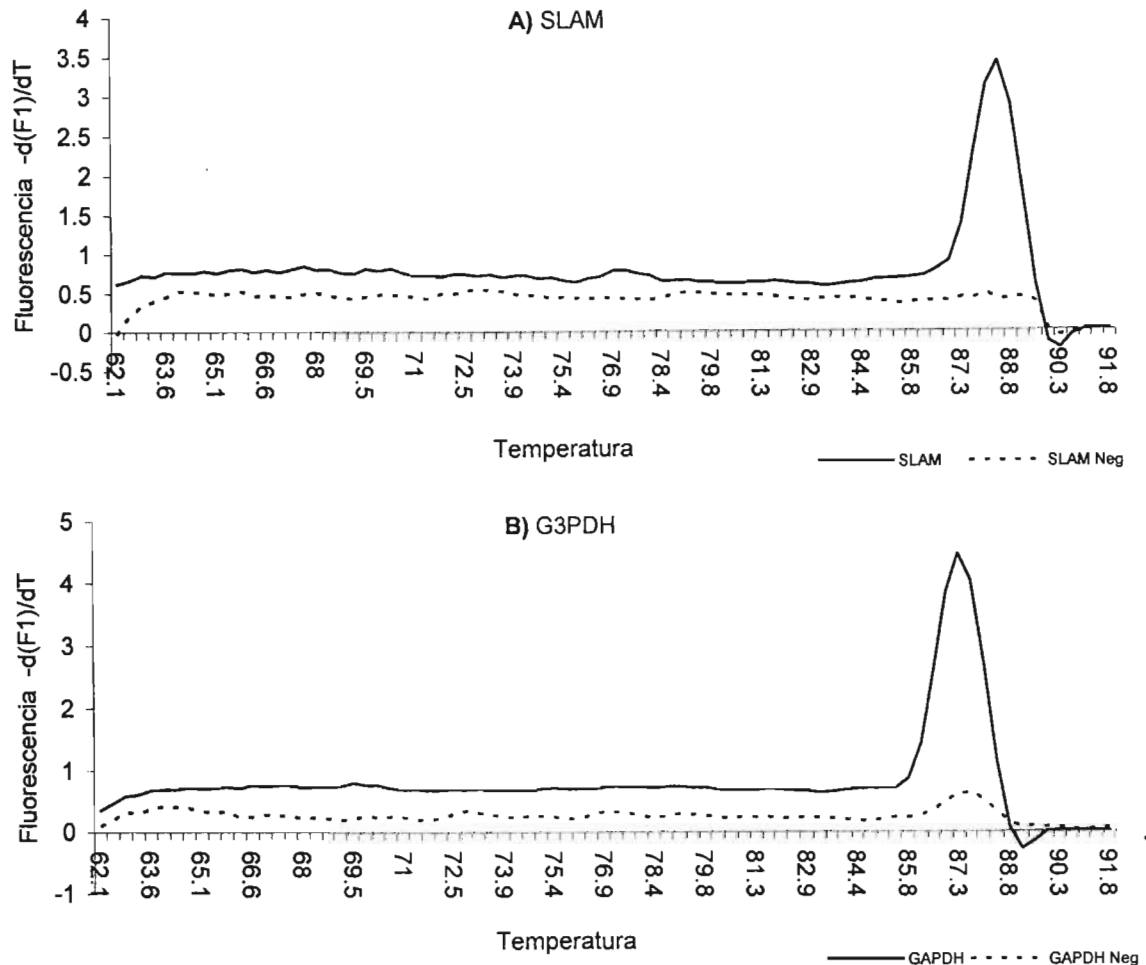
Gráfica 1. Validación del método $2^{\Delta\Delta C_T}$: se determina la eficiencia de la reacción de SLAM y el control interno G3PDH por medio de PCR tiempo real con SYBR® Green I. Diluciones decuples seriadas del ADNc fueron amplificadas usando los iniciadores específicos para cada gen. El ΔC_T fue calculado para cada dilución ($C_{T-G3PDH} - C_{T-SLAM}$) y los datos fueron analizados por regresión lineal. La figura muestra la gráfica entre la concentración de ADNc contra ΔC_T . El valor absoluto de la pendiente debe ser menor a 0.1, la pendiente en la figura es de 0.058 por lo que es valido utilizar este método para la cuantificación.

7.2 Curva de disociación para SLAM y G3PDH con SYBR® Green I

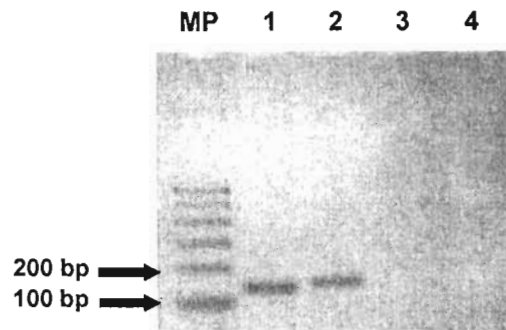
Como el SYBR® Green I se une a cualquier doble cadena de ácido nucleico aun sin la secuencia específica de interés (como por ejemplo dímeros de iniciadores) se realizó un análisis de la curva de disociación para identificar los productos generados en la PCR en presencia de SYBR® Green I. Este análisis permite la caracterización de los productos de PCR y de los dímeros de iniciadores según sus conductas de disociación.

Durante el PCR la fluorescencia inicial es baja e incrementa a cada ciclo. En contraste, al principio de una curva de disociación, la reacción esta a una temperatura baja y la fluorescencia es alta; como la temperatura incrementa de una manera constante, la fluorescencia caerá súbitamente hasta que se alcance el punto de disociación característico (T_m) para cada fragmento de ADN. La proporción en el cambio de fluorescencia como una función de la temperatura se grafica. Un producto homogéneo y puro de PCR, produce una curva de disociación sencilla, bien definida y con un pico estrecho. En cambio, dímeros de iniciadores se disocian a bajas temperaturas y muestran picos anchos en sus curvas.⁵⁴

Las curvas de disociación para el producto de SLAM y para el producto de G3PDH se muestran en la gráfica 2 (A y B respectivamente). Se observa que el producto específico de SLAM alcanza su pico de T_m a 88.8 °C y el producto de G3PDH a 87.3 °C; en ninguno de las dos graficas, los controles, que no contienen el template en la reacción (NTC), muestran claramente algún pico de T_m causado por dímeros de iniciadores antes de estas temperaturas. Sin embargo, para demostrar esta especificidad, los productos de PCR fueron verificados por medio de un gel de agarosa al 2%; solo un producto de 147 bp fue observado para SLAM y un producto de 130 bp fue observado para G3PDH. (Gráfica 2C)



C)



Gráfica 2 Análisis de la curva de disociación de SLAM y G3PDH. Valoración en la especificidad de los iniciadores en el PCR para SLAM y G3PDH por curva de disociación y gel de agarosa. A) Muestra los resultados de la curva de disociación (Derivada negativa de la fluorescencia contra temperatura) para SLAM en el PCR tiempo real con SYBR Green I y B) para G3PDH. C) Verificación de los productos de SLAM y G3PDH por gel de agarosa al 2%. MPM: marcador de peso molecular de 100 bp, 1: G3PDH 130 bp, 2: SLAM 147 bp, 3: G3PDH negativo (NTC) y 4: SLAM negativo (NTC).

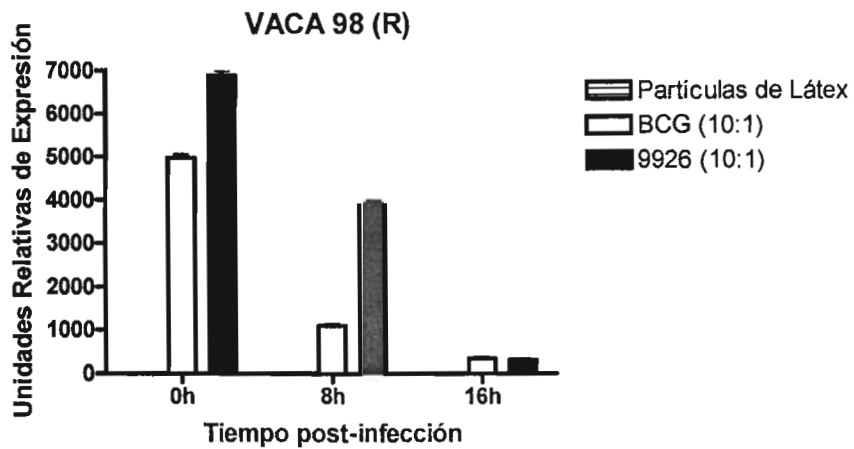
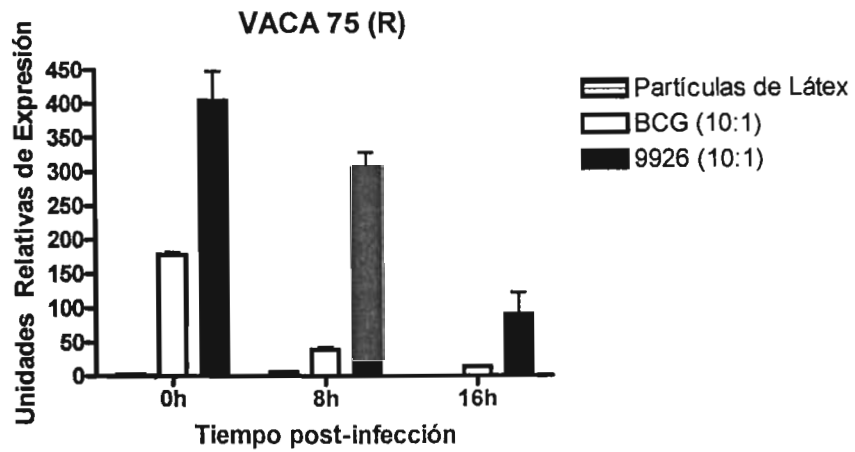
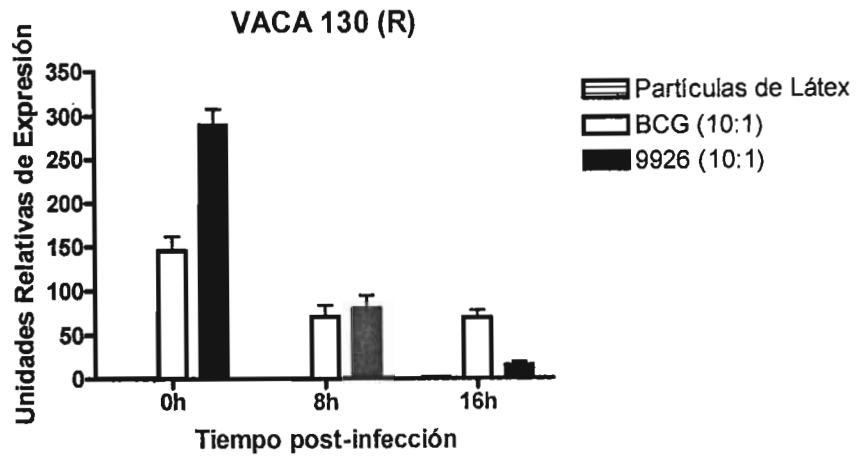
7.3 Cuantificación de SLAM de macrófagos bovinos infectados con *M. bovis*

La expresión de SLAM fue medida en macrófagos bovinos no infectados e infectados a las 0 h, 8 h y 16 h con *M. bovis* 9926, virulenta, *M. bovis* BCG, no virulenta y estimulados con partículas de látex. La cuantificación final se realizó usando el método de cuantificación relativa y la diferencia en la expresión de SLAM se reportó como *n*-veces relativa al ADNc calibrador (macrófagos no infectados).

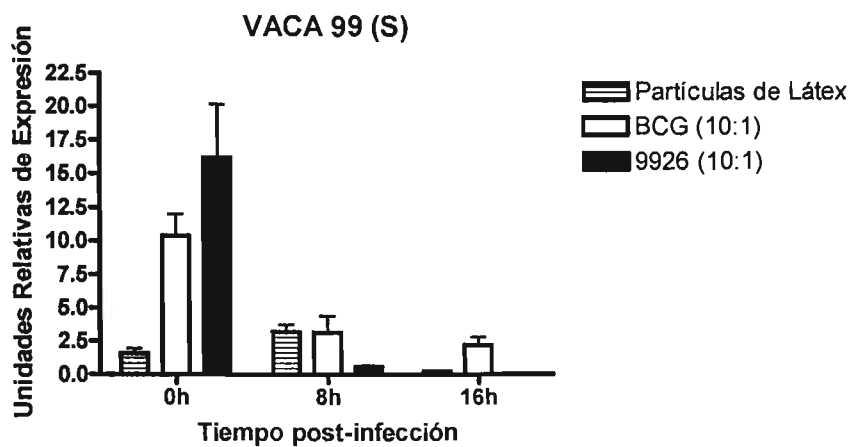
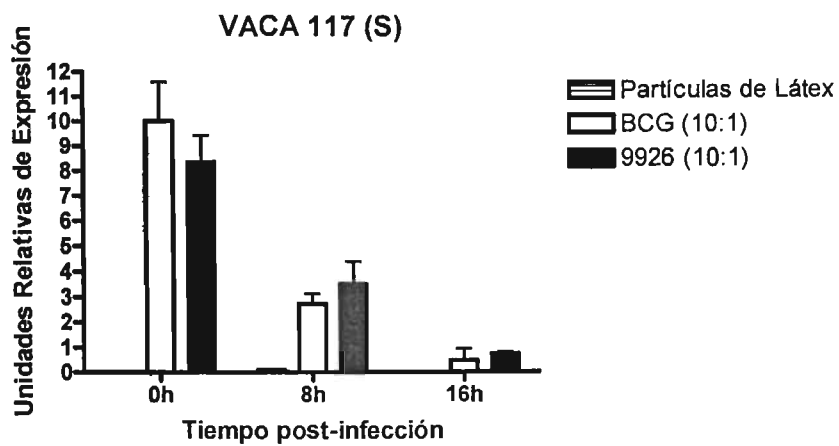
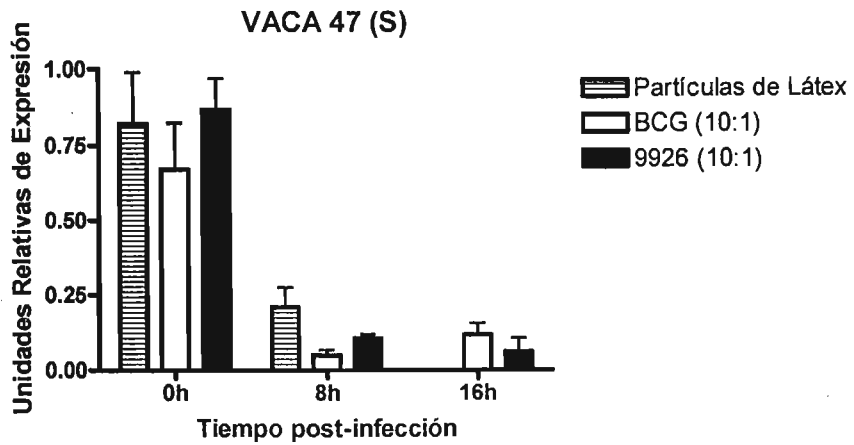
De esta forma se obtuvo que el ARNm de SLAM en cinco animales fue sobre expresado en sus macrófagos después de la infección con *M. bovis* virulenta y no virulenta, y solo en un animal (vaca 47) la expresión de SLAM disminuyó en comparación con las células no infectadas. (Gráficas 3 y 4).

En éstos cinco animales, independientemente de la cepa (BCG o 9926), el mayor nivel de expresión de SLAM se alcanzó a la hora cero para luego disminuir a las 8 h y 16 h post-infección. Éste punto más alto de expresión se observó en cuatro animales (vaca 98, 75, 130 y 99) al ser infectados con la cepa virulenta 9926 de *M. bovis* y solo un animal (vaca 117) mostró mayor expresión al ser infectada con la cepa no virulenta BCG, sin embargo la diferencia con respecto a los macrófagos infectados con la cepa 9926 en éste animal fue solo de ± 2.03 veces, lo que no es significativo en comparación con los otros animales cuya diferencia va desde ± 150 a $\pm 3,000$ veces. (Gráfica 3 y 4)

A las 8 h post-infección en todos los animales clasificados como resistentes y en un animal clasificado como susceptible (vaca 117), se observó que la expresión de SLAM es mayor en los macrófagos infectados con la cepa 9926 en comparación con los infectados con la cepa BCG. Por último, a las 16 h post-infección solo en dos animales (vaca 130 y 75) existió una diferencia entre la expresión con la cepa patógena 9926 y la cepa apatógena BCG. La vaca 130 (al igual que las vacas 98 y 99 en las cuales no fue significativo) expresó un nivel mayor de SLAM en los macrófagos infectados con la cepa BCG en comparación con los infectos con la cepa 9926, fenómeno contrario al que ocurrió en la vaca 75 (al igual que la vaca 117 en la cual no fue significativo) en donde los macrófagos infectados con la cepa 9926 expresaron un nivel mayor de SLAM. (Gráfica 3 y 4)

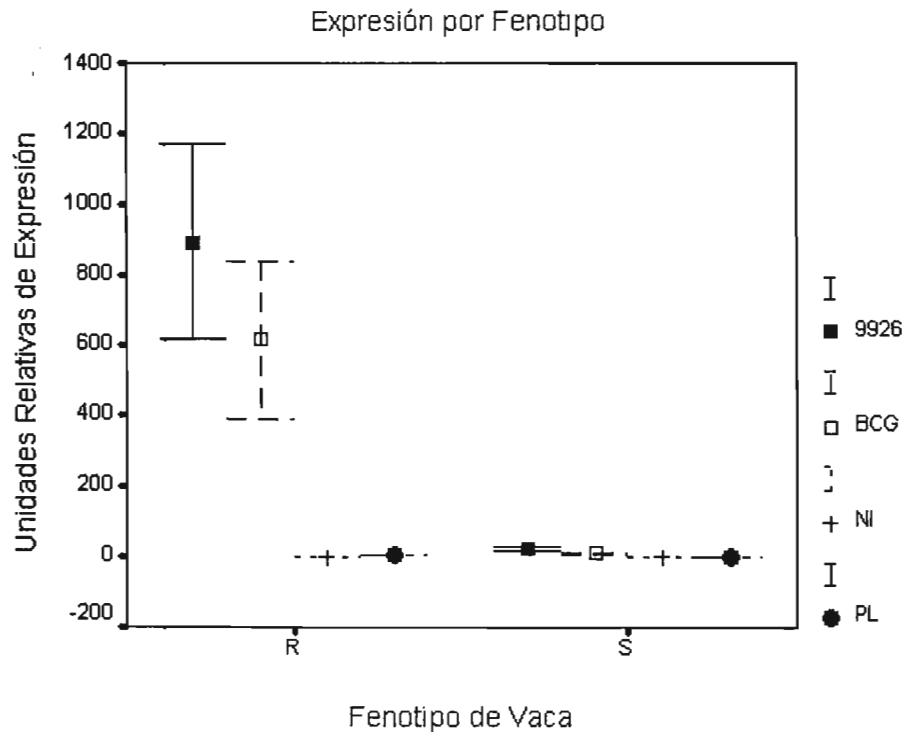


Gráfica 3. Expresión de ARNm de SLAM en macrófagos infectados con *M. bovis* virulenta (9926) y no virulenta (BCG) de vacas identificadas como resistentes (R) a parásitos intracelulares (vacas 130, 75 y 98) a las 0, 8 y 16 horas post-infección. Resultados representativos de dos ensayos.



Gráfica 4. Expresión de ARNm de SLAM en macrófagos infectados con *M. bovis* virulenta (9926) y no virulenta (BCG) de vacas identificadas como susceptibles (S) a parásitos intracelulares (vacas 117, 47 y 99) a las 0, 8 y 16 horas post-infección. Resultados representativos de dos ensayos.

Al tener identificados a los animales en resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares ⁴³ se observó que los niveles de expresión de SLAM, dado en unidades relativas de expresión, en los macrófagos infectados con la cepa apatógena BCG y patógena 9926 de *M. bovis* son superiores en los animales clasificados como resistentes en comparación con los animales clasificados como susceptibles. (Gráficas 5)



Gráfica 5. Media de expresión de ARNm de SLAM en los grupos de vacas identificadas como resistentes (R) y susceptibles (S) a parásitos intracelulares después de la infección con *M. bovis* virulenta (9926) y no virulenta (BCG). El grupo R presenta una media de expresión de SLAM mucho mayor que el grupo S al ser infectado con 9926 y BCG. NI: macrófagos no infectos, PL: macrófagos estimulados con partículas de látex. n= 2, $p < 0.05$.

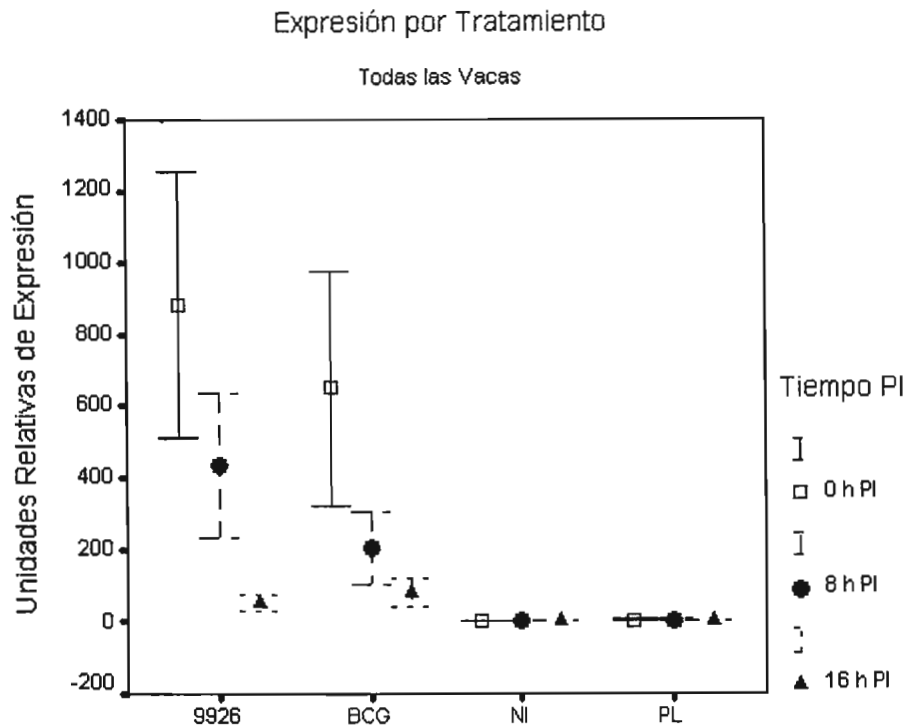
8.0 Discusión

Una serie compleja de interacciones entre varios tipos celulares controlan y contienen a *M. bovis*, así como previenen la reactivación de la infección.¹² Tanto células NK como Linfocitos T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ de fenotipos $CD4^+$ y $CD8^+$ son movilizados en orden secuencial después de la infección con *M. bovis*.^{51,52} Todas estas células contribuyen con su potencial citotóxico¹⁷ y su capacidad para producir INF- γ , el cual juega un papel central en la defensa en contra de la micobacteria.^{13,14} Todo lo anterior indica que la respuesta en contra de la micobacteria esta mediada por células y requiere de la generación de una respuesta Th1.^{14,23} Para que esto se dé, el macrófago y sus citocinas son el vinculo de unión entre la respuesta innata y la específica, es decir, que la respuesta inmune celular en contra de la micobacteria está centrada en la capacidad del macrófago para procesar y presentar antígenos y así estimular linfocitos T $CD4^+$. Sin embargo, el reconocimiento de un péptido antigénico por su TCR específico en combinación con el enlace de la molécula de MHC no es suficiente para estimular a un linfocito T, se necesitan otras señales provenientes de citocinas aportadas por las células presentadoras de antígenos, así como la participación de varios de sus receptores de superficie.

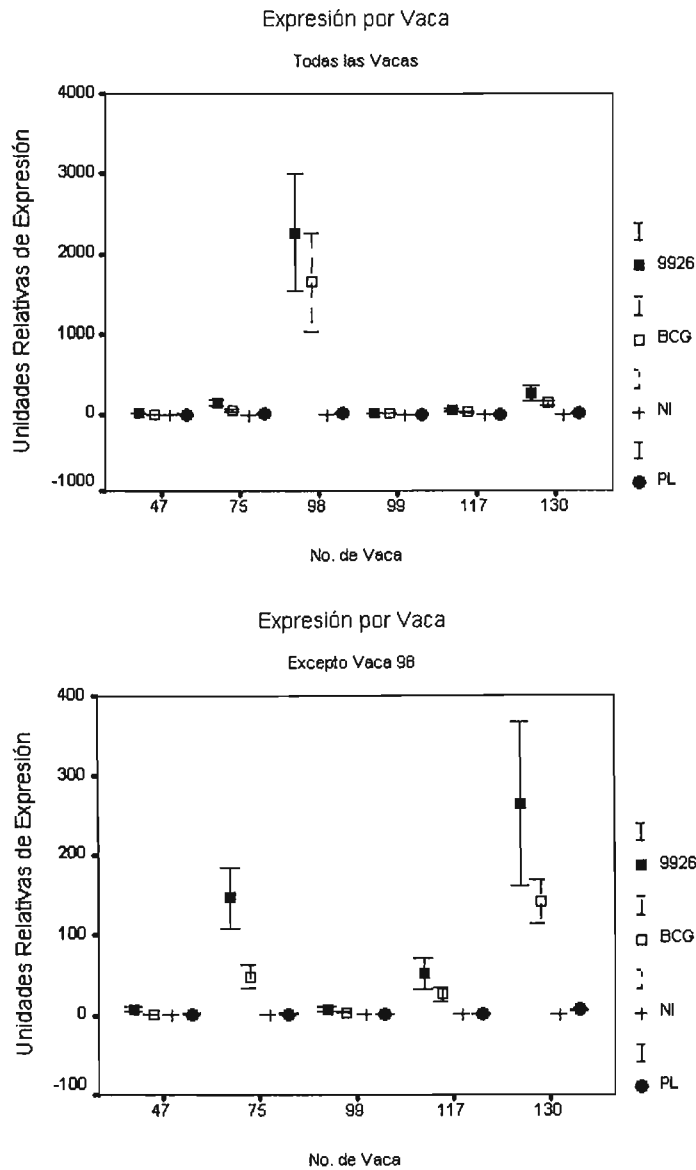
Debido a que SLAM es una de esas moléculas co-estimuladoras y reguladoras sobre células T,²⁶ específicamente: en la producción de INF- γ y TNF- α por LT_{H1} ,²⁷ redirección de clonas T_{H2} a los fenotipos T_{H1} o T_{H0} ,³⁶ regulación en la citotoxicidad de células T,³² control en la liberación de citocinas proinflamatorias en células dendríticas^{30,31} y en la producción de IL-6, IL-12, TNF- α y óxido nítrico (NO) en macrófagos;³³ en este trabajo se investigó su nivel de expresión en macrófagos infectados con *M. bovis*.

Aquí se presenta evidencia clara de la existencia de SLAM en poblaciones celulares altamente enriquecidas con macrófagos de origen bovino. Sin embargo debido al método de extracción de monocitos (*ver material y métodos*) no se puede descartar la amplificación de SLAM a partir de linfocitos. Para resolver esto, se podría complementar el aislamiento de monocitos con otras técnicas como la citometría de flujo.

La infección de *M. bovis* indujo la expresión de SLAM en macrófagos de origen bovino, siendo esta dependiente del individuo, la virulencia del patógeno y el tiempo post-infección (Gráficas 6, 7 y Anexo)

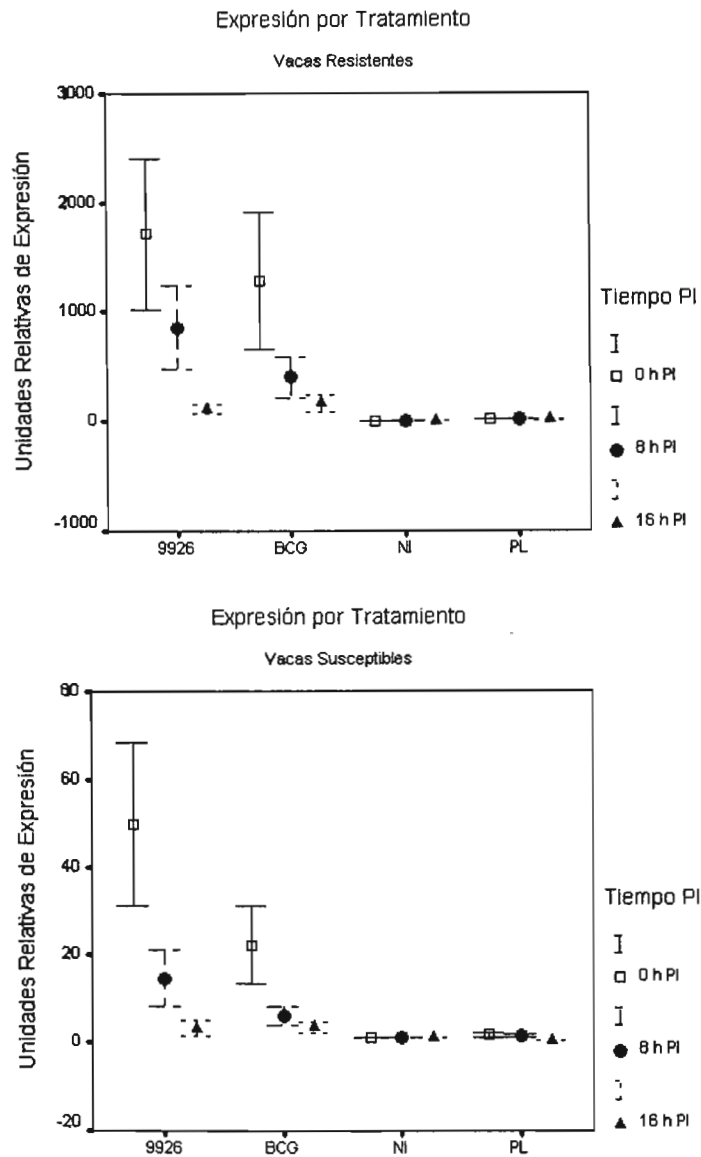


Gráfica 6. Media de expresión de ARNm de SLAM incluyendo a todas las vacas (resistentes y susceptibles) después de la infección con *M. bovis* virulenta (9926) y no virulenta (BCG) a las 0, 8 y 16 horas post-infección (PI). La infección con *M. bovis* 9926 a las 0 horas PI causa el mayor nivel de expresión de SLAM para luego descender a las 8 y 16 horas PI. NI: macrófagos no infectados, PL: macrófagos estimulados con partículas de látex. $n = 2$, $p < 0.05$.



Gráfica 7. Media de expresión de ARNm de SLAM por cada una de las vacas (R y S) después de la infección con *M. bovis* virulenta (9926) y no virulenta (BCG). A) Los macrófagos de la vaca 98 (R) muestran un nivel de expresión superior de SLAM en comparación con las otras vacas al ser infectados con *M. bovis* 9926 y BCG. B) Se suprimió la vaca 98, ya que esta al ser graficada junto con las otras vacas (A) provoca que la escala de medición del eje "Y" sea más amplia debido a su alta expresión de SLAM y no se observe a detalle el nivel de expresión de las otras vacas. De esta forma se observa que las vacas 75 (R) y 130 (R) tienen también niveles de expresión mayores de SLAM al ser infectados con 9926 y BCG en comparación con las vacas 47 (S), 99 (S) y 117 (S). NI: macrófagos no infectados, PL: macrófagos estimulados con partículas de látex. Identificación en el arete de la vaca: 47, 75, 98, 99 117 y 130. n = 2, p < 0.05.

Los resultados del presente trabajo, sugieren que SLAM pudiera estar involucrada en la capacidad del individuo para montar una mejor respuesta inmune contra *M. bovis* ya que como se observó, los animales naturalmente resistentes a parásitos intracelulares ⁴³ tuvieron una expresión relativa mayor que los bovinos susceptibles ⁴³ (Gráfica 8).



Gráfica 8. Media de expresión de ARNm de SLAM en las vacas identificadas como resistentes (arriba) y susceptibles (abajo) después de ser infectadas con *M. bovis* virulenta (9926) y no virulenta (BCG) a las 0, 8 y 16 horas post-infección (PI). Los macrófagos de vacas clasificadas como resistentes tienen una mayor expresión de SLAM en unidades relativas que los animales susceptibles. NI: macrófagos no infectados, PL: macrófagos estimulados con partículas de látex. n= 2, p < 0.05.

Esto puede estar relacionado a que una mayor expresión de SLAM en estos animales promueva una mayor producción de IL-12, TNF- α y óxido nítrico (NO) en macrófagos así como una respuesta inmune tipo Th1 y por lo tanto una mayor secreción de INF- γ ; todo esto de vital importancia para una respuesta inmune en contra de patógenos intracelulares, además la activación de SLAM puede revertir una respuesta celular Th2 hacia una Th0 o Th1 ambas con producción de INF- γ y aumentar la expansión de células T antígeno-específicas.^{26,42} En adición a estas funciones propias de SLAM, el cometido de la co-estimulación es amplificar la señal transmitida de MHC-TCR, de modo que se logre una respuesta celular con una menor cantidad de TCR activados, es decir que los animales con una mayor expresión de SLAM necesitarían una menor cantidad de TCRs, lo que los hace suponer que son más eficientes en el control del bacilo tuberculoso.

Los trabajos realizados en células mononucleares humanas con *M. tuberculosis* y *M. leprae* y su relación con SLAM,^{41,42} han demostrado que los individuos con una mejor capacidad para restringir el crecimiento y controlar la infección con micobacterias presentan una gran proliferación de células T al ser estimulados con antígenos micobacterianos, producen un fuerte patrón de citocinas característico de una respuesta Th1, tienen una baja expresión de SAP que están identificadas como sus reguladores negativos³⁵ y al igual que los bovinos clasificados como resistentes (Gráfica 5) tienen una mayor expresión de SLAM en ARNm y además como proteína. Al contrario de aquellos individuos que no son capaces de montar una respuesta inmune que pueda contener a la micobacteria (Gráfica 5). Asimismo ratones deficientes en SLAM no lograron sobrevivir a la infección de *L. major* al contrario de los ratones SLAM^{+/+}, esto asociado a sus reducidos niveles de IL-12, TNF- α y NO, factores importantes en el control de parásitos intracelulares.³³

Por otra parte también se ha demostrado que la producción de INF- γ y la activación de TCR, son los principales elementos que regulan la expresión de SLAM.^{26,27,28,30,31,32} Para que esto se lleve a cabo, se necesita la presentación de antígenos en moléculas MHC. Así podemos sugerir que en los macrófagos de origen bovino *in vitro*, la infección con bacilos de *M. bovis* vivos a una MOI de 10:1, produce una expresión diferencial de SLAM, alcanzando su valor máximo a las cero horas post-infección con la cepa 9926 virulenta y BCG de *M. bovis* (Gráfica 6) y que el motivo de que

esta expresión disminuya a las 8 y 16 horas post-infección, pudiera deberse a 1) la ausencia de un segundo estímulo dado por el linfocito T en la presentación de antígeno y su subsiguiente liberación de citocinas, ya que se ha observado que la unión SLAM-SLAM aumenta la producción de INF- γ y este a su vez regula la expresión de SLAM, en donde también están involucradas otras citocinas proinflamatorias como por ejemplo la interleucina 12 (IL-12)⁴² y/o 2) Al contacto de los macrófagos con una gran cantidad de microorganismos durante el procedimiento de la infección.

Así, nuestro estudio sugiere que la sobre expresión de SLAM en macrófagos bovinos, pudiera jugar un papel en la susceptibilidad genética a la infección y desarrollo de la tuberculosis.

Sin embargo, para asegurar que SLAM está involucrado en montar una mejor respuesta inmune contra *M. bovis*, se necesitarían realizar otros experimentos en donde se indagara la relación entre la expresión de citocinas proinflamatorias y de INF- γ con la expresión de SLAM en linfocitos T y macrófagos bajo la infección de *M. bovis* en el modelo bovino y con animales identificados como resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares. Además de medir la expresión de SLAM como proteína y observar si existe una relación con la síntesis de su RNAm. De esta manera, se podría mostrar un panorama más amplio del papel que juega SLAM en la tuberculosis bovina.

Por último es importante resaltar las ventajas que ofrece el RT-PCR en tiempo real como opción en la cuantificación de la expresión génica. El RT-PCR en tiempo real, combina la amplificación de la secuencia de ADNc con la detección de los productos amplificados durante la reacción de cada ciclo, en otras palabras en tiempo real. En comparación con el PCR convencional, la técnica es extremadamente sensible, permitiendo el análisis de la expresión génica a partir de pequeñas cantidades de ARN, teóricamente del contenido de una sola célula. También se consume menos tiempo, no requiere, forzosamente, de un análisis en gel de los productos finales y puede dar una cuantificación del producto. Por eso no es sorprendente que esta técnica, que fue descrita en 1993,⁴⁸ hoy en día tenga una creciente popularidad entre los investigadores, ya que se pueden hacer cuantificaciones de la expresión génica de una manera absoluta o relativa, calcular títulos virales y hacer análisis de polimorfismos de hasta un solo nucleótido. Sin dejar de mencionar que esta técnica es más flexible que otras que se utilizan para los mismos fines, como por ejemplo: Northern blot, dot blot, ensayo de protección de ribonucleasas e hibridación *in situ*, entre otras.

En particular, el RT-PCR en tiempo real ha llegado a ser el método de elección para cuantificación rápida de la expresión en un gen específico. Fácilmente se puede detectar un cambio tan pequeño en la expresión de un determinado gen en respuesta a diferentes tratamientos en cientos de muestras por día. Sin embargo, debido a ésta sensibilidad un pequeño error también es amplificado, resultando en una gran variabilidad de los resultados.

Debido al auge del RT-PCR en tiempo real, algunas organizaciones lanzan al mercado con mayor frecuencia, nuevos y mejorados productos para cada uno de los pasos de esta técnica: desde la preparación de la muestra, pasando por la transcripción en reversa y hasta la misma amplificación. Todo este desarrollo promete hacer el proceso mucho más rápido, eficiente, confiable y sobre todo accesible.

9.0 Referencias

1. Kaufmann SHE. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis* 2003; 83: 86-90.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. WHO Report; 2004; Document WHO/HTM/TB/2004.331. Geneva, Switzerland: *World Health Organization*, 2004.
3. Britton WJ, Roche PW, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol* 1994; 2: 284-288.
4. Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity *Mol Microbiol* 1998, 28: 413-420.
5. Grange JM, and Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microb* 1994; 40: 137-151.
6. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle MB. Control of *Mycobacterium bovis* infections and risk to human populations. *Microb Infect* 2002; 4: 471-480.
7. Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* 2001; 81: 71-77.
8. Danker WM, and Davis CE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of Tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics* 2000; 105: 79-83.
9. García HLA, Valdés AA, González LA, Martell AC. La globalización productiva y comercial de la leche y sus derivados. Articulación de la ganadería intensiva lechera de la Comarca Lagunera. 1ª ed. México: Plaza y Valdés, 2005.
10. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). 3-Agosto-1996.
11. Brosch R, Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson GC, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 3684-3689.

12. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 40: 41-52.
13. Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2001; 81: 103-107.
14. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178: 2249-2254.
15. Aldwell FE, Wedlock DN, Slobbe LJ, Griffin JFT, Buddle BM, Buchan GS. *In vitro* control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. *Tuberculosis* 2001; 81: 115-123.
16. Rhoades, E. R. and Ullrich H. J. How to establish a lasting relationship with your host: Lessons learned from *Mycobacterium spp.* *Immunol Cell Bio* 2000; 78: 301-310.
17. Liébana E, Aranaz A, Welsh M, Neill D, Pollock JM. *In vitro* T-cell activation of monocyte-derived macrophages by soluble messenger or cell-to-cell contact in bovine tuberculosis. *Immun* 2000; 100: 194-202.
18. Bogdan C. Macrophages. *Encyclopedia of Life Sciences-Nature Publishing Group*. 2001.
19. Lewis CE, McGee JOD. The Natural Immune System: The Macrophage. *IRL Press Oxford Univ Press, New York*: 1992: 3-6, 16-19.
20. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. et. al. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis* 2003; 83: 98-106.
21. Flynn J. L. Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium Tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 1-6.
22. Klingler K, Tchou-Wong K, Brändli O, Aston C, Kim R, Chin C, Rom WN. Effects of *Mycobacteria* on Regulation of Apoptosis in Mononuclear Phagocytes. *Infect Immun* 1997; 65: 5272-5278.
23. Caruso MA, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of INF- γ , yet succumb to Tuberculosis. *J Immunol* 1999; 162: 5407-5416.

24. Tau G, and Rothman P. Biologic functions of the INF- γ receptors. *Allergy* 1999; 54: 233-1251.
25. Fenton JM, and Vermeulen WM. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996; 64: 683-690.
26. Cocks BG, Chang CS, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T cell activation. *Nature* 1995; 376: 260-263.
27. Castro GA, Hauser TM, Cocks BG, Abrams J, Zurawski S, Churakova T, Zonin F, Robinson D, Tangye SG, Aversa G, Nichols KE, de Vries JE, Lanier LL, O'Garra A. Molecular and Functional Characterization of Mouse Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM): Differential Expression and Responsive in Th1 and Th2 Cells. *J Immunol* 1999; 163: 5860-5870.
28. Hamalainen H, Meissner S, Lahesmaa R. Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods* 2000; 242: 9-19
29. Veillette A, and Latour S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 277-285.
30. Bleharski, J. R. et al. Signaling Lymphocytic Activation Molecule is Expressed on CD40 Ligand-Activated Dendritic Cells and Directly Augments Production of Inflammatory Cytokines. *J Immunol*. 2001, 167: 3174-3118.
31. Kruse M, Meini E, Henning G, Kuhnt C, Berchtold S, Berger T, Schulder G, Steinkasserer A. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Is Expressed on Mature CD83⁺ Dendritic Cells and is Up-Regulated by IL-1 β . *J Immunol* 2001; 167: 1989-1995.
32. Henning G, Kraft SM, Derfuss T, Pirzer R, de Saint-Basile G, Aversa G, Fleckenstein B, Meini E. Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2741-2750.
33. Wang N, Satoska A, Faubion W, Howie D, Okamoto S, Feske S, Gullo C, Clarke K, Sosa MR, Sharpe AH, Terhorst C. The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophages functions. *J Exp Med* 2004; 199: 1255-1264.

34. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbillivirus use Signaling Lymphocyte Activation Molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 2001; 75: 5342-5850
35. Latour S, and Veillette A. Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 2003; 192: 212-224.
36. Howie D, Okamoto S, Rietdijk S, Clarke K, Wang N, Gullo C, Bruggeman JP, Manning S, Coyle AJ, Greenfield E, Kuchroo V, Terhorst C. The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon γ production. *Blood* 2002; 100: 2899-2907.
37. Veillette A, and Latour S. The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin Immunol* 2004; 16: 409-419.
38. Morra M, Lu J, Poy F, Martin M, Sayos J, Calpe S, Gullo C, Howie D, Rietdijk S, Thompson A, Coyle AJ, Denny C, Yaffe MB, Engel P, Eck MJ, Terhorst C. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J* 2001; 20: 5840-5852.
39. Howie D, Simarro M, Sayos J, Guirado M, Sancho J, Terhorst C. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* 2002; 99: 957-965.
40. Gutierrez-Pabello JA. Apoptosis and gene differential expression of *Mycobacterium bovis*-infected bovine macrophages. PhD Thesis. Texas A&M University College of Veterinary Medicine. U. S. A. Texas 1999.
41. Pasquinelli V, Quiroga MT, Martinez GJ Zorrilla LC, Musilla RM, Bracco MM, Belmonte L, Malbrán A, Fainboim L, Sieling PA, García VE. Expression of signal lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts INF- γ production in human Tuberculosis. *J Immunol* 2004; 172: 1177-1185.
42. García VE, Quiroga MF, Ochoa MT, Ochoa L, Pasquinelli V, Fainboim L, Olivares LM, Valdez R, Sordelli DO, Aversa G, Modlin RL, Sieling PA. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J Immunol* 2001; 167: 5719-5724.

43. Vallecillo MAJ. Crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares y su asociación al polimorfismo de la 3' UTR del Nramp1. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México (Distrito Federal) México: *Universidad Nacional Autónoma de México*, 2003.
44. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Información de la Dirección General de Inspección Fitozoosanitaria Internacional en Aeropuertos y Fronteras. México: SENASICA-SAGARPA, 2005.
45. Benitez-Guzman A. Supervivencia intracelular de cepas de *Mycobacterium bovis* aisladas de lesiones tuberculosas en macrófagos de bovino. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México (Distrito Federal) México: *Universidad Nacional Autónoma de México*, 2004.
46. Gutiérrez-Pabello JA, McMurray DN, Adams LG. Upregulation of thymosin β -10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infect Immun* 2002; 70: 2121-2127.
47. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193.
48. Ginzinger GD. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Expe Hematol* 2002; 30: 503-512.
49. Applied Biosystems. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Relative quantification of gene expression. Applied Biosystems. 2001; User Bulletin #2.
50. Livak KJ, and Schmittgen TM. Analysis of relative gene expression using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
51. Pollock JM, and Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and Tuberculosis in cattle. *J Vet* 2002; 163: 115-127.
52. Pollock JM, Pollock DA, Campell DG, Girvin RM, Crockard AD, Meill SD, Mackie DP. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 1996; 87: 236-241.

53. Leutenegger CM, Mislin SM, Sigriths B, Ehrenguber MU, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Vet. Immunol Immunopathol* 1999; 71: 291-305.
54. Roche. Roche Molecular Biochemicals. Optimization of reactions to reduce formation of primers dimers. Roche. Technical note LC 1/99
55. Bloom BR, editor. Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. 1^a ed. Washington, DC: 1994.

10.0 Anexos

10.1 Análisis estadístico

10.1.1 Datos

Experimento Multifactorial	
Factores	Niveles (Número)
Genotipo	Resistentes, Susceptibles (2)
Infección	No infectados, Partículas de láte, <i>M. bovis</i> BCG, <i>M. bovis</i> 9926 (4)
Tiempo de infección	0, 8 y 16 horas (3)
Repeticiones	(2)

Genotipo	Factores		Repeticiones		Total por tratamiento
	Infección	Tiempo (h)	I	II	
Resistentes	No infectados	0	1.00	1.00	2.00
		8	1.00	1.00	2.00
		16	1.00	1.00	2.00
	Partículas de látex	0	6.88	8.35	15.23
		8	5.76	9.92	15.68
		16	2.31	7.09	9.40
	<i>M. bovis</i> BCG	0	182.46	2382.28	2564.74
		8	87.19	712.33	799.53
		16	47.71	278.23	325.94
	<i>M. bovis</i> 9926	0	667.88	2771.87	3439.74
		8	240.75	1473.56	1714.31
		16	51.67	159.91	211.58
Susceptibles	No infectados	0	1.00	1.00	2.00
		8	1.00	1.00	2.00
		16	1.00	1.00	2.00
	Partículas de látex	0	0.30	3.07	3.36
		8	0.28	2.34	2.62
		16	0.37	0.31	0.68
	<i>M. bovis</i> BCG	0	5.27	39.11	44.38
		8	1.24	10.55	11.79
		16	0.74	6.07	6.81
	<i>M. bovis</i> 9926	0	12.15	87.36	99.51
		8	1.22	27.68	28.90
		16	0.27	5.94	6.20
Total por repetición			1320.45	7991.96	
Total					9312.41

10.1.2 Análisis de varianza

1. $FC = (\sum X_{ijkn})^2 / abc n$
2. $SC_{total} = \sum X_{ijkn}^2 - FC$
3. $SC_{bloques} = (\sum X_{...1}^2 / abc) - FC$
4. $SC_{tratamientos} = (\sum X_{ijk.}^2 / n) - FC$
5. $SC_{error} = SC_{total} - (SC_{tratamiento} + C_{bloques})$
6. $SC_{genotipo} = (\sum X_{i..}^2 / bc n) - FC$
7. $SC_{infección} = (\sum X_{.j.}^2 / ac n) - FC$
8. $SC_{tiempo} = (\sum X_{..k}^2 / ab n) - FC$
9. $SC_{genotipo \times infección} = ((\sum X_{ij.}^2 / cn) - FC) - (SC_{genotipo} + SC_{infección})$
10. $SC_{genotipo \times tiempo} = ((\sum X_{i.k}^2 / bn) - FC) - (SC_{genotipo} + SC_{tiempo})$
11. $SC_{infección \times tiempo} = ((\sum X_{.jk}^2 / an) - FC) - (SC_{infección} + SC_{tiempo})$
12. $SC_{genotipo \times infección \times tiempo} = SC_{tratamientos} - (SC_{genotipo} + SC_{infección} + SC_{tiempo} + SC_{genotipo \times infección} + SC_{genotipo \times tiempo} + SC_{infección \times tiempo})$

Causa de Variación	GL	SC	CM	F	F (0.05)	F (0.01)
Bloques	(n-1) = 1	927271.28	927271.28	3.28	4.28	7.88
Tratamientos	(abc-1) = 23	9269493.83	403021.47	1.43	2.00	2.70
Genotipo	(a-1) = 1	1647200.13	1647200.13	*5.83	4.28	7.88
Infección	(b-1) = 3	9278594.73	3092864.91	**10.95	2.80	4.26
Tiempo	(c-1) = 2	13206598.91	6603299.46	**23.38	3.42	5.66
Genotipo X Infección	(a-1)(b-1) = 3	7631659.60	2543886.53	**9.01	3.03	4.76
Genotipo X Tiempo	(a-1)(c-1) = 2	5911617.18	2955808.59	**10.47	3.42	5.66
Infección X Tiempo	(b-1)(c-1) = 6	18494429.72	3082404.95	**10.92	2.53	3.71
Genotipo X Infección X Tiempo	(a-1)(b-1)(c-1) = 6	17174806.56	2862467.76	**10.14	2.53	3.71
Error	(n-1)(abc-1) = 23	6494659.01	282376.48			
Total	(abcn-1) = 47	16691424.12				

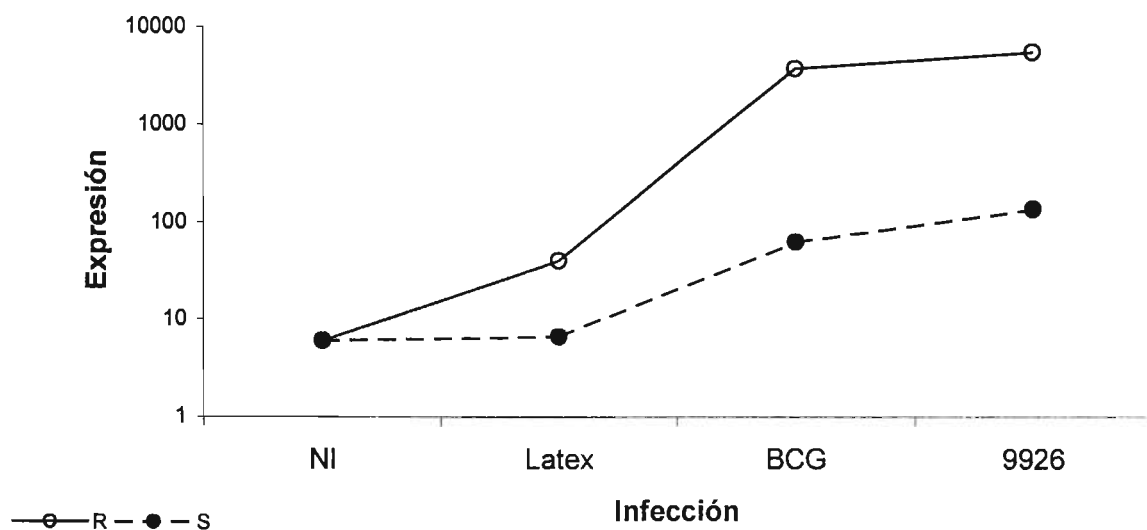
* Diferencia estadísticamente significativa.

** Diferencia estadística altamente significativa

10.1.3 Análisis de la interacción entre los factores

10.1.3.1 Interacción: Genotipo-Infección

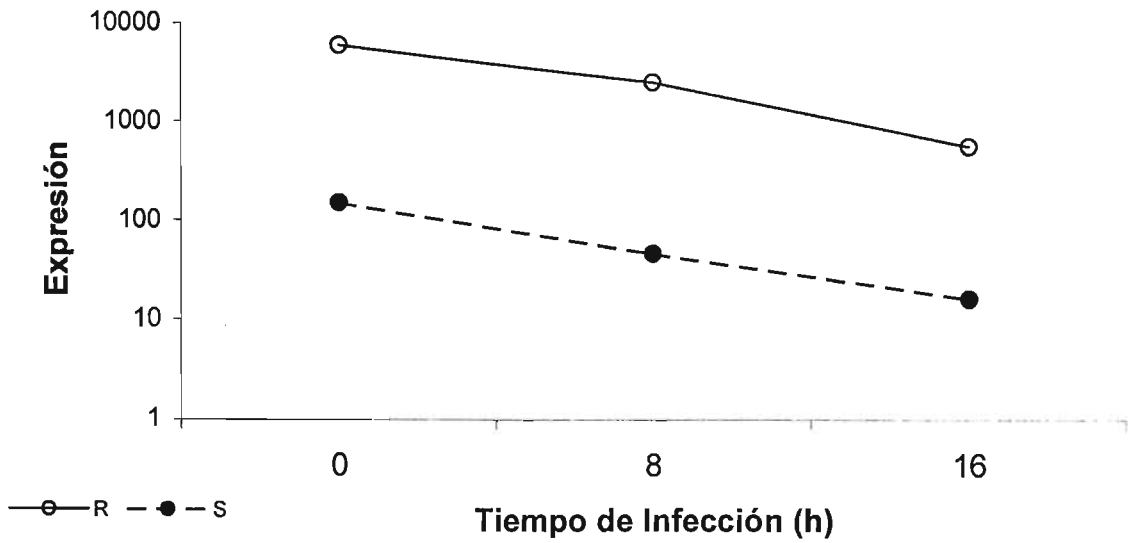
Genotipo	Infección				Total
	No infectados	Partículas de látex	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> 9926	
Resistentes	6.00	40.31	3690.21	5365.63	9102.15
Susceptibles	6.00	6.67	62.98	134.62	210.26
Total	12.00	46.98	3753.18	5500.25	9312.41



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

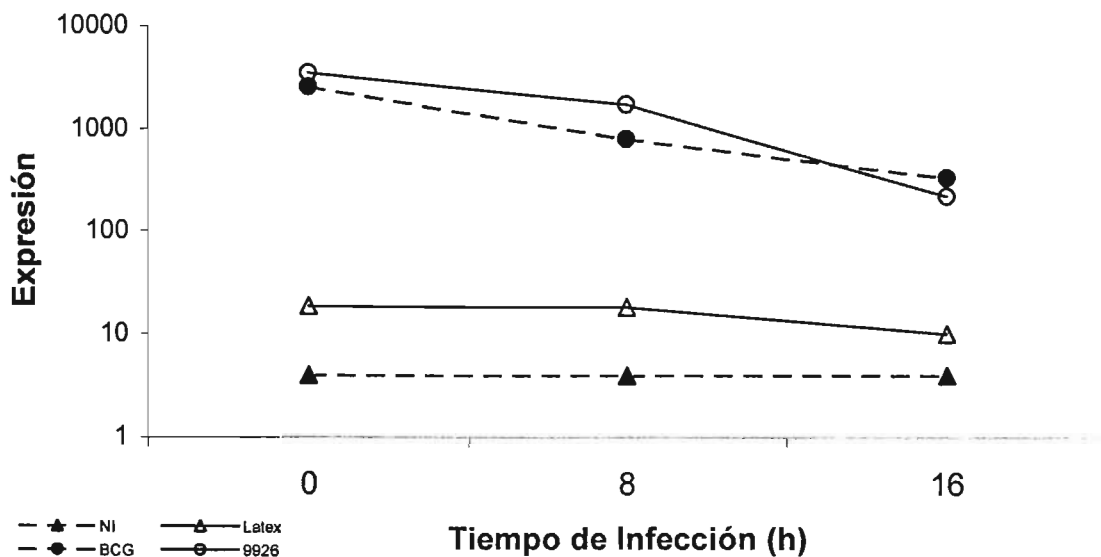
10.1.3.2 Interacción: Genotipo-Tiempo de infección

Genotipo	Tiempo de infección (h)			Total
	0	8	16	
Resistentes	6021.71	2531.51	548.92	9102.15
Susceptibles	149.25	45.31	15.70	210.26
Total	6021.71	2531.51	548.92	9102.15



10.1.3.3 Interacción: Infección-Tiempo de infección

Infección	Tiempo de infección (h)			Total
	0	8	16	
No infectados	4.00	4.00	4.00	12.00
Partículas de látex	18.59	18.30	10.09	46.98
<i>M. bovis</i> BCG	2609.12	811.32	332.75	3753.18
<i>M. bovis</i> 9926	3539.25	1743.21	217.78	5500.25
Total	6170.96	2576.82	564.62	9312.41



10.1.4 Cálculo de Prueba de Tukey (Comparaciones múltiples)

Para Genotipo:

$$\Delta = q_{\alpha} (a ; GL_{error}) \sqrt{CM_{error}/bcn}$$

Para Infección:

$$\Delta = q_{\alpha} (b ; GL_{error}) \sqrt{CM_{error}/acn}$$

Para Tiempo:

$$\Delta = q_{\alpha} (c ; GL_{error}) \sqrt{CM_{error}/abn}$$

Para interacción Genotipo X Infección:

$$\Delta = q_{\alpha} (ab ; GL_{error}) \sqrt{CM_{error}/cn}$$

Para interacción Genotipo X Tiempo:

$$\Delta = q_{\alpha} (ac ; GL_{error}) \sqrt{CM_{error}/bn}$$

Para interacción Infección X Tiempo:

$$\Delta = q_{\alpha} (bc ; GL_{error}) \sqrt{CM_{error}/an}$$

Para Tratamiento:

$$\Delta = q_{\alpha} (abc ; GL_{error}) \sqrt{CM_{error}/n}$$

Valores Estimados							
	Genotipo	Infección	Tiempo	Genotipo X Infección	Genotipo X Tiempo	Infección X Tiempo	Tratamientos
α	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
0.05	1892.80	1469.57	1551.69	1542.44	1476.66	1703.44	2164.32
0.01	4204.29	2290.26	2727.41	2021.88	2044.66	2114.97	2551.34

Genotipo		
	Resistentes	Susceptibles
Susceptibles	370.50	
Resistentes		

* $\alpha = 0.05$ $\Delta = 1892.80$

** $\alpha = 0.01$ $\Delta = 4204.29$

Infección				
	No infectados	Perlas de latex	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> 9926
<i>M. bovis</i> 9926	45.76	42.84	266.01	
<i>M. bovis</i> BCG	311.77	308.85		
Perlas de latex	2.92			
No infectados				

* $\alpha = 0.05$ $\Delta = 1469.57$

** $\alpha = 0.01$ $\Delta = 2290.26$

Tiempo			
	0 h	8 h	16 h
16 h	350.40	125.76	
8 h	224.64		
0 h			

* $\alpha = 0.05$ $\Delta = 1551.69$

** $\alpha = 0.01$ $\Delta = 2727.41$

Interacción Genotipo X Infección									
		Resistentes				Susceptibles			
		NI	Lx	BCG	9926	NI	Lx	BCG	9926
Susceptibles	9926	21.44	15.72	592.60	871.84	21.44	21.32	11.94	
	BCG	9.50	3.78	604.54	883.78	9.50	9.38		
	Lx	0.11	5.61	613.92	893.16	0.11			
	NI	0.00	5.72	614.03	893.27				
Resistentes	9926	893.27	887.55	279.24					
	BCG	614.03	607.32						
	Lx	5.72							
	NI								

* $\alpha = 0.05$ $\Delta = 1542.44$

** $\alpha = 0.01$ $\Delta = 2021.88$

Interacción Genotipo X Tiempo							
		Resistentes			Susceptibles		
		0 h	8 h	16 h	0 h	8 h	16 h
Susceptibles	16 h	750.75	314.48	66.65	16.69	3.70	
	8 h	747.05	310.78	62.95	12.99		
	0 h	734.06	297.78	49.96			
Resistentes	16 h	684.10	247.82				
	8 h	436.27					
	0 h						

* $\alpha = 0.05$ $\Delta = 1476.66$

** $\alpha = 0.01$ $\Delta = 2044.66$

Interacción Infección X Tiempo													
		NI			Lx			BCG			9926		
		0 h	8 h	16 h	0 h	8 h	16 h	0 h	8 h	16 h	0 h	8 h	16 h
9926	16 h	53.45	53.45	53.45	49.80	49.87	51.92	597.83	148.38	28.74	830.37	381.36	
	8 h	434.80	434.80	434.80	431.15	431.23	433.28	216.48	232.97	352.61	449.01		
	0 h	883.81	883.81	883.81	880.17	880.24	882.29	232.53	681.98	801.63			
BCG	16 h	82.19	82.19	82.19	78.54	78.61	80.67	569.09	119.64				
	8 h	201.83	201.83	201.83	198.18	198.25	200.31	449.45					
	0 h	651.28	651.28	651.28	647.63	647.70	649.76						
Lx	16 h	1.52	1.52	1.52	2.13	2.05							
	8 h	3.57	3.57	3.57	0.07								
	0 h	3.65	3.65	3.65									
NI	16 h	0.00	0.00										
	8 h	0.00											
	0 h												

* $\alpha = 0.05$ $\Delta = 1703.44$

** $\alpha = 0.01$ $\Delta = 2114.97$

7. Para Tratamiento:

No se demostró diferencia estadística en el análisis del experimento multifactorial.