



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“FORMACIÓN DE UN BANCO DE MUESTRAS A PARTIR DE 24 ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN DESAFIADOS CON UNA CEPA PATÓGENA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* Y ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT PARA LA SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE *M BOVIS*”

INFORME DE SERVICIO SOCIAL-TITULACIÓN

Que para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:

Edgar David Avilés Ríos

Asesores:

MVZ Rafael Pérez González
DR. Fernando Osnaya Gallardo

Coasesores:

DRA Camila Arriaga Díaz
DRA Ana Laura Pereira Suárez
DR. Ciro Estrada Chávez



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 Ustedes, que me han apoyado desde mi inicio:

SUSANA y RAÚL.

A Ustedes que me han acompañado desde que éramos niños:

RAÚL y CARLO.

A Todos aquellos que me vieron crecer, y no obstaculizaron mi futuro:

Familias: AVILÉS y RÍOS.

A Esos que me hicieron su hermano:

DANIEL, VICTOR, ALFREDO Y LAZARO.

A TI: Mi Coneja.

que le diste un sentido a mi vida, me enseñaste a reír y llorar, a amar y odiar.

A mis padrinos, Paty y Carlos por enseñarme la vida.

A todos aquellos que con o sin interés me ayudaron moral, física y económicamente.
A todos aquellos que alguna vez dijeron “Hola” y “Adiós”, que preguntaron “¿cómo estás?”
y ¿en qué te ayudó?

A valentina.

EN MEMORIA DE MIS DOS AMIGOS:

(Al final todos estaremos juntos)

YUNUEN † y RICARDO †

Este trabajo se realizó en el CENID-Microbiología, INIFAP “Palo Alto” con una beca del proyecto CONACYT G34799-B, en el periodo comprendido de Abril 2004 a Marzo 2005.

AGRADECIMIENTOS

Mi mas sincero agradecimiento a todas las instituciones que me apoyaron en la realización de este Servicio Social.

Laboratorio de Inmunología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-Microbiología), INIFAP

CICYTA, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

A todo el personal que labora en estas instituciones y que directa e indirectamente me ayudaron.

Al MVZ Dante González por su amistad y ayuda.

Al DR. Fernando Díaz Otero, por la donación del material biológico.

INDICE

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

No.	DESCRIPCIÓN	Pág.
1.	Introducción.	i
2.	Objetivos.	ii
3.	Metodología.	ii
4.	Material y Método.	iv
5.	Equipo de relevancia.	vi
6.	Discusión.	viii
7.	Bibliografía.	viii

TESINA

No.	DESCRIPCIÓN	Pág.
8.	Introducción.	1
9.	Agente Etiológico de la Tuberculosis Bovina.	2
10.	Constituyentes Micobacterianos.	2
11.	Superficie de la Micobacteria.	3
12.	Antígenos de Mayor Importancia de <i>Mycobacterium bovis</i> .	3
13.	Epidemiología.	5
14.	Diagnóstico.	5
15.	Inmunidad Contra la Tuberculosis Bovina.	7
16.	Patogénesis de la Tuberculosis Bovina	11

Técnicas Para Electroforesis y Transferencia de Proteínas

17.	Electroforesis en Gel.	13
18.	Transferencia de Proteínas.	14

19.	Objetivos	16
-----	-----------	----

Material y métodos

20.	Obtención del EPFC de <i>Mycobacterium bovis</i> .	17
21.	Cuantificación de Proteínas (Método Bradford).	17
22.	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).	18
23.	Western blot.	20
24.	Obtención y Procesamiento de Muestras.	21

25.	Resultados.	23
26.	Discusión.	28
27.	Conclusión	29
28.	Bibliografía.	30

Reporte de Servicio Social Titulación

1. INTRODUCCION

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad infectocontagiosa del ganado bovino y otros animales domésticos y de vida libre, de curso crónico, que se caracteriza por inducir una inflamación granulomatosa (Ettinger y Feldman, 1995). *Mycobacterium bovis*, agente causal de la TB bovina, es un bacilo clasificado como gram positivo, y bacilo ácido-alcohol resistente, no esporula y es inmóvil. (Quin P.J. 2002)

La TB causa gran preocupación en países en vías de desarrollo, como México, por su impacto negativo en la economía y sus efectos en los seres humanos. Para el control de la TB bovina, la mayoría de los programas se basan en las pruebas de tuberculina para la detección de ganado infectado, el cual será sacrificado posteriormente. Sin embargo, la prueba de tuberculina no es enteramente confiable. Resultados falso-positivos y negativos aparecen con frecuencia (Estrada, Pereira y col. 2001).

Se ha intentado el diagnóstico de la TB bovina por medio de técnicas serológicas como hemoaglutinación, fijación del complemento e inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Estudios realizados con ELISA usando derivado proteico purificado (PPD) bovino arrojaron índices de sensibilidad realmente bajos (Estrada y Díaz, 2002).

La TB es la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso en entre la población adulta, a nivel mundial. Aunque *Mycobacterium tuberculosis* es el agente principal de la TB en humanos, una proporción desconocida de casos se atribuyen a *Mycobacterium bovis*.

En los países desarrollados, el control de la TB en animales y los programas de eliminación, en conjunto con la pasteurización de la leche, han reducido drásticamente la incidencia de *M. bovis* en el ganado y en el hombre.

La micobacteria es la bacteria oportunista por excelencia en personas infectadas con el virus del VIH. La epidemia de VIH en países en vías de desarrollo, particularmente en países donde la infección por *M. bovis* está presente y las condiciones son favorables, hace que la transmisión zoonótica pueda representar un riesgo de salud pública (Cocivi., 1998).

La respuesta inmune mediada por células predomina en fases tempranas de la enfermedad, los pacientes y animales infectados desarrollan una respuesta de Interferón gamma ($IFN\gamma$) a *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Serbina y col., 2001), mientras que la respuesta humoral, generalmente, se da en etapas posteriores. Por esto la prueba de tuberculina tiene una mejor sensibilidad en animales que están en etapas iniciales de la enfermedad.

Ha sido ampliamente comprobado que la inmunidad contra infecciones micobacterianas depende de una interacción entre células T y macrófagos (Serbina and Flynn, 2001; Vordermeier y col., 2001). En enfermedades de tipo crónico, como las causadas por micobacterias, las células T CD4+ juegan un importante papel en la respuesta inmune y se sabe que existen al menos dos subtipos, donde la subpoblación Th1, característica en una infección por *M. bovis*, secreta Interleucina 2 (IL-2) e induce la liberación de $IFN\gamma$ por células asesinas naturales (NK) y linfocitos T, y participa en la respuesta de hipersensibilidad retardada.

La activación de macrófagos permite la contención y eliminación del agente intracelular, y el $IFN\gamma$ induce una mayor activación, así como la presentación de

antígenos, y regula la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). En contraste, La respuesta Th2 se asocia con fases crónicas de la enfermedad. Las interleucinas secretadas en esta etapa estimulan la respuesta humoral suprimiendo la actividad inmunomediada por células (Hernández-Pando y col., 1996).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Social

Contribuir con los estudios relacionados al conocimiento y comprensión de la respuesta inmune presentada en la enfermedad de la tuberculosis bovina, dirigida al control y erradicación de esta enfermedad en nuestro país.

2.2 Objetivo Académico

Encontrar en el área de la investigación, un campo alternativo de acción para el Médico Veterinario Zootecnista. Adquirir nuevos conocimientos para aplicarlos en la investigación; en particular en el área de inmunología.

2.3 Objetivos Particulares

- Aprender el manejo de un laboratorio de investigación.
- Capacitación en el manejo del equipo de apoyo y especializado del laboratorio.
- Capacitación en los métodos de análisis de proteínas: cuantificación de la concentración de proteínas (método Bradford) electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot.

3. METODOLOGIA

Abril 2004

Inicio del servicio social en el CENID-Microbiología, en el laboratorio de inmunología. INIFAP, Palo Alto.

3.1 Introducción a las actividades básicas del laboratorio.

Las primeras actividades realizadas fueron trabajos básicos de laboratorio.

Inactivación y limpieza de diferente material de cristalería; vasos de precipitado, matraces de todo tipo y tamaño, pipetas de distintas capacidades, probetas, buretas, embudos y frascos autoclavables entre otros. Artículos de polietileno; tapas de frascos, contenedores de tamaños varios, pizetas; material de policarbonato como tubos Eppendorf y tubos Falcon.

Todo el material dentro de este laboratorio fue destinado para su uso con bacterias y virus potencialmente patógenos. De ahí la gran importancia de que fuera inactivado y lavado correctamente mediante su inmersión en jabones ácidos y alcalinos como el Dextran. La esterilización de todo el material (aquel apto para estos tratamientos) por calor húmedo y seco cumple con el objetivo.

Capacitación en el uso del equipo básico (usado en la elaboración de soluciones y reactivos) como; potenciómetros, Básculas, bomba de vacío, sistemas de filtración, cámara de extracción de aire forzado, pipetas y micropipetas semiautomáticas (Eppendorf), microcentrífuga, picofuga, vortex, platina rotatoria, balanza analítica, espectrofotómetro y fuente de poder.

Capacitación en la elaboración de soluciones y reactivos. Diluciones porcentuales, molares y normales a diferentes volúmenes.

Manejo de reactivos tóxicos, corrosivos y oncogénicos

Mayo, 2004

Laboratorio de Inmunología y diagnóstico del CENID-Microbiología, INIFAP Palo Alto

3.2 Capacitación en técnicas especiales.

3.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS). (SDS-PAGE). El corrimiento por electroforesis, busca separar diferentes elementos contenidos en una misma solución por medio de cargas eléctricas y tamaño de la molécula. Las moléculas de las muestras son cubiertas por un detergente que les confiere una carga neta negativa por lo cual, las moléculas avanzaran del polo negativo hacia el positivo. El tamaño de la molécula, influido por la porosidad del gel, permitirá que las partículas más pequeñas viajen más rápido y más lejos a lo largo del gel, separándose por tamaño.

3.2.2 Western blot. Esta técnica consiste en transferir las proteínas separadas por electroforesis sobre un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una matriz inerte en un campo eléctrico. La transferencia se lleva a cabo en un “sándwich” de papel filtro, fibra sintética y un cartucho de prensa; donde la matriz inerte, en este caso una membrana de PVDF, y el

gel quedan cara a cara para que se realice la transferencia. Por ultimo, la membrana se deja bloqueando para inactivar la membrana que no fue ocupada por la proteína.

3.2.3 Cuantificación de proteínas. Método Bradford. Se usó un kit comercial (BCA protein assay kit, PIERCE-PERBIO). Todo el proceso se realiza en una microplaca de 96 pozos, en la cual se colocan diluciones de la proteína y se agrega el reactivo de Bradford. Posteriormente se realiza la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 a 630 nm. Los valores de densidad óptica obtenidos de la muestra problema se comparan con los obtenidos de concentraciones conocidas de una curva de proteína patrón (albúmina sérica bovina).

3.2.4 Tinción del gel de poliacrilamida. Para evidenciar el recorrido de las moléculas sobre el gel se usan tinciones específicas. La tinción más usada es el azul de coomassie. Se introduce el gel resultante de la electroforesis en una solución con azul de coomassie, este se tiñe por completo, el gel se destiñe con una solución de ácido acético y etanol por unos minutos, evidenciando las proteínas y su recorrido.

3.3 Capacitación en el uso de equipo especializado como centrifugas en frío, termocicladores, cámaras de luz ultravioleta, destilador y desionizador de agua debe ser un proceso cuidadoso. Consistente en ejercicios prácticos en su mayoría, con la supervisión de personal especializado. Al ser aparatos de alta precisión y costo extremadamente elevado (por ejemplo: termociclador , valor aproximado \$ 200,000.⁰⁰) la manipulación debe ser meticulosa y de ninguna manera uno se debe desviar de las disposiciones estrictas del personal instructor hasta tener la capacidad y conocimiento necesario de los instrumentos que vamos a utilizar, ya que alguna modificación en la configuración del dispositivo puede llevar a problemas, o peor, a perjuicios en el *software* e incluso daños físicos que solo podrán ser reparados por especialistas externos, lo que implicaría una pérdida económica y de tiempo para el laboratorio y la investigación.

Febrero, 2005.

Estancia en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en Tulancingo, Hidalgo.

Realización de la técnica de SDS-PAGE y Western blot utilizando sueros de animales infectados experimentalmente con *M. bovis*.

Asesoría en el desarrollo y aplicación la metodología aprendida.

Las visitas a la Universidad Autónoma de Hidalgo fueron intermitentes. Se visitaba una semana de lunes a viernes y la siguiente se laboraba en el instituto.

En total se realizaron cuatro visitas.

Abril, 2005

Término del servicio social

AL término del periodo del servicio social, la estancia en el laboratorio llegó a su fin. Se hizo un inventario del material, reactivos y equipo puesto a mi cargo y previa aprobación de la Dra. Camila Arriaga Díaz, titular del proyecto, se entregaron las instalaciones que fueron proporcionadas para su uso durante este servicio.

4. MATERIAL Y METODOS.

Reactivos. Estas tienen que ser exactas en cuanto a sus características fisicoquímicas. Todos los reactivos deben ser elaborados con agua destilada o desionizada.

4.1 SDS-PAGE y Western blot.

4.1.1 TBS 10X*

TRIS	12.1 gr
NaCl	87.6 gr
Agua destilada	1 lt

4.1.2 BUFFER PH 8.8*

TRIS	6.0gr
SDS	0.4gr
Agua destilada	100ml

Ajustar el pH a 8.8 con ayuda de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico.

4.1.3 BUFFER PH 6.8*

TRIS	6.0gr
SDS	4.0gr
Agua destilada	100ml

Ajustar el pH a 6.8 con ayuda de hidróxido de sodio t ácido clorhídrico.

4.1.4 BUFFER DE CORRIDA 10X (sol. stock)*

Glicina	144.8gr
TRIS	30gr
SDS	10gr
Agua destilada	100ml

Al momento de realizar la electroforesis se diluye el buffer con agua destilada en una proporción de agua-buffer 10:1 (1X).

4.1.5 AZUL DE COMASSIE**

Metanol	100ml
Ácido acético	20ml
Azul de comassie	0.1gr
Agua destilada	100ml

4.1.6 DESTENIDOR DE GEL**

Etanol	5%
Metanol	7%

4.1.7 SOLUCIÓN DE ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA (30%/0.8%)*

Acrilamida	30gr
Bis-acrilamida	0.8gr
Agua destilada	100 ml

4.1.8 SDS 10%**

Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) 5 gr
 Agua destilada 50 ml

4.1.9 APS 10%

Persulfato de amonio 100 mg
 Agua destilada 1 ml
 (preparar 10 ml y alicuotar)
 Almacenar a -20° C hasta por
 2 meses

4.1.10 BUFFER DE CARGA 4X (para 100 ml)**

TRIS 3 gr
 Glicerol 40 ml
 SDS 8 gr
 Azul de bromofenol 0.2 gr

El TRIS se diluye en 10 ml de agua ajustar a pH 6.8. Adicionar el SDS y después el glicerol. Al último el azul de bromofenol. Antes de usarlo tomar 900 μ l de este buffer y agregar 100 μ l de β -mercaptoetanol.
 Almacenar protegido de la luz directa.

4.1.11 ETANOL 70%**

Etanol 70 ml
 Agua destilada 30 ml

4.1.12 BUFFER DE TRANSFERENCIA**

(Fresco para cada ensayo)

TRIS 3gr
 Glicina 144.48 gr
 Aforar c/ agua destilada 800ml
 Metanol 200ml

4.1.13 SOLUCIÓN DE BLOQUEO

BSA 1gr
 Leche en polvo descremada 5gr
 TBS 1X 100ml
 Nuevo cada vez.

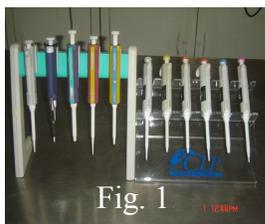
4.1.14 SOLUCIÓN “A” PARA DILUIR ANTICUERPOS Y SUEROS PROBLEMA.

BSA 1gr
 Leche en polvo descremada 1gr
 TBS 1X 100ml

* Almacenar a 4° C.

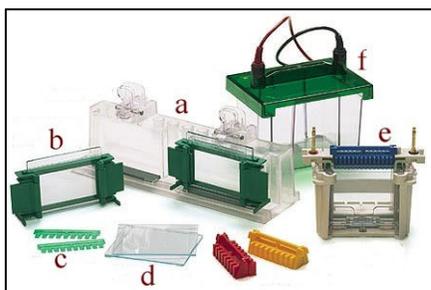
** Almacenar a temperatura ambiente

5 EQUIPO DE RELEVANCIA.



(Fig. 1) Micro pipetas (Finnepipette, Eppendorf). Útiles para medir volúmenes. pequeños, son muy precisas.

(Fig. 2) Potenciómetro (Pínchale 540, Corning)(der.) este equipo que permite la determinación precisa del pH de las soluciones.



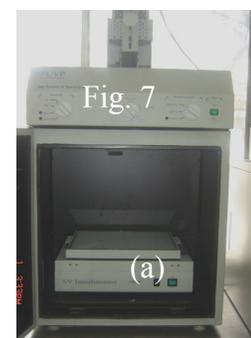
Equipo de Electroforesis en Gel (Mini Protean 3 cell, Bio-Rad). (a) Stand para el armado del gel. (b) prensa para el moldeado del gel.. (c) Peines de plástico. (d) placas de cristal con espaciadores. (e) cartucho de corrida. (f) Cámara de corrida. Equipo básico para realizar la separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.



Equipo para la transferencia de proteínas a matrices inertes (mini- transblot cell, Bio-Rad). (a) Cartucho de transferencia. (b) molde refrigerante. (c) Fibra y papel filtro. (d) Prensa de armado para el sándwich. (e) Cámara de corrida. Es un componente del Mini-PROTEAN 3, El Mini Transblot cell acomoda dos prensas para la transferencia, que se realiza en la misma cámara de corrida.



(Fig. 6). Fotodocumentador (Epicchemi II Darkroom, UVP. Biolenaging Systems) Cámara digital unida a una computadora. (Fig. 7) La recamara (B) cuenta con una lámpara de luz ultravioleta que hace posible la luminiscencia de ciertos reactivos como el bromuro de etidio. Para fotografiar corridas de proteínas se usa una pantalla (a) que convierte la luz ultravioleta en luz blanca.



El *software* del equipo incluye un editor para retocar las fotografías y mejorar la presentación. (Fig. 6) De izquierda a derecha: fotodocumentador, CPU y monitor.



Centrífugas en frío. (Fig. 8) Microcentrífuga (Mikro 22 R, Hettich) con capacidad para 24 micro tubos eppendorf. (Fig. 9) Centrífuga (Hermle 2400k, Lab-Tec) de 4 puntos con vasos intercambiables para tubos de distinto volumen. (Fig. 10) Microcentrífuga de vacío (Vacufuge, Eppendorf) con capacidad para 48 micro tubos. Todas las centrifugas se pueden ajustar en cuanto a tiempo, temperatura y revoluciones por minuto (rpm).



(Fig. 11) Espectrofotómetro (Benchmark plus, Bio-Rad). Es un equipo ampliamente usado para investigación en pruebas como ELISA, Interferón gamma, cuantificación de proteínas. Este modelo puede leer placas de 96 pozos con capacidad de 200 μ l cada uno, lo que permite economizar muestra y reactivos. También está conectado a una computadora que captura las lecturas y permite su análisis e interpretación con mayor facilidad.

6 DISCUSIÓN.

Todos los objetivos para este servicio social se cubrieron satisfactoriamente. Se cumplió con la capacitación para el manejo del equipo especializado. Se comprendió el fundamento fisicoquímico de la electroforesis y la transferencia de proteínas, y se aprendió la metodología de las técnicas acordadas.

Durante el año de estancia con CENID-Microbiología en INIFAP se contó con una beca del proyecto CONACYT G34799-B, del cual es responsable la Dra. Camila Arriaga, en el periodo de Abril 2004 a Marzo 2005.

7 BIBLIOGRAFIA

Introducción.

1. Ettinger Stephen, Edward C. Feldman. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Vol. 1, 4^a ed. W. B. Saunders company. 1995.
2. P.J. Quin, B.K. Markey, M.E. Carter, F.C. Leonard y W.J. Donnelly. **Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias**. Editorial Acriba. 2002.
3. Ciro Estrata-Chávez, Ana L. Pereira-Suárez, Marco A. Meraz, Camila Arriaga, Alejandro García-Carrancá, Cristina Sánchez-Rodríguez, y Raúl Mancilla. **High-level expression of NRAMP1 in peripheral blood cells and tuberculous granulomas from Mycobacterium bovis-infected bovines**. Infection and Immunology. Nov.2001, vol. 69 no. 11 p. 7165-7168
4. Esatrada CC., Díaz OF., Arriaga C., Meraz MA., Villegas N., Díaz H., Pereira AL., and Mancilla R. **Serum antibodies against the A85 complex and PPD in cattle with different tuberculosis statuses**.
5. Serbina N., Lazarevic V., and Flynn J.L. **CD4+ T cells are required for the development of CD8+ cells during Mycobacterium tuberculosis infection**. The Journal of Immunology. Vol. 167 no. 12. December 15. 2001.
6. Cosivi O., Grange J.M., Daboron C.J., Raviglione M.C. Fugikura T., Cousins D. Robinson R.A. Huchzermeyer H.F.A.K., de Cantor I., and Meslin F.-X. **Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries**. Emerging Infections Diseases vol. 4 no.1, January-March 1998.
7. Vordermeier H.M., Chambers M.A., Cockle P.J., Whelan A.O. Simmons J., and Hewinson R.G. **Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following Mycobacterium bovis BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis**. Infection and Immunity, June 2002. vol 7 no. 6. p. 3026-3032.
8. Hernández-Pando R., Orozco H., Sampieri A., Pavón L., Velasquillo C., Larriva-Sahd J. Alcocer J.M., y Madrid M.V. **Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in murine model of experimental pulmonary tuberculosis**. Immunology 182:33.

TESINA

8. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina (TB), enfermedad zoonótica responsable de problemas de salud en animales y el hombre en muchos países, que además representa un serio problema económico. Estudios recientes sugieren que en la actualidad 1/3 de la población mundial tiene una infección latente del bacilo, y muestran que aparecen 12 millones de nuevos casos y que ocurren 3 millones de muertes cada año (Smith y col., 2000).

En México la TB bovina causa pérdidas por cientos de millones de dólares al año en el sector ganadero a causa de la remisión a rastro de los animales reactivos y falsos positivos a la prueba de tuberculina, la ocurrencia de falsos negativos que diseminan la enfermedad en el hato, y la pérdida progresiva de peso y baja en la producción láctea de las vacas enfermas (IMEBTA, 1992; Gurria T. F., 1994).

El resurgimiento global de la TB ha hecho imperativo el mejoramiento de métodos diagnósticos para el control de la enfermedad. La mayoría de los casos ocurren en países en desarrollo con recursos limitados. El perfeccionamiento de pruebas diagnósticas más baratas y eficientes podría contribuir en el control de la enfermedad. Es por esto que el interés en el desarrollo de métodos diagnósticos basados en anticuerpos ha sido reconsiderado en los últimos años (Smanich y col., 2001).

El aislamiento y estudio de componentes antigénicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* es de gran importancia, tanto con fines diagnósticos y profilácticos, como en la compleja interacción entre la micobacteria y el hospedador. Recientes avances en la metodología han ayudado enormemente en el aislamiento de antígenos potencialmente importantes. La técnica de Western blot ha demostrado ser una poderosa herramienta en la identificación de antígenos inductores de la respuesta de células B (Espitia., 1989). Este método se usa para la detección inmunológica de las proteínas (Antígenos proteicos) transferidas desde un gel de poliacrilamida a un soporte inerte por medio de una corriente eléctrica.

En México, los programas de control y erradicación de la TB se basan en la detección de animales infectados mediante la prueba de tuberculina simple y/o comparativa y el sacrificio de animales reactivos (CONETB, 1998). Esta prueba constituye, hasta el momento el principal instrumento para la detección, control y erradicación de la TB (Vargas., 1988). Sin embargo, estudios realizados han demostrado que la especificidad de esta prueba es relativamente baja (Vekemans y col., 2001). En otro estudio, se demostró que 19% del ganado tuberculoso no reacciona a la prueba de tuberculina (Neill y col., 1992; Neill y col., 1994). Lo anterior puede deberse, por un lado, a que se usa un derivado de proteína purificado (PPD) que contiene una mezcla de antígenos poco definidos. Por otro lado, existen circunstancias que pueden ocasionar la presentación de resultados falsos negativos (Vargas., 1988): (1) cuando el proceso tuberculoso está en periodo de incubación o fase prealérgica, (2) estados de anergia y (3) después del parto, hasta 5 a 6 semanas.

Sin embargo, ensayos serológicos pueden ser usados en la detección de animales en etapas avanzadas de la enfermedad, donde la respuesta celular ya no es detectable. Los ensayos humorales como el ELISA y el Western Blot podrían ayudar en la detección de animales positivos a TB en etapas avanzadas de la enfermedad, en lo que las pruebas disponibles actualmente son deficientes (Lightbody y col., 1998).

La inmunidad contra infecciones micobacterianas depende de una interacción entre células T y macrófagos (Pollock y col., 1996).

En fases tempranas de la enfermedad, la citofluorometría de lavados bronquiales evidenció cantidades elevadas de macrófagos y linfocitos, predominantemente CD4+. Estudios inmunohistoquímicos y de PCR, mostraron la predominancia de una respuesta de la subpoblación Th1 y la expresión del gen del Interferón gamma (IFN γ) e Interleucina 12 (IL-12). Por otro lado, en la fase crónica, se detecta una elevada expresión del gen del IFN γ y la presencia de IL-4. Estudios *in Vitro* revelan un antagonismo entre IFN γ y la secreción de IL-4.

En esta fase crónica se encontraron títulos elevados de IgG1 e IgG2a en suero además de una predominancia de CD8+ demostrada por citofluorometría. La severidad y cronicidad de la enfermedad no se asoció con un declive cuantitativo de citocinas liberadas por células Th1 o la disminución de la expresión de IL-12. Sin embargo, es posible que la eficiencia funcional de IFN γ y la IL-2 se vea reducida (Hernández-Pando y col., 1996).

9. Agente etiológico de la TB.

Los primeros en observar la Micobacteria en los tejidos fueron Baumgarten y Koch en 1882. Este último cultivó la bacteria y reprodujo la enfermedad en el periodo de 1882 a 1884.

Se clasifican como gram positivas, aunque tiñen mal con esta técnica. Las especies de *Mycobacterium* se distinguen de las demás bacterias por ser bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), propiedad que se relaciona con ciertos componentes lipídicos contenidos en su pared celular (Frobisher, 1970). Son aeróbios, no esporulados e inmóviles. El bacilo mide aproximadamente 0.2 a 0.6 x 1 a 10 μ m y a veces forma filamentos ramificados. Degradan azúcares por procesos oxidativos (Murray P. R., 2002).

10. Constituyentes micobacterianos.

Hasta ahora no se ha demostrado que las micobacterias produzcan exotoxinas. La química de las micobacterias es muy compleja. Aproximadamente el 50% de su peso seco son lípidos, contenidos en su mayoría, en la pared celular, y se cree que esta característica origina la resistencia a mecanismos de defensa humoral y a desinfectantes, ácidos y álcalis.

La gruesa pared celular de las micobacterias es rica en ácido micólico y otros lípidos complejos que la vuelven hidrófoba y permeables a colorantes acuosos en frío (Bwright y col., 2004).

11. Superficie de la micobacteria.

Esta bacteria esta contenida por una membrana citoplasmática típica, una doble capa de fosfolípidos, y recubierta por peptidoglicano (PG). Se encuentran varias proteínas asociadas al PG que se localizan entre este último y la membrana citoplasmática. Algunas de estas proteínas son inmunogénicas. A continuación el PG se encuentra unido mediante enlaces fosfodiéster al arabinogalactano (AG), un polímero de arabinosa y galactosa. El ácido micólico, cadena larga de ácidos grasos, está anclado a la porción distal del AG. El complejo PG, AG y micolatos del disacárido de trealosa (Factor Cordón) esta asociado al esqueleto de la pared celular. Otro componente importante de la pared celular son los trialosa-2'-sulfatos acilados. Estos pueden ser importantes para la virulencia, las cepas mas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* elabora fuertemente sulfolípidos ácidos, los cuales talvez están envueltos en la inactivación del fagosoma del macrófago (Fenton y Vermeulen., 1996).

Otro componente que a sido foco de diversas investigaciones es el Lipoarabinomanana (LAM), el cual, mientras se encuentre anclado en la membrana celular micobacteriana, esta extendido en la superficie. LAM es encontrado como una mezcla homogénea de galactosa y manosa asociada a lipopolisacáridos fosforilados de alto peso molecular. Los ácidos grasos, típicamente palmitato y tuberculoestearato, aparecen en forma de diacilglicerol, ligado a cadenas de arabinosa y manosa a través de fosfatidil-myo-inositol (Chengappa, 1996; Murray PR., 2002).

12. Antígenos de mayor importancia de *Mycobacterium*.

El objetivo de las investigaciones sobre las micobacterias se ha centrado en el aislamiento y caracterización de las antígenos, en los últimos años. El estudio de los componentes micobacterianos es de gran importancia no solo para inmunodiagnóstico e inmunoprofilaxis, sino también para el mejor entendimiento de la interacción entre el bacilo tuberculoso y su hospedador (Espitia y col, 1989). No obstante, esta se vuelve una tarea difícil, ya que existen dificultades inherentes a los componentes micobacterianos que hacen complicado su aislamiento y purificación (Lightbody y col, 1989).

Varios antígenos purificados a partir de filtrados de cultivo se han empleado para el diagnóstico de la TB dentro de estos las proteínas MPB70 de 22 kDa y MPB64 de 24 kDa han demostrado ser altamente inmunodominantes y específicos. Sin embargo, las pruebas con pocos antígenos han demostrado detectar la respuesta serológica en un número reducido de animales infectados. Mas recientemente se empleo una batería de 12 proteínas recombinantes de *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Entre las proteínas usadas se encontraban el MPB70, específica de *M. bovis*, ESAT-6 (*erly secretion antigen target*) de 14 kDa, MPT63 de 19 kDa, MPT64, MPT61, MTC28, A85 de 38 kDa, MPT32, y KAT6, de estos ESAT-6, A85, MPB70, MPT32, MPT61 y MPT63 fueron los antígenos mas seroreactivos en la TB bovina. *M. bovis* y *M. tuberculosis* poseen antígenos muy relacionados. La homología del DNA es casi del 100%. Un gran número de antígenos se han caracterizado en *M. tuberculosis* entre los que destacan MPT40, MPT51, MPT64, las tres proteínas de secreción, TP66 proteína seroreactiva homóloga a la albúmina serica, H37Rv antígeno nativo de 30 kDa y H37Ra de 14 kDa (Díaz, 2000).

La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados a la fecha son proteínas solubles, entre las que destacan aquellas secretadas activamente en el medio de cultivo. De los antígenos descritos para *M. bovis*, el 35 % del volumen total de los antígenos que

son secretados *in vitro* está formado por el complejo A85 ubicado entre los 30-32 kDa. El complejo A85 es un conjunto de tres proteínas (85A-32 kDa; 85B-30 kDa y 85 C-32 kDa) independientes y homólogas con actividades enzimáticas que le permiten a la bacteria la síntesis de pared celular contribuyendo a su supervivencia dentro del macrófago y de estas el 85A constituye la mayor proporción del complejo, secretada en cultivos de *Mycobacterium bovis* y *M. tuberculosis* (Smith y col., 2000). El complejo A85 induce una buena respuesta proliferativa, de IFN γ y actividad citolítica. Diversos experimentos han demostrado que la inmunización con este antígeno genera una fuerte respuesta de células T CD4 Th1 y CD8 en modelos de roedores y humanos (Smith y col., 2000). Un estudio demostró a través de pruebas de Western blot en segunda dimensión (2-D) que sueros de pacientes PPD-positivos reaccionaron con los componentes individuales del complejo A85 (Smanich y col., 2001). Está comprobado que elementos del complejo A85 son expresados por micobacterias no patógenas y corinebacterias. La exposición a estos microorganismos puede dar una reacción cruzada de anticuerpos. Sin embargo, la fuerte reactividad de suero de pacientes humanos con TB a este antígenos sugieren que la proteína micobacterial también posee epitopes específicos serodominantes (Smanich y col., 2001).

El ESAT-6 es una proteína de secreción de bajo peso molecular expresado por *M. bovis* y *M. tuberculosis*, producto de la actividad molecular de la bacteria (Ulrichs y col, 2000) pero no está presente en la cepa vacunal *M. bovis* BCG (Vekermans y col, 2001) producido en mínimas cantidades cuando la bacteria se cultiva en un medio simple Souton. Sin embargo, esta molécula es un prominente blanco *in vivo*. Esto eleva la posibilidad de que la síntesis de esta proteína sea regulada durante el crecimiento micobacterial dentro del macrófago. Esto es consistente con la idea de que el ESAT-6 es una de las proteínas inductoras de la fagocitosis, la cual es procesada y presentada por el macrófago infectado durante la primera fase de la infección (Brandt y col., 1996). Se ha identificado al ESAT-6 y 85B como antígenos blanco reconocidos por células T (Brandt y col., 1996). En un estudio se demostró que el ESAT-6 es la principal molécula blanco de las células Th1 productoras de IFN γ , lo que apoya la idea de el potencial de ESAT-6 como reactivo en la elaboración de nuevas pruebas diagnósticas (Harboe y col, 1996).

La proteína MPB70, proteína de alta especificidad para *M. bovis*, es la más estudiada hasta el momento. Es un antígeno inmunodominante capaz de inducir una inmunidad celular, estimula la proliferación de linfocitos y la producción de anticuerpos en animales infectados con *M. bovis*. La MPB70 es uno de los principales componentes del filtrado de cultivo de *M. bovis* y se considera que forma parte del componente activo del PPD.

A diferencia de los grandes avances en la caracterización de los antígenos de *M. tuberculosis*, poco es el conocimiento que hay en relación a *M. bovis*, y de estos la mayoría son en la cepa de *M. bovis* BCG y muy poco en cepas de campo virulentas. Por lo que la caracterización de antígenos de *M. bovis* es fundamental para el entendimiento de la patogenia y respuesta inmune durante la tuberculosis bovina (Díaz y col, 2002)

13. Epidemiología

Es una enfermedad de difusión mundial. La transmisión se produce normalmente mediante aerosoles que contienen la bacteria generados por los individuos infectados. Los bovinos son huéspedes naturales de *Micobacterium bovis*. El ganado lechero está

sometido a mayor riesgo debido al estrecho contacto de los animales durante la estabulación, los terneros pueden infectarse con la ingestión de leche contaminada proveniente de vacas infectadas. Los cerdos se infectan fácilmente y la enfermedad es grave, la principal vía de transmisión en esta especie es la digestiva. Es muy raro en perros, caballos y ovinos. Las aves de corral son resistentes. Los conejos, ratones y cobayos son muy susceptibles (Quin, 2002).

Los humanos adquieren la bacteria tomando leche sin pasteurizar. Un factor predisponente son los estados de inmunosupresión. En humanos el VIH es la causa de los casos de tuberculosis bovina se elevaron en los últimos años, en todo el mundo (Chengappa, 1996).

13.1 Tratamiento

El Tratamiento no es factible en animales de producción. En zoológicos y granjas recreativas se utiliza una combinación de isoniacida y rifampicina como profilaxis.

En el hombre se usa isoniacida y ácido paraminosalicílico o etambutol y a veces estreptomycin. Como segunda opción están la kanamicina, cicloserina, capreomicina y etionamida. Las cepas desarrollan resistencia a la estreptomycin y a la isoniacida (Bwright 2004; Stainer, 1996)

14. Diagnóstico.

14.1 Inspección posmortem (IP) en el rastro. Es una medida práctica, comúnmente realizada por la CANETEB y se lleva a cabo en los rastros durante el sacrificio de los bovinos reactivos a la tuberculina. Las lesiones tuberculosas se localizan en nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio en un 90 % de reactivos positivos. La mayoría de los estudios morfológicos concluyen que una cifra menor al 15 % de bovinos reactivos muestran lesiones evidentes en pulmón (Estrada, 2003). En la IP se deben considerar todas aquellas etiologías que tienden a producir lesiones visibles de tipo granulomatoso y que no se diferencian de las producidas por *M. bovis*.

El diagnóstico se puede realizar a partir de muestras como lavados traqueobronquiales; linfonodos submandibulares, traqueobronquiales y mediastínicos; orina, heces, material obtenido de lesiones, suero y sangre completa; según la prueba que se realice.

14.2 Histopatología. Cortes histológicos teñidos con eosina y hematoxilina muestran el patrón típico de una inflamación granulomatosa, el centro del granuloma inicial presenta células epiteloides y células gigantes y la periferia se compone de linfocitos organizados y células plasmáticas. Con el tiempo se produce una necrosis central y fibrosis periférica. (Trigo,1998).

14.2.1 La tinción de Ziehl-Nelsen evidencia a los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), aunque el bajo número de micobacterias presentes en las lesiones dificultan el diagnóstico por este método.

14.3 El diagnóstico definitivo se hace mediante el cultivo e identificación del bacilo tuberculoso a partir de muestras de animales sospechosos.

El aislamiento de la micobacteria exige la descontaminación de la muestra con hidróxido de sodio y ácido oxálico. Se realiza una centrifugación para concentrar las

micobacterias. El botón (micobacterias empaquetadas) se siembra en tubos inclinados con medio de Lowenstein-Jensen enriquecido con 0.4 % de piruvato de sodio, y se incuba en condiciones aerobias a 37° C hasta por 8 semanas.

La identificación se hace basada en características de crecimiento, pigmentación y perfil bioquímico y tensión Ziel-Nelsen positiva a partir del cultivo.

14.4 PCR. La amplificación de fragmentos específicos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una importante forma para demostrar o identificar miembros del genero *Mycobacterium*. En esta se busca encontrar segmentos específicos del genoma de *M. bovis*, como el que codifica para la proteína MPB70.

14.5 Inmunodiagnóstico.

14.5.1 Prueba de la tuberculina. Esta prueba mide la reacción de hipersensibilidad mediada por células, cuando la tuberculina o derivado proteico purificado (PPD) es administrado por vía subcutánea. La tuberculina contiene péptidos micobacteriales liberados en cultivos durante su crecimiento. Algunos de ellos desencadenan una respuesta de hipersensibilidad tardía.

En el ganado, se inocula el equivalente a 0.1ml de PPD por dosis por vía subcutánea en el pliegue caudal o en las tablas del cuello. En los casos positivos, una hinchazón (mayor a 5 mm) se desarrolla en las 72 horas post inoculación.

Una prueba positiva indica una infección pasada o reciente. El animal reactivo debe ser sacrificado y se le practica la necropsia.

Falsos positivos pueden aparecer por la presencia de micobacterias no tuberculosas o atípicas.

Falsos negativos ocurren con animales infectados recientemente que aún no desarrollan la reacción de hipersensibilidad o en aquellos animales crónicos que han desarrollado anergia por exceso de antígeno o inmunosupresión. Factores inespecíficos como desnutrición, estrés o parto reciente, son causas alternativas de anergia.

Una prueba doble comparativa se aplica para descartar falsos positivos por la presencia de *Micobacterium avium*. Se inocula 0.1 ml de PPD bovino y aviar por vía subcutánea en el pliegue anocaudal o tablas del cuello. Se mide el grosor de la piel justo antes de las inoculaciones. A las 72 horas se mide nuevamente, si el grosor de la piel en el inóculo de PPD bovino es mayor por 4 mm o más al del PPD aviar se considera positivo (Quin, 2002).

14.5.2 ELISA, inhibición de la hemaglutinación y fijación del complemento, que miden la inmunidad humoral, o sea, anticuerpos específicos contra antígenos de *M. bovis*, se han utilizado para el diagnóstico de la TB bovina. La prueba de ELISA en particular, es capaz de detectar animales anérgicos.

14.5.3 IFN γ . Esta prueba se funda en la medición de niveles de IFN γ en plasma a través de una prueba de ELISA modificada.

15. Inmunidad contra la Tuberculosis Bovina.

Los macrófagos son muy importantes en la defensa del huésped, su participación es de vital durante la instauración de la respuesta inmune, cuando solos o en compañía de células asesinas naturales (NK), son capaces de inhibir la proliferación e inactivar a las micobacterias en etapas tempranas de la infección (Barrera y col., 1994).

El principal mecanismo de inmunidad natural frente a la micobacteria es la fagocitosis. Sin embargo, estas son relativamente resistentes. Por lo tanto no es de sorprender que la inmunidad natural sea ineficaz en el control de este microorganismo.

Las bacterias intracelulares activan a las células asesinas naturales (NK), directamente o estimulando la producción en los macrófagos de la interleucina 12 (IL-12), potente citosina que activa células NK. Las NK a su vez producen Interferón gamma (IFN γ), que activa los macrófagos. De este modo las células NK proporcionan una defensa precoz frente a las micobacterias, antes del desarrollo de la inmunidad específica. El tipo celular NK son propias de la respuesta innata. Estas células no tienen memoria inmunológica. Las actividades de las NK son reguladas positivamente por la IL-12 proveniente de macrófagos activados por el antígeno, lo cual conduce a la producción de IFN γ y a la polarización de la respuesta adquirida (Estrada 2003)

La inmunidad adquirida se caracteriza por tres elementos: especificidad antigénica, distinguir lo propio de lo extraño y la memoria. Las células que participan en esta respuesta son las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *antigen presenting cell*), linfocitos T y linfocitos B. La especificidad está determinada por la expresión de proteínas de membrana en los tres grupos celulares anteriores.

La inmunidad específica o adquirida en la tuberculosis bovina involucra principalmente células T con receptores $\alpha\beta$, subpoblación CD4+ que reconocen antígenos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) tipo II (Estrada., 2003). La hipersensibilidad tardía (HT) es una forma de reacción inmunitaria mediada por células en la que la última célula efectora es el macrófago. Es parte del mecanismo básico de defensa frente a la micobacteria. La activación de los macrófagos produce lesión tisular.

La reacción HT consta de 3 eventos secuenciales:

1. Fase de reconocimiento, en la que las células T CD4+ y en menor proporción las células T CD8+ reconocen antígenos proteicos presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA).
2. la fase de activación, en la que las células secretan citocinas y proliferan.
3. la fase efectora que puede dividirse en dos partes (1) etapa de inflamación, en la que las células endoteliales vasculares, activadas por citocinas, atraen leucocitos circulantes a los tejidos donde se encuentra el antígeno microbiano. (2) Los macrófagos activados por citocinas tratan de eliminar al antígeno (Abbas., Litchman y Pober., 1995)

Como ya se mencionó, la entrada principal de la micobacteria es la vía respiratoria. Sobrepasa la acción del epitelio respiratorio superior para llegar a los bronquiolos y finalmente los alveolos. En este sitio son ingeridos por los fagocitos mononucleares o neumocitos tipo III. En este punto hay dos opciones: que el microorganismo sea destruido o que los fagocitos, como sucede a menudo en una primo infección, no sean capaces de eliminarlo y pasen a la circulación linfática a través de los vasos linfáticos aferentes, hasta llegar a los linfonodos regionales. Los Macrófagos son el hábitat natural

para la proliferación de las micobacterias. Estos encuentran en el macrófago el ambiente excelente para crecer y multiplicarse (Barrera y col., 1994).

Durante el trayecto a los linfonodos regionales el macrófago procesa al antígeno para ser presentado a través de moléculas de superficie del MHC clase II. Estas moléculas están restringidas a células profesionales de adquisición, procesamiento y presentación antigénica como los, macrófagos, células dendríticas y células B.

Cuando las partículas proteicas extrañas son internadas sufren un procesamiento en compartimentos vesiculares ácidos. Este procesamiento asegura que fracciones peptídicas (péptidos inmunodominantes) se unan a las moléculas de clase II del MHC. Estos complejos se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *antigen presenting cell*). Los patrones de asociación del antígeno con las moléculas del MHC determinan el tipo de célula T que será estimulada. (Abbas., Lichtman y Pober., 1995)

Las células T se dividen en dos linajes según un receptor expresado en su superficie $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Las poblaciones principales surgidas del tipo linfocito T $\alpha\beta$ son CD4+ cooperadoras y CD8+ citotóxicas. Esta división corresponde al tipo de moléculas accesorias en su superficie y son responsables de su dirección hacia las distintas clases de MHC, ya sea tipo I o tipo II, respectivamente.

Los fragmentos peptídicos derivados de proteínas extracelulares (antígeno exógeno) se unen a moléculas clase II del MHC y son reconocidos por las células T CD4+ cooperadoras, indispensables para la inducción de la inmunidad mediada por células (IMC)

y la respuesta humoral.

Los linfocitos T madurados y diferenciados en órganos linfoides primarios, son diseminados en todo el organismo donde permanecen como linfocitos pequeños inactivos. En general son almacenados en órganos linfoides primarios donde las condiciones son óptimas para su activación.

Al llegar al parénquima del linfonodo, el macrófago, ahora en función de APC activa la célula T nativa específica del antígeno, que se encuentra adherida al endotelio del linfonodo por medio de una molécula de superficie denominada selectina-L, donde se realiza la activación del linfocito. Durante la activación, la célula T aumenta la expresión de varias proteínas de superficie que median la adhesión a otras células y otras moléculas de la matriz extracelular. Estas células T recién activadas se quedan como residentes del linfonodo.

La célula T, ahora activada, comienza a multiplicarse. Su progenie puede diferenciarse a células T efectoras o células T de memoria. A medida que las células T se diferencian mantienen sus moléculas de adhesión, pero estas pierden afinidad por sus ligandos, liberándose del endotelio del linfonodo, y entrando a la circulación.

Las células T efectoras y de memoria, migran por la circulación sanguínea, hasta llegar al lugar de inflamación, que a menudo es el sitio de entrada del antígeno. Se unen al endotelio venoso a través de sus moléculas de adhesión con afinidad por los sitios de inflamación. La recirculación de las células T de memoria asegura que la memoria inmunitaria sea sistémica, o sea, que la respuesta efectora puede surgir en cualquier lugar del organismo, aunque las células de memoria fueran generadas en un linfonodo regional que irriga un área en particular, donde entró el antígeno. Un tema de controversia es si las células T en estado de memoria permanecen alteradas o pueden revertir a su estado nativo al no ser reestimuladas por el antígeno después de un tiempo dado (Abbas, Litchman y Pober, 1995).

La activación de las células T CD4+ juegan un papel central contra la tuberculosis, contribuyendo en la protección produciendo citocinas específicas. La estimulación antigénica puede llevar a la diferenciación a las células TCD4+ en subpoblaciones llamadas Th1 y Th2 que tienen perfiles relativamente restringidos de producción de citocinas. Las micobacterias son potentes inductores de la diferenciación de las células T CD4+ al fenotipo Th1, porque las bacterias intracelulares estimulan la producción de IFN γ , por las células NK, y de la interleucina 12 (IL-12), por los macrófagos, y ambas promueven la diferenciación hacia células Th1. La subpoblación Th1 es la que se presenta en la defensa contra la tuberculosis. Secreta interleucina 2 (IL-2) e IFN γ , y son los principales efectores de la inmunidad mediada por células y de las reacciones de hipersensibilidad tardía. El IFN γ , que parece ser la molécula efectora más crítica para la activación del macrófago, debido a que regula su efecto protector por medio de la inducción de intermediarios reactivos del nitrógeno, necesarios para la destrucción de la micobacteria.

Al parecer cuatro efectos mediados por las citocinas liberadas son los más importantes para el desarrollo de la reacción inflamatoria característica:

1. la IL-2 produce una proliferación autocrina y paracrina de las células T activadas por el antígeno. Concentraciones superiores de IL-2 pueden también estimular células T vecinas que no son específicas al antígeno. A medida que la infiltración linfocitaria se hace más pronunciada, más del 90% de las células T activadas presentes no son específicas. La IL-2, al mismo tiempo, estimula la proliferación de células NK y aumenta su función citolítica. También induce una mayor producción de IFN γ , Factor de necrosis tumoral (TNF) y la linfoxina (LT).
2. el IFN γ actúa sobre las CPA, que pueden ser células endoteliales o macrófagos aumentando la expresión de moléculas del MHC clase II, y así incrementar la presentación del antígeno a las células T CD4+. Este es otro mecanismo importante de amplificación para la inducción de HT.
3. el TNF y LT actúan sobre las células endoteliales aumentando la expresión de moléculas de adhesión, lo cual induce la activación de leucocitos y de la respuesta inflamatoria. El IFN γ y la IL-4 pueden tener acciones similares sobre las células endoteliales, reclutando de forma específica células mononucleares.
4. El IFN γ actúa sobre los monocitos que se infiltran en la zona de inflamación, elevando su capacidad de fagocitosis y actividad bactericida, por tanto, su eficiencia. El IFN γ es la citosina activadora del macrófago más potente y es el mediador más importante de la HT. El IFN γ también actúa sobre las células B para promover el "switching" (cambio de cadena pesada de la inmunoglobulina) a IgG2a (Abbas, Litchman y Pober, 1995)

Las funciones estimuladoras de las citocinas generan con frecuencia asas amplificadoras que capacitan un pequeño número de linfocitos específicos del antígeno a reunir los múltiples mecanismos para eliminar dicho antígeno. Uno de los mecanismos más importantes es el de la activación del macrófago.

Los macrófagos son la principal y esencial línea de defensa (Barrera y col., 1994). Estas células están encargadas de inhibir la multiplicación de la micobacteria. Siempre trabajan en conjunto con los linfocitos para mantener la respuesta inmune mediada por células a través del procesamiento y la presentación del antígeno al linfocito T antígeno-

específico. Las citocinas secretadas por estas células T son esenciales para desarrollar una actividad antimicrobial potente. Este proceso de estimulación y activación de linfocitos y monocitos termina con la especialización de los macrófagos, convirtiéndolos en la última célula efectora (Carpenter y col., 1998).

La activación del macrófago se compone de alteraciones cuantitativas en la expresión de varios productos génicos que le confieren al macrófago activado capacidades que no tiene en estado de reposo. Las propiedades facultativas del macrófago activado son:

1. Mejores CPA.
2. Efecto bactericida debido a especialización en la fagocitosis y la formación de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno.
3. Estimulan la inflamación aguda con la secreción de mediadores de vida corta.
4. Los productos de los macrófagos activados como factores de proliferación y citocinas modifican el ambiente tisular local en las reacciones de HT crónicas, produciendo la destrucción del tejido y después, estimulan el reemplazo por tejido conectivo.

La muerte de las bacterias por macrófagos implica la generación de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno. El $\text{IFN}\gamma$ estimula la transcripción de los genes que codifican las enzimas para formación de estos compuestos.

Los reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI) son los principales efectores moleculares de los macrófagos activados, responsables de eliminar e inhibir el desarrollo de las micobacterias. El término RNI se refiere a estados de oxidación del nitrógeno productos de la oxido nítrico sintetasa. Estos productos se encuentran entre el oxido nítrico (NO) y el nitrato (NO_3^-), incluyendo NO^- , NO_2 , NO_2^- , N_2O_3 , N_2O_4 y peroxinitrito (OONO^-). El término ROI se refiere a productos intermedios de la reducción del oxígeno en la ruta del agua, nombrados superóxidos (O_2^-) peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-). En términos prácticos se mencionaran genéricamente como ROI y RNI.

Los macrófagos tienen la oportunidad de producir tanto superóxido (O_2^-) como oxido nítrico (NO) en concentraciones parecidas y son generadores prolíficos de su unión en un producto particularmente destructivo, peroxinitrato (OONO^-) (Nathan y Shiloh. 1994). Los antígenos solubles de *M. bovis* BCG han demostrado ser potentes inductores de la producción *in vitro* de ROI en monocitos de bovinos. No obstante, un estudio anterior demostró que antígenos fraccionados de AN5 inducen una mayor producción de nitritos que el filtrado crudo, *in vitro*. La síntesis de oxido nítrico (NO) puede ser inducida por diversas citocinas, incluidas el interferón gama ($\text{IFN}\gamma$) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Joardar y col., 2003).

El $\text{IFN}\gamma$ bovino tiene un papel importante en la síntesis de NO. Sin embargo, la producción de NO puede ser incrementada con estímulos adicionales como TNF e IL-1b (Joardar y col., 2003) e incluso productos microbianos como la endotoxina LPS. En macrófagos alveolares de bovino se demostró que un pre tratamiento con $\text{IFN}\gamma$ limitaba el crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG. En contraste la inhibición del crecimiento en cepas virulentas de *M. Bovis* requería una estimulación secuencial con $\text{IFN}\gamma$ y LPS (Carpenter y col., 1998).

El ROI y RNI pueden dañar el DNA y diversas mezclas químicas como grupos Fe-S, radicales tirosil, hemes, sulfidrilo, tioesteres y alquenos. Este sistema de defensa tiene el potencial de dañar células sanas (Nathan y Shiloh. 1994). Sin embargo, desde la perspectiva del organismo, la pérdida de tejido sano es un precio que bien se puede pagar para salvar el todo. Como lo ilustra la formación de un absceso en mamíferos, los

macrófagos se sacrifican rápidamente, junto con una porción de tejido del hospedador para evitar la diseminación de la micobacteria.

El otro mecanismo liberado por las acciones de las células T CD4⁺ Th1 activadas es la estimulación de células B en la producción de Ig, y en particular IgG2a. Los antígenos proteicos no inducen respuesta humoral sin la cooperación de las células T, por lo que se denominan “antígenos dependientes del timo”. Las células B en reposo no se han expuesto al antígeno y necesitan dos tipos de estímulo. Un tipo es la unión con el antígeno como lípidos y polisacáridos; el otro lo proporcionan las células T cooperadoras y sus productos.

16. Patogénesis de la Tuberculosis Bovina.

La principal entrada para las micobacterias es la vía aérea, por contacto directo, con animales infectados. La inhalación de micobacterias origina la infección pulmonar primaria, la cual afecta los lóbulos caudales (Trigo, 1998). Cerca del 10 % de las micobacterias inhaladas alcanzan los bronquiolos y alveolos; el resto son detenidas en el epitelio respiratorio superior y son expelidas por el aparato mucociliar. Debido al reducido tamaño de la micobacteria, en relación con el tracto respiratorio, viajan por los pequeños espacios aéreos, donde son ingeridos por monocitos alveolares, donde pueden ser destruidos o sobrevivir.

En la infección primaria, los macrófagos son incapaces de eliminar por completo a las micobacterias fagocitadas debido a la habilidad de estas últimas para resistir la acción de radicales libres y proteólisis. Evitan la unión del fagosoma y el lisosoma. *Mycobacterium tuberculosis* al parecer logra esto desarrollando vesículas ricas en hidrolasas ácidas. También se relaciona con su resistencia a las propiedades fisicoquímicas de su superficie. Aunado a esto, su permanencia dentro de los monocitos fagocíticos los protegen de la acción bactericida de los componentes del suero. Las micobacterias se multiplican dentro de los macrófagos alveolares y solo producen una inflamación leve (respuesta inmune natural). Si los macrófagos logran contener la infección, puede permanecer en una fase asintomática por mucho tiempo, pudiéndose reactivar a causa de una reinfección. Los mecanismos de la reactivación, tanto del organismo como del hospedador no son del todo comprendidos (Fenton y Vermeulen., 1996).

Los macrófagos infectados atraviesan la pared bronquial y son drenados por vasos aferentes del sistema linfático a nódulos cervicales anteriores, mediastínicos y traqueobronqueales, o a otros sitios del parénquima pulmonar (Estrada., 2003). En estos sitios los macrófagos activan a las células T nativas, dando inicio a la respuesta inmune mediada por células (IMC). Las células T activadas liberan citocinas que capacitan a los monocitos fagocíticos (activación del macrófago), elevando su actividad fagocítica y bactericida, mediante la inducción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) e intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI). Durante la activación de células T y macrófagos se sintetizan y liberan una gran variedad de compuestos con actividad autocrina, paracrina e incluso endocrina, como citocinas, quimiocinas y otros mediadores de la inflamación. La interacción de estos compuestos inducen acciones reguladoras, potenciadoras e inhibitoras, unas de otras. Estas activan y capacitan a diversos grupos celulares, unos linfoides, y otros no, que en general, realicen funciones como reclutamiento, quimiotaxis, presentación de proteínas de membrana, cambios

fisicoquímicos y anatómicos con la finalidad de mediar la respuesta inmune y elevar la capacidad bactericida (Díaz., 2000).

La activación continua de células T conduce a la formación de granulomas, con necrosis caseosa central, causada por los productos de los macrófagos (NOI, ROI y enzimas lisosomales), concentraciones tóxicas de citocinas, isquemia de vasos trombosados, complejos antígeno-anticuerpo, entre otros (Abbas., Lichtman y Pober, 1995). ROI y NOI pueden dañar el ADN sin diferenciar entre la micobacteria o células no infectadas (Nathan y Siloh 2000) Los macrófagos experimentan cambios morfológicos y funcionales, transformándose en células epiteloides (Estrada, 2003). Simultáneamente se fusionan muchos macrófagos formando células gigantes, por tanto el centro del granulosa inicial queda formado por estos tipos celulares; mientras que en la periferia se organizan linfocitos y células plasmáticas. Con el tiempo se produce una necrosis del centro y fibrosis periférica (Trigo, 1998). Esta es una forma de reacción de hipersensibilidad tardía mediada por células tipo IV (HT) frente a las micobacterias. Se cree que la necrosis sirve para lisar a los macrófagos infectados y crear un medio anóxico, con pH ácido y con la presencia de ácidos grasos tóxicos que impide la supervivencia de las micobacterias. De este modo incluso la lesión tisular puede tener una función protectora. En los primeros días siguientes a la infección una respuesta granulomatosa fuerte es vital. Sin embargo, tres semanas después de la infección defensas antígeno-específicas se desarrollan y contribuyen ampliamente con la resolución de la infección (Fenton y Vermeulen, 1996).

Después de 2 a 3 semanas de la infección primaria, las micobacterias sobrevivientes en los macrófagos quedan delimitadas por las lesiones típicas (granulomas) (Estrada., 2003)

La licuefacción de los centros caseosos, debida a acción enzimática sobre proteínas y lípidos, es una de las respuestas más nocivas de la enfermedad. El medio es ideal para la proliferación exponencial de la micobacteria. Las paredes del bronquio se necrosan y se rompen vertiendo su contenido hacia las vías aéreas alcanzando otras partes del pulmón dando origen a la lesión macroscópica, referida como tubérculo. (Díaz., 2000). De inicio se aprecian lesiones amarillentas, discretas, necrosis caseosa y calcificación. Con el tiempo las lesiones se encapsulan. Pueden coalescer formando grandes áreas de bronconeumonía caseosa. La imagen histológica es clásica de una lesión granulomatosa, el centro del granuloma inicial presenta células epiteloides y células gigantes y la periferia se compone de linfocitos organizados y células plasmáticas. Con el tiempo se produce una necrosis central y fibrosis periférica (Trigo, 1998).

TECNICAS PARA ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEINAS

17. SDS-PAGE (*Poliacrilamide Gel Electrophoresis*) y Western Blot.

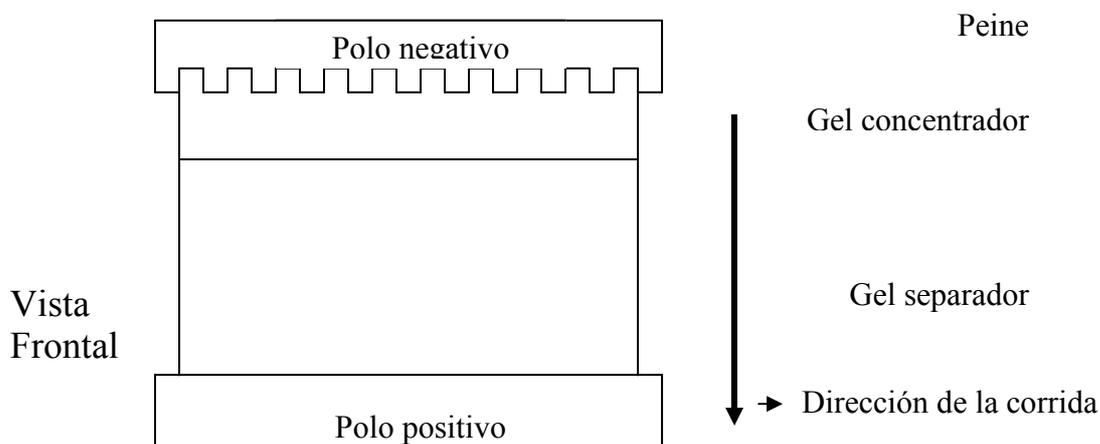
Desde los pioneros de la separación de proteínas séricas humanas , albúmina, globulinas α - β - γ - llevado a cabo por Tiselius en 1937, la separación electroforética de moléculas biológicamente activas ha sido una técnica esencial en la investigación biomédica. Hoy en día, la electroforesis en gel es, sin duda alguna, la técnica analítica mas poderosa en uso. La electroforesis proporciona un método de análisis simultaneo de diversas muestras o el análisis de múltiples componentes de una sola muestra.

17.1 Gel de Poliacrilamida.

Como será evidente, la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, del inglés *polyacrilamide gel electrophoresis*) es un procedimiento eje en la caracterización de proteínas en el sentido de la investigación analítica de la estructura y composición de las proteínas blanco llevado a cabo, antes y después de la separación de mezclas complejas de macromoléculas por PAGE. Esta técnica permite la separación de proteínas, por su tamaño, basada en el principio de tamizado molecular, a través de los poros del gel. El tamaño del poro del gel es directamente proporcional a la concentración de acrilamida.

Una enorme cantidad de información puede ser obtenida a través del PAGE. Determinación de peso molecular, pureza de la proteína, subunidades estructurales, actividad enzimática y secuencias de aminoácidos son solo algunos puntos que pueden ser estudiadas por esta tecnología.

El sistema electroforético mas ampliamente usado es el denominado discontinuo, descrito por Leammeli U. K. (1970), donde un gel sin restricción en el tamaño del poro, llamado gel concentrador (stacking gel) es colocado sobre el gel donde correrán las muestras, llamado gel separador (Dibujo 1).



Dibujo 1- esquema del sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida descrito por Leammeli.

El gel se forma en tiras rectangulares de 1-1.5 mm de grosor. La ventaja de esta forma es que se pueden correr de 10 a 20 muestras simultáneamente, bajo las mismas condiciones, lo cual valida la comparación entre ellas.

La mezcla de acrilamida y bis acrilamida forma una red entrecruzada cuando se le adiciona Persulfato de amonio (APS) como agente polimerizante. La adición de N, N, N', N'-tetrametil-diamina (TEMED) acelera la polimerización.

El gel separador consistente usualmente del 5% al 20% de acrilamida se hace con un buffer a pH 8.8, es en este donde las proteínas se separaran. El gel separador se monta primero. Subsecuentemente, la segunda capa de acrilamida, gel concentrador, con una baja concentración de acrilamida, del 3-5% con un buffer de pH 6.8, es colocado sobre el gel separador. Inmediatamente se coloca un peine para formar los posos donde se colocarán las muestras.

Las muestras se mezclan con un buffer de muestra, que contiene duodecil sulfato de sodio SDS y se calientan a ebullición por 2-5min. El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y se une a las moléculas enrolladas. El SDS ligado envuelve a la proteína y le confiere una carga neta negativa lo cual hará que en un campo eléctrico la diferencia de migración sea en función de su peso molecular.

Las subunidades de una proteína, unidas por enlaces disulfuro, se desnaturalizan antes de la electroforesis por calentamiento en presencia de un agente reductor como el 2-mercaptoetanol (2-ME), el cual reduce los enlaces disulfuro en grupos sulfidrilos libres. Cuando se incluye 2-ME al buffer de muestra, se dice que las muestras están en condiciones reductoras.

Se adiciona azul de bromofenol, colorante de bajo peso molecular sensible al pH, como marcador de corrida. Esto permite que la progresión de la electroforesis pueda ser monitoreada. La corrida se detiene cuando la marca alcanza un punto a 1cm de que se termine el gel.

18. Transferencia de Proteínas. Western blot.

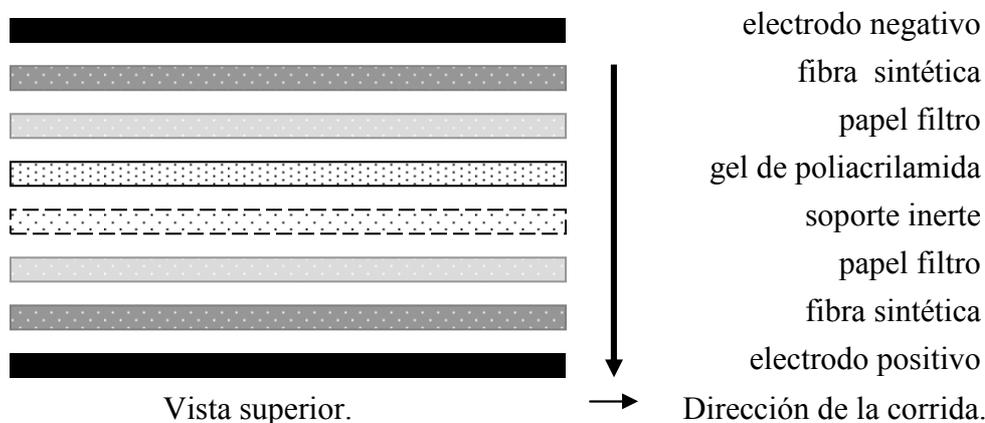
Esta técnica de transferencia es usada en un estudio simultáneo de proteínas, revelándose con anticuerpos específicos. En un principio, esta técnica fue desarrollada por E. M. Southern. Este tomó las ventajas ya conocidas del DNA para unirse en estados desnaturalizantes a nitrocelulosa.

En los 1970's se comprobó que el RNA no se puede unir a membranas de nitrocelulosa, pero G. R. Stark y colaboradores idearon un método alternativo, empleando "diazopapel" para unir covalentemente el RNA o DNA. El siguiente paso fue usar el mismo principio para el estudio de proteínas. El término "Western" es un nombre derivado de otros, acuñados como "Northern" blot (unión de RNA al soporte) y "Southern" blot (unión de DNA al soporte).

Hoy en día, los blots son aplicados sobre membranas y no en derivados de papel. El rango de detección de estos métodos es considerablemente más grande que los anteriores, lo cual la hace una técnica flexible y poderosa.

Este método se usa para la detección inmunológica de las proteínas transferidas desde un PAGE a un soporte inerte por medio de una corriente eléctrica. La nitrocelulosa fue el primer soporte usado. Después, los fabricantes ofrecieron una variedad de medios de soporte. La interacción de las proteínas con la nitrocelulosa se debe principalmente a fuerzas hidrofóbicas, y así, se creó una nueva membrana, extremadamente hidrofóbica, de polivinilidato difluoruro (PVDF) con gran capacidad y propiedades de absorción.

Para esta técnica se usa el aparato esquematizado a continuación.



Dibujo 2- esquema del orden para el armado del "sándwich" usado en la transferencia de proteínas.

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, se trata el papel con una solución de bloqueo, albúmina sérica bovina (BSA) y leche en polvo descremada, para evitar que los anticuerpos usados a continuación se fijen inespecíficamente al soporte.

Al papel bloqueado se le agrega una solución del anticuerpo específico contra las proteínas que se quieren identificar, se lava y se agrega un segundo anticuerpo contra el primero (por ejemplo: cabra Anti-bovino, cabra Anti-conejo, etc). Este segundo anticuerpo debe estar marcado con algún sistema que sea fácilmente detectable, lo mas utilizado es la marcación con fosfatasa alcalina o peroxidasa. Se deja incubando por tiempo determinado, se lava y revela con el sustrato correspondiente.

Una vez realizado el revelado, se ponen de manifiesto todas aquellas bandas de proteínas a las que se unió el primer anticuerpo.

19. OBJETIVO GENERAL

Que los alumnos del programa de servicio social titulación de Producción Bovina adquieran experiencia y conocimiento de nuevas técnicas de laboratorio encaminadas a preservar la salud de los bovinos y a mejorar el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

19.1 OBJETIVO ACADEMICO

Conocer y aplicar nuevas técnicas de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades como la tuberculosis bovina (TB). Poner en práctica los conocimientos adquiridos durante la licenciatura en las asignaturas de Zootecnia de bovinos productores de leche, Inmunología veterinaria, microbiología y clínica de bovinos.

19.2 OBJETIVO SOCIAL

Elaborar y estandarizar nuevos métodos y técnicas de diagnóstico de enfermedades de importancia, para la producción animal y salud humana. Un método basado en la identificación de anticuerpos específicos podría ser de utilidad para mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico serológico de la tuberculosis bovina para implementar una prueba alternativa con fines de erradicación.

19.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Formación de un banco de muestras a partir de 24 animales en experimentación desafiados con una cepa patógena de *Mycobacterium bovis*.
2. Obtención de un extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de *Mycobacterium bovis* AN5.
3. Estandarización de la técnica de Western Blot para la separación e identificación de antígenos específicos de M Boris.

Material y métodos.

Protocolos extraídos de: Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques (Ian M. Rosenberg 1996) Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel, Brent and col. 1999) e IMMUNOASSAY (Eleftherios, Diamandis y col, 1996)

20. Obtención del extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de *M. bovis*.

Características y procedencia del EPFC. Se uso la cepa *Mycobacterium bovis* AN5 cultivada a 37° C en medio líquido de Dorsett-Henley durante 6 semanas. Al final del periodo de incubación la masa bacteriana se elimino por filtración, empleando filtros de asbesto y celulosa, posteriormente filtros millipore (Millipore corp., Bedford, Mass) de 1.2, 0.45 y 0.22 µm. El proceso anterior fue realizado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONAVIVE) a petición del Dr. Fernando Díaz Otero del CENID-Microbiología , para el proyecto CONACYT D-43244-Z, y donado para esta investigación.

Las proteínas presentes en el EPFC se precipitaron con cristales de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ a una saturación final de 80%, con agitación constante a 4° C por 24 horas. Al termino de este tiempo la solución se centrífugo a 4° C por 60 minutos a 20 000 xg (Beckman rotor JS-13.1), para empaquetar el precipitado. Fue resuspendo en solución de buffer de fosfatos (PBS) pH 7.2, posteriormente se dializó exhaustivamente contra PBS, en bolsitas de diálisis (Spectra7/Por No 3787-D40) con punto de corte de 12 a 14 kDa a 4° C durante 36 horas con 4 cambios de 2 litros cada uno. Después del dializado se comprobó la ausencia de $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]$ agregando cloruro de bario. Se hicieron alicuotas en tubos eppendorf de 1.9 ml.

21. Cuantificación de proteínas. Método Bradford. (BCA protein assay kit, PIERCE-Perbio).

Para esta técnica se preparó una solución de albúmina sérica bovina (BSA) 1.6 mg en 1 ml agua mili Q. Buffer de lisis RIPA: TRIS (50 mM) 1.51 gr; NaCl (50 mM) 2.19 gr; Nonidet P40 (1 %) 2.5 ml; deoxicolato de sodio (0.5 %) 1.25 gr; SDS (0.1 %) 25 gr y 250 ml agua mili Q. RIPA diluido 5 veces en agua mili Q de 1:5 para el blanco.

Las muestras se diluyeron 1:5 en agua mili Q. 5 µl de muestra en 20 µl de agua.

En un plato de 96 pozos se diseño la curva de titulación de albúmina con las siguientes concentraciones (mg/ml): 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025.

Se colocaron 5 µl de muestra por pozo, por triplicado, igual con la curva y el blanco.

El kit consta de 3 reactivos denominados “A”, “B” y “S”. Los reactivos A y S se mezclan para formar la solución A’, a razón de 20 µl de S por 1000 µl de A.

Se agregó 20 µl de A’ por pozo, mezclando bien por pipeteo. Al momento poner el reactivo B, 200 µl por pozo con pipeta multicanal, mezclando por pipeteo y dejando incubar por 10 minutos, apartado de la luz.

La lectura de la placa se hizo en un espectrofotómetro a 630 nm.

22. Electroforesis en gel de Poliacrilamida. SDS-PAGE.

22.1 Armado del gel.

Se ensambla el stand de armado para geles de poliacrilamida, según las instrucciones del proveedor (Mini Protean 3 cell, Bio-Rad). Se llena el molde con alcohol para verificar que este completamente sellado y no escapara el gel. Se decanta el alcohol y se deja secar perfectamente.

Gel separador al 10% (separating gel). El gel inferior se preparo mezclando agua mili Q, 4.02 ml; buffer pH 8.8. 2.5 ml; acrilamida-bisacrilamida 3.33 ml; SDS 10 %, 100 µl; APS 10 %, 100 µl y TEMED, 10 µl.

Este gel se vierte primero en el molde. Se prepara al instante que se va usar, Al verter el gel se le coloca una ligera capa de alcohol etílico al 70% encima para eliminar las burbujas que se puedan formar en la superficie y quede nivelada. Se deja gelificar por 15 minutos o más. Se retira el alcohol decantando el molde y se deja secar unos segundos.

Gel concentrador al 4 % (stacking gel). El gel separador se preparo con agua mili Q, 6.1 ml; buffer pH 6.8, 2.5ml ; acrilamida-bisacrilamida, 1.33ml; SDS 10 %, 100µl; APS 10%, 100µl y TEMED, 10µl.

La preparación se vierte hasta que se derrama un poco, inmediatamente se coloca el peine con cuidado de no formar burbujas por debajo de este. Se deja gelificar por 30 minutos.

Como el APS y el TEMED son los encargados de realizar la polimerización de la acrilamida-bisacrilamida se deben agregar al último, justo antes de usarse, ya que la reacción empieza al instante.

22.2 Electroforesis.

Se retira el peine lentamente y de manera vertical. Se toma el gel sin retirarlo del molde, se lavan los pozos con agua mili Q y se montan en el cartucho de la cámara de corrida (seguir instrucciones del proveedor). El cartucho tiene dos cables finos, uno pasa por debajo (polo positivo) y otro por arriba (polo negativo). La tapa debe colocarse corroborando que los electrodos coincidan con los polos.

22.3 Preparación de la muestra y carga en el gel.

el EPFC se mezcla con buffer de muestra 4X en una proporción 3:1 en un tubo eppendorf de 1.9 ml. Esta mezcla se debe calentar a baño maría por 5min.

Una vez montada la cámara de corrida y se llena de buffer de corrida 1X nuevo (capacidad aprox. 300 ml) se verifica que no tenga fugas de líquido. Se llena la cámara externa con buffer de corrida 1X, de preferencia nuevo.

Se coloca la muestra con una micropipeta. Si algún poso no lleva muestra se debe llenar con buffer de muestra únicamente.

En el primer carril se carga un marcador de pesos (Blue Ranger Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix, PIERCE-PERBIO) que servirá como referencia.

Se tapa la cámara de electroforesis y se conecta a la fuente de poder. El gel superior se corre a 80-90 V hasta que llegue al inicio del gel inferior. El gel inferior se corre a 110-120V.

Una vez terminada la corrida, se desarma la cámara de corrida y el gel se retira del molde con una espátula y se elimina el gel concentrador. El gel separador se desprende haciendo unos cortes laterales.

El gel puede usarse para transferencia de proteínas o teñirse con azul de Coomassie.

22.4 Tinción con azul de coomassie.

Después de desprender el gel se sumerge en azul de coomassie al 0.1 %, puede ser usado, por 20 minutos. Luego se decolora con destañidor de coomassie haciendo varios cambios. Se puede colocar junto al gel un papel suave doblado para que absorba el coomassie y economizar destañidor. El tiempo del destañidor es subjetivo, hasta que el gel quede lo mas transparente y las bandas se vean lo mejor posible.

23. Western blot.

Para la electrotransferencia se toma el gel ya desmontado y se pone a equilibrar en buffer de transferencia 1X por 10 minutos.

Se corta un trozo de membrana PVDF del mismo tamaño del gel y también se equilibra en buffer de transferencia 1X. La membrana se introduce en el buffer en un ángulo de 45° para que flote en la superficie y que la cara que contiene las proteínas no toque el buffer. Una vez que el papel se ha hidratado se sumerge por una esquina.

Se cortan dos rectángulos de fibra sintética y dos de papel filtro.

23.1 Montaje de la cámara de transferencia (mini- transblot cell, Bio-Rad).

Todo el proceso debe realizarse en un recipiente con buffer de transferencia.

Se coloca la cara oscura del cartucho (polo negativo) sobre la superficie del recipiente. Después, en estricto orden (ver dibujo 2) se colocan las capas de la manera siguiente: cara oscura, una fibra sintética, un papel filtro, gel, membrana PVDF, otro papel filtro, otra fibra sintética y se tapa con la cara clara (polo positivo) presionando para poner el broche.

Es importante que al poner la membrana PVDF sobre el gel no queden burbujas. Estas se pueden retirar levantando un extremo de la membrana PVDF y después bajarla, con cuidado de no moverla de lugar, para que las burbujas se retiren a las orillas. La membrana nunca se debe tocar con las manos, es recomendable usar guantes y unas pinzas.

Se pone el cartucho dentro de la cámara de transferencia y se llena con buffer de transferencia. Se coloca la tapa (tomando en cuenta los polos) y se conecta a la fuente de poder. Se transfiere a 100 V por 1.5 horas, o bien toda la noche a 30 V.

Este proceso produce mucho calor y por los materiales usados es difícil disiparlo por lo cual, se introduce un contenedor hermético con agua congelada en la cámara, y se introduce un imán agitador (mosca) para colocar todo el sistema sobre una platina giratoria y mantener baja la temperatura del buffer.

23.2 Bloqueo de la membrana.

Acabada la transferencia se saca la membrana y se le hace un corte de referencia para saber en que cara se encuentran las proteínas (cara que estuvo en contacto con el gel) y se pone a bloquear en solución de bloqueo toda la noche a 4° C y en un shacker.

Después del bloqueo se corta la membrana en tiras delgadas según el peine que se halla usado y se conservan entre dos papeles filtro secos y dentro de un sobre de aluminio a 4° C hasta por 1 mes.

23.3 Revelado del blot.

Para identificar los antígenos específicos del EPFC de *M. bovis* se incubaron las tiras con Anti-*M. bovis* de conejo conjugado con peroxidasa (preoxidase-conjugated rabbit Anti-*Micobacterium bovis* BCG. DAKOPATTS.) diluido en solución “A” incubando 3 horas. Se lavaron con TBS 1X y se revelaron por quimioluminiscencia .

Para la identificación de los anticuerpos específicos de los sueros de los animales infectados, se incubaron las tiras con los sueros problema diluidos en solución “A” y se incubaron toda la noche. Se sacaron y lavaron con TBS 1X por 5 minutos, cuatro veces. Las tiras se incubaron nuevamente con el anticuerpo primario Anti-bovino de cabra o de conejo diluido en solución “A”. Se incubaron por 1.5 horas. Se lavaron nuevamente las tiras con TBS 1X por 5 minutos, 4 veces. Por último se incubaron con el antígeno secundario marcado con peroxidasa Anti-cabra o Anti-conejo, diluido también en solución “A”, por 1.5 horas y se lavaron nuevamente con TBS 1X 5 minutos, cuatro veces.

23.4 Kit de quimioluminiscencia y revelado de las placas radiográficas.

El kit consta de dos agentes líquidos. Se mezclan a partes iguales para activar el reactivo. Colocar 250 µl de reactivo por tira del kit de quimioluminiscencia (PIERCE). Este químico se reacciona químicamente con la peroxidasa del anticuerpo secundario, la reacción resulta en una luminiscencia a la cual es sensible la placa. Se deja en el reactivo 2 ó 3 min. Se retira y tomándolo por un extremo se escurre el exceso de químico.

Se colocan las tiras entre dos acetatos para su protección y se exponen directamente a la placa radiográfica (Kodak) encerrándolas en un cassette de revelado. El tiempo de exposición es variante dependiendo de la intensidad de la reacción quimioluminiscente, puede ir de un par de segundos hasta varios minutos.

La placa se revela con un líquido “revelador” y otro “fijador” (PIERCE). Primero se introduce la placa sensibilizada en el revelador, El tiempo de revelado dependerá del juicio del investigador. Se lava la placa en agua destilada y se sumerge en el fijador Se lava una vez más.

24. Obtención y procesamiento de muestras. Formación del banco de muestras

24.1 Material

Elaboración de pequeños sobres individuales de aluminio nuevo estéril, para prevenir contaminaciones, uno por cada muestra de tejido de las 24 vacas muestreadas. Elaboración de la solución de Hanks para la conservación de los macrófagos. Compuesto de Hanks 5 g y 35 mg de bicarbonato de sodio a pH 7.0 aforado 1 lt de agua desionizada y filtrado. Se utiliza una bomba de vacío con un sistema de dos matraces como trampa para extraer la solución de los pulmones. La solución de Hanks debe estar en refrigeración todo el tiempo.

Tubos colectores de sangre con EDTA, Heparina y sin anticoagulante (S-MONOVETTE marca SARSTEDT y VACUTAINER).

24. Las muestras fueron tomadas de un conjunto de animales pertenecientes al proyecto CONACYT D46244-Z, del cual es responsable el es responsable Dr. Fernando Díaz Otero.

24.2 La recolección de muestras se realizó según la disposición de los sacrificios. Estos se llevaron a efecto siguiendo la logística que los tutores del proyecto dispusieron.

Los sacrificios se realizaron con las siguientes fechas:

19 abril 2004	Vacas # 1	03 junio 2004	Vacas # 6,13,14,19 y 20
21 abril 2004	Vacas # 3,7,10 y 24	10 junio 2004	Vacas # 2,4,9 y 11
27 abril 2004	Vacas # 12,16,17,22 y 23	17 junio 2004	Vacas # 8,15,21 y 25

Nota: las vacas # 5 y 18 murieron de neumonía.

24.2.1 Las muestras de sangre se recolectaron en las instalaciones donde se estabularon los animales.

24.2.2 Para las muestras de tejido se acudió a los sacrificios, tomando las siguientes muestras seleccionadas; adrenales, bazo, corazón, glándula mamaria, hígado, linfonodo mediastínico, submandibular, traqueobronquial y retrofaríngeo, pulmón, riñón, parótida y timo. Se identificaron debidamente. Las muestras son cortadas con navajas de bisturí nuevas e individuales, para evitar contaminación con células de otros tejidos. Se mantuvieron en hielo para conservar la integridad del RNA, que es muy inestable.

24.2.3 Los lavados pulmonares se hicieron en el lugar de los sacrificios. Se puso especial cuidado en el proceso de desangrado vigilando que no se dañará la integridad de los pulmones o que los animales bronco-aspiraran, por que el ingreso de sangre a las vías aéreas contaminaría el área, volviendo los lavados inservibles. Los pulmones se cargan por la porción de traquea que aun tenga, vertiendo 500 ml de la solución de Hanks por pulmón, en 3 ó 4 intentos. Se masajearon los pulmones para favorecer el desprendimiento de los macrófagos y se retiró el líquido con el sistema de vacío, embotellándolo en matraces individuales con tapón y conservándolos en hielo.

24.3 Procesamiento de las muestras.

El procesamiento de las muestras se realizaba al tiempo que estas se iban tomando.

24.3.1 Las muestras de tejido se congelaron en nitrógeno y se almacenaron a -70° C en cuanto llegaron al laboratorio. En los días siguientes se fueron sacando muestra por

muestra y, sin descongelar, se cortaron en pequeños trozos (aproximadamente $\frac{1}{2}$ cm) con navajas de bisturí, una por muestra, sobre láminas de cristal, las cuales se limpiaban con alcohol cada vez. Después de cortadas se guardaron en criotubos de 2 ml de capacidad, se rotularon, se congelaron en nitrógeno y se almacenaron a -70° C para su conservación.

24.3.2 Los lavados pulmonares se procesaron el mismo día de su toma. Se vertió el líquido muestra de cada vaca en tubos Falcon de 50 ml hasta llenar cada uno de ellos (aproximadamente 10 tubos por lavado), se identificaron y centrifugaron a 3500 rpm en una centrífuga en frío por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante de cada tubo en un recipiente con hipoclorito de sodio para inactivarlo. El sedimento de cada tubo se puso en un tubo eppendorf de 1.9 ml y se resuspendió la mitad de las muestras, en 1 ml de suero fetal bovino tratado con DOMOSO (dimetil sulfóxido) al 0.1 % para preservar las células, y la otra mitad, en 1 ml de trizol. Se congelaron en nitrógeno y se almacenaron a -70° C.

Todo el proceso se realizó sin romper la cadena de frío para preservar la integridad celular.

24.3.3 Las muestras de sangre sin anticoagulante se dejaron a temperatura ambiente por una noche, se extrajo el coagulo y se centrifugó a 2000rpm por 3min. El suero se dividió en varias alícuotas en tubos eppendorf de 1.9 ml y se almacenó a -20° C.

Las muestras con heparina se centrifugaron a 2000rpm por 10min. Separando el plasma alícuotando y almacenando a -20° C.

24.3.4 Las muestras con EDTA se procesaron para su futura extracción de RNA. tomando 7 ml de sangre con EDTA y depositándola en un tubo Falcon de 50 ml. Se agregó 7 ml de agua mili Q estéril, reconstituyendo la osmolaridad con 14 ml de PBS 2X. Se homogenizó suavemente. Se centrifugó a 2500 rpm por 8 min. Se decantó y lavó el pellet 3 veces con PBS 1X, centrifugando entre cada lavado a 3000 rpm por 5 minutos.

Al tubo decantado se le agregó 1, 2 ó 3 ml de trizol según el tamaño del pellet. Resuspendiendo perfectamente y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1.9 ml. Se congelaron en nitrógeno y almacenaron a -70° C.

Todo el proceso debe realizarse con guantes libres de polvo y cubrebocas dentro de una cámara de extracción de aire forzado, conservando la cadena de frío

24.3.5 Al terminar el procesamiento de las muestras, fragmentos cortados se pusieron en criotubos nuevos, se rotularon y guardaron en un tanque de nitrógeno para ser llevadas al laboratorio de Inmunología en el edificio de Ciencias Biomédicas de la UNAM, a cargo del Dr. Raúl Mancilla, donde se facilitó el equipo para realizar la homogenización.

24.4 Homogenización de las muestras de tejido. Cada muestra se homogenizó en un tubo Falcon de 50 ml. Aproximadamente 100 mg de tejido en 2 ml de Trizol. El homogenizador se lavaba cada vez, con una solución de Dextran, enjuagándose con agua destilada y secándose con alcohol, para evitar contaminación con la muestra anterior.

El homogenizado se paso a tubos Eppendorf de 2.5ml y se almacenó a -70° C hasta la extracción de RNA.

25. Resultados

Se utilizaron dos diferentes EFPC obtenidos en diferentes fechas. Abajo se muestra la cuantificación de estos extractos.

Cuantificación del EPFC (1) de *M. bovis*.

curva de BSA								bco muestra	
mg/ml	1.60	0.80	0.40	0.20	0.10	0.05	0.025		
D. O.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.246	0.159	0.107	0.066	0.065	0.055	0.055	0.061	0.082
B	0.201	0.126	0.090	0.069	0.067	0.052	0.055	0.051	0.095
C	0.205	0.123	0.092	0.064	0.058	0.540	0.051	0.051	0.086
PROMEDIOS									
	0.2173	0.136	0.0963	0.066	0.0633	0.2157	0.0537	0.0543	
									0.0877

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (mg/ml)	X		0.364
-------------------------------------	---	--	--------------

Tabla 1. Resultados de la lectura de densidad óptica a una longitud de onda de 640 nm.

La concentración relativa del EPFC (1) es de 364 μ g de antígeno proteico por cada ml de filtrado de cultivo.

El EPFC (1) se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. 1).

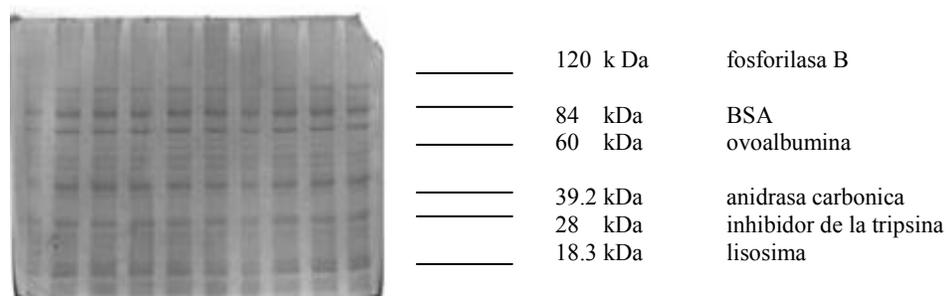


Figura 1. Corrimiento del EPFC (1) de *M. bovis* en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y teñido con Azul de Coomassie.

Se observó un bandeo definido en el área comprendida entre los 120-84 kDa. Otras 2 bandas aparecen por encima y por debajo de los 39.2 kDa. Se aprecia un banda barrida debajo de los 18 kDa. En general el, bandeo, que demuestra la presencia de proteínas, se ve definido y abundante, con un total de 10 bandas apreciables.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron por la técnica de Western Blot. Se incubaron 4 tiras (2 con EPFC de *M. bovis* y 2 de *M. avium*) con un suero de conejo anti- *M. bovis* HRP (marcado con peroxidasa) (DAKOPPATS) diluido en proporción 1:250 y 1:500 (Fig. 2).

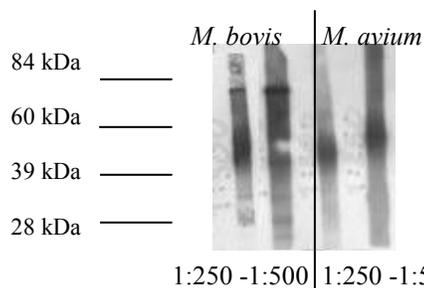


Figura 2. Reconocimiento de antígenos presentes en EPFC (1) de *M. bovis* y EPFC de *M. avium* por suero de conejo anti *M. bovis*.

Las dos tiras de *M. bovis* dan bandeado. Una banda resalta primeramente por los 84 kDa y se aprecia bien 3 bandas por debajo de los 39 kDa, presumiblemente, en los 28 y 18 kDa. Aparece una señal difusa, “background”, al centro aproximadamente en los 60 kDa. Para las tiras de *M. avium*, se ve una señal difusa en la región central, entre los 60 y 39 kDa.

Se incubaron dos tiras (Fig. 3) con anti-*M. bovis* HRP aumentando las diluciones a 1:750 y 1:1000.

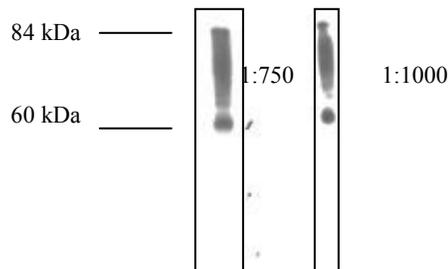


Figura 3

En la dilución 1:750 se ven 2 señales. Bandas poco definidas disfrazadas a lo largo de la tira desde los 84 kDa a 60 kDa. La dilución 1:1000 muestra el mismo patrón pero más ligero. El fondo esconde las bandas, solo las cercanas a los parámetros mencionados resaltan ligeramente.

5 tiras con antígeno (Fig. 4) de *M. bovis* incubados con anti-*M. bovis* HRP con las siguientes diluciones; (A) 1:200; (B) 1:1,000; (C) 1:5,000; (D) 1:10,000 y (no aparece) 1:20,000.

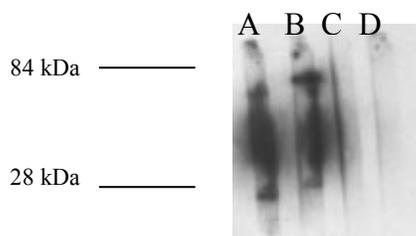


Figura 4.

Solo en las tiras A y B se detectan bandas de proteínas, del mismo patrón, una se muestra por arriba de los 84 kDa y la otra a la altura de los 28 kDa. Las diluciones 1:5,000, 1:10,000 y 1:20,000 no dan señal.

Para tratar de lograr mejor definición de los antígenos reconocidos por el suero anti *M. bovis* se preparó un nuevo EPFC (2) de *M. bovis* con las mismas características, y se a analizó por electroforesis (Fig. 5) para comprobar la integridad de las proteínas.

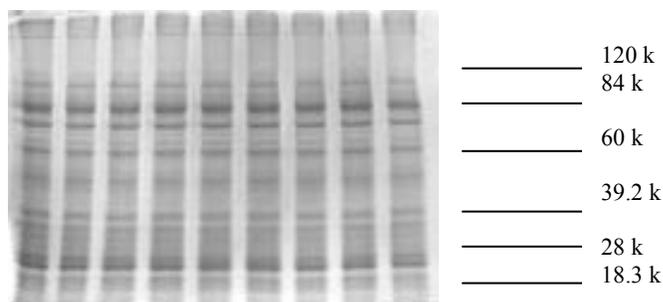


Figura 5. Gel de poliacrilamida del EPFC (2) de *M. bovis* nuevo teñido con Coomassie.

Las bandas de proteínas son muy claras y los segmentos mas pequeños están bien definidos. En general el patrón muestra proteínas no degradadas en un numero de 11 bandas entre los 84-18.3 kDa.

Comparación de los dos gels de EPFC de *M. bovis*, anterior y nuevo, teñidos con coomassie (Fig. 6).

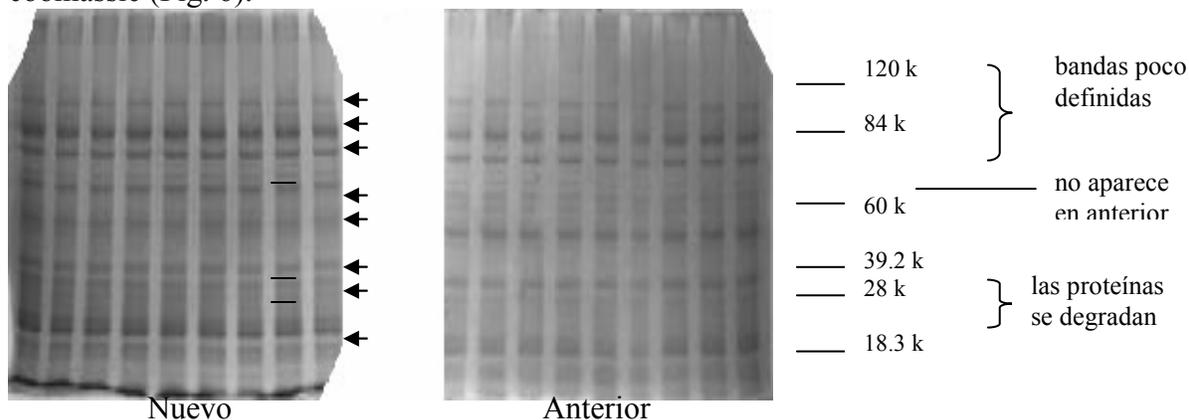


Figura 6. Comparación del EPFC nuevo y anterior. Las flechas y las líneas señalan la posición del bandeo.

Aunque el EPFC “anterior” conserva un patrón claro, las proteínas del antígeno nuevo esta en mejor estado. Una banda en el área entre los 84 y 60 kDa ya no aparece en el gel del antígeno anterior. Las bandas mas pesadas están mejor definidas en el nuevo y las proteínas por debajo de los 39.2 kDa. De este punto se resolvió sustituir el anterior EPFC (1) de *M. bovis* por el EPFC (2) de *M. bovis* nuevo buscando una mejor resolución y eliminar el background que hasta el momento se ha venido presentando.

(Tabla 2) Cuantificación del nuevo EPFC (2) de *M. bovis*

mg/ml	2.0	1.5	1.0	0.75	0.5	0.25	0.125	0.025	bco	muestra
D. O.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2.038	1.578	1.223	1.022	0.752	0.488	0.300	0.207	0.104	0.361
B	2.057	1.555	1.227	0.956	0.673	0.406	0.305	0.207	0.117	0.336
C	2.097	1.850	1.460	1.065	0.832	0.458	0.308	0.208	0.110	0.441

PROMEDIOS

CURVA	2.064	1.661	1.3033	1.014	0.7523	0.4507	0.3043	0.2073	0.1103	
muestra										0.3793

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (mg/ml)	X									0.2104
-------------------------------------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------

En este EPFC de *M. bovis* la concentración relativa de proteínas es menor a la del EPFC anteriormente utilizado. Sin embargo, en la comparación de los geles (Fig. 6) este EPFC nuevo resulta de mejor calidad.

7 tiras incubadas (Fig. 7) con Anti- *M. bovis* HRP (DAKOPPATS) diluciones (a)1:500, (b)1:1000, (c)1:1500, (d)1:2000, (e)1:2500 y dos tiras extras con anticuerpo de las mismas características y marca, proporcionado por otro laboratorio en diluciones (f)1:500 y (g)1:1000.

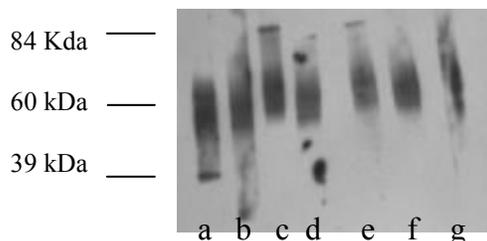
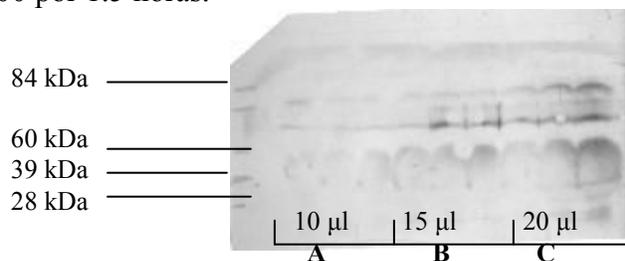


Figura 7.

Todas las bandas dieron un barrido en la zona de los 60 kDa ninguna banda es apreciable en esa zona. La tira (a) tiene una banda definida en los 39 kDa y en las tiras (c), (d) y (e) salta una banda por arriba de los 84 kDa. Las dos tiras del anticuerpo que se estaba probando no dieron ninguna señal salvo el barrido en la zona central.

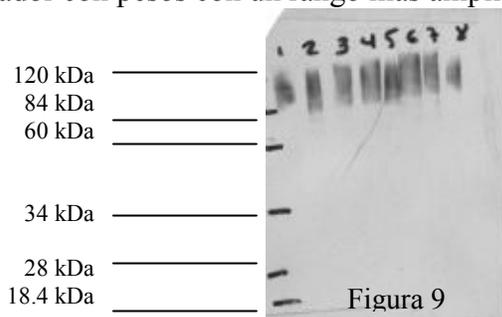
Gel de poliacrilamida de 10 pozos, no se cortó la membrana. La concentración del antígeno se varió en 10 μ l, 15 μ l y 20 μ l por pozo (Fig. 8). La membrana completa se hibridó de la siguiente forma: incubación con suero problema # 6, diluido 1:50. anticuerpo primario: Anti-Ig bovino de cabra dilución 1:5000 por 1.5 horas. anticuerpo secundario: Anti-cabra HRP 1:10,000 por 1.5 horas.



Figur 8. Comparación de distintas concentraciones de antígeno.

Se presento un ligero bandeo del lado derecho de la placa en la zona de 84 kDa y en los 60 kDa. Es evidente que a mayor concentración total de antígeno por pozo la señal se aprecia con mayor claridad.

Gel al 10% con EPFC -*M. bovis* sin desnaturalizar (Fig. 9), transferido a membrana PVDF. Incubado con suero problema diluido 1:50. Anticuerpo primario: Anti-Ig de bovino de cabra diluido 1:5000. Anticuerpo secundario: Anti-cabra HRP 1::10 000. Se uso un marcador con pesos con un rango más amplio.



La señal se situó en la zona superior fuera de rango. Esto demuestra la importancia de desnaturalizar el antígeno antes de correrlo en el gel. La razón de este experimento fue comprobar que el paso de desnaturalización no fuera la razón por la cual aparece el background. Las proteínas no corrieron porque su estructura globular no les permitió realizar el recorrido.

Gel de poliacrilamida con el EPFC-*M. bovis* desnaturalizado a 65° C. Incubación de 3 tiras con Anti-*M. bovis* HRP (DAKOPPATS) diluido 1:100, 1:200 y 1:300 (Fig. 10).

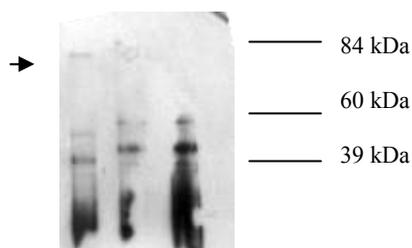


Figura 10. la cabeza de flecha muestra la señal tenue de la primera tira en los 84 kDa.

De izquierda a derecha; la primera tira da una pequeña señal en los 84 kDa, las tres diluciones muestran un patrón de dos proteínas en la zona de los 60 kDa. Exceso de químico revelador disfraza las bandas por debajo de los 39 kDa.

Hibridación de 4 tiras con distintos Anti-*M. bovis* (Fig. 11). Las tiras se incubaron de la siguiente manera:

1. anti- *M. bovis* HRP (DAKOPPATS) 1:50 ----- solo suero.
2. anti- *M. bovis* de conejo 1:1000 ----- anti-conejo HRP 1:4000
3. anti- *M. bovis* de conejo 1:2000 ----- anti-conejo HRP 1:4000
4. anti- *M. bovis* (DAKOPPATS) 1:500 ----- anti-conejo HRP 1:4000

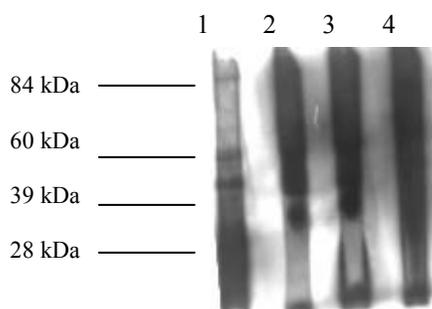


Figura 11. incubación de 4 tiras con distintos anticuerpos contra antígenos de *M. bovis*.

La tira 1 da una banda en los 84 kDa y dos mas en los 60 kDa y por de bajo de este rango. En las otras tiras el fondo es demasiado oscuro como para identificar alguna banda.

En resumen: los geles teñidos comprobaron el buen estado del EPFC y la integridad de las proteínas contenidas en estos. En general se define un patrón en todos los experimentos; una banda superior por debajo de los 120 kDa dos bandas centrales en el área de los 60 a los 39 kDa y una banda, no apreciable en todos los casos, cerca de los 28 kDa. Esta constante demuestra la presencia de antígenos específicos en el EPFC- *M. bovis* que se ha usado para los anticuerpos contenidos en el producto comercial (Preoxidase-conjugated rabbit anti- *Mycobacterium bovis* BCG, DAKOPATTS) con que se incubaron las proteínas. Los resultados obtenidos en las incubaciones de las tiras con los sueros provenientes de animales problema, no

26. DISCUSIÓN.

El avance en el estudio de la inmunidad generada por *M. bovis* en bovinos, con el fin de dar sustento adecuado a la selección de métodos de diagnóstico, permitirá poder mejorar las herramientas existentes y diseñar nuevas formas que apoyen el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina (TB). en el entendimiento del mejoramiento de la especificidad y sensibilidad de las pruebas diagnósticas aplicadas actualmente.

La concentración relativa de proteínas obtenida del EPFC de *M. bovis* por medio de la cuantificación fue muy baja (Tabla 2). Lo recomendable es que se deposite en total, 25 µg de antígeno por pozo para el gel de acrilamida y Western Blot. A la concentración que está el antígeno, no solo se puede cargar aproximadamente 6.3 µg por pozo, por lo que se recomienda elevar la concentración de proteínas mediante la extracción del medio en que están suspendidas (Buffer de fosfatos, PBS).

El bandeo en los geles teñidos con coomassie es abundante y bien definido, presentando 11 bandas distribuidas desde los 100 kDa hasta por debajo de los 18.3 kDa, lo anterior concuerda con los resultados de Díaz, 2000, que demuestra que la mejor edad de cultivo para obtener el mayor número de bandas, es de 6 semanas, en donde se encontraron de 12 a 16 bandas entre los 100 y 12 kDa, para geles teñidos con Coomassie. Espitia y col., 1991, comprobaron que en los filtrados de cultivo de 6 a 8 semanas de edad se observó un mayor número de bandas, y que en cultivos más jóvenes o más viejos no aparecen dos bandas, de 65 y 63 kDa.

Resalta el hecho de que en este estudio no se identificaron bandas por debajo de los 18.3 kDa. Como el Extracto Proteico de Filtrado de Cultivo usado en el presente estudio se dializó con tubos de diálisis con punto corte de 12 a 14 kDa, existe la posibilidad de que las proteínas de bajo peso molecular, incluyendo el ESAT-6, se perdieran, resultado similar al encontrado por Jordar y col., 2003.

27. CONCLUSIÓN

La dilución ideal del Anti- *M. bovis* HRP (DAKOPATTS) no se estableció. Los demás anticuerpos usados (Anti-Ig bovino de cabra y conejo, Anti-cabra y Anti-conejo) fueron obtenidos mediante un proceso de purificación de anticuerpos de suero de animales, por lo que su dilución óptima a utilizarse no estaba definida, y se convirtió en una variante más. De la misma manera la dilución de los sueros de los animales problema debe precisarse, si es necesario individualmente.

La estandarización de la técnica de Western blot para su uso en la investigación de la TB y su aplicación como análisis de apoyo en el control y erradicación de la TB, precede a la automatización de la técnica que implica la simplificación del proceso, reducción del tiempo de aplicación, costo, y lo mas importante, la disponibilidad de esta tecnología en laboratorios comerciales para su uso y explotación al servicio del público en general y en bienestar de la ganadería nacional, y por lo tanto, en la economía de nuestro País.

Aunque los resultados obtenidos no son concluyentes, el incluir pruebas serológicas en el programa de control y erradicación de la tuberculosis bovina puede ser de utilidad, debido a que las pruebas basadas en la respuesta inmune mediada por células, como la prueba de tuberculina, puede dar resultados falsos positivos o negativos en animales con

estados avanzados de la enfermedad (lightbody 1998). Con la técnica Western blot es posible separar y reconocer antígenos individualmente y al anticuerpo específico para cada uno. Esto demuestra que tiene el potencial para diseñar una prueba diagnóstica más sensible y con mayor especificidad (Espitia 1989). En humanos, el Western Blot con suero de pacientes tuberculosos, demostró consistentemente el reconocimiento específico de los antígenos de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* por los anticuerpos contenidos en los sueros probados (Smanich 2001).

28. Bibliografía.

1. Smith S. M., Brookes R., Klein M. R., Malin A. S., Lukey P T., King A. S., Ogg. S., Hill A. S., and Dockrell M.. **Human CD8+ CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A.** The Journal of Immunology. Vol. 165 No. 12 December 2000.
2. IMEBTA. **International Meeting on the Eradication of Bovine Tuberculosis in the Americas.** Bull Pan Am Health Org 1992; 26: 279 – 281.
3. Gurria T. F. **Situación actual de la campaña contra la Tuberculosis y Brucelosis en México.** México Ganadero 1994; 385: 21 – 28.
4. Smanich K., Belisle J.T., Laal S., **Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients.** Infection and Immunity. July 2001; 69 (7): 4600 – 4609.
5. Espitia C., Cervera I., González R y Mancilla R. **A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation.** Clin. Exp. Immunol. (1989) 77, 373-377.
6. CANETB. **Manual de actualización técnica para la aprobación de médico veterinario en Tuberculosis bovina y Brucelosis.** SAGAR. Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis. (CONETB) Octubre 1998.
7. Vargas A., Figueroa M., Gamboa R.A., **Estudio preliminar sobre reacciones intradérmicas a la tuberculina en hatos lecheros de Santa Cruz de Turrialba.** Ciencias Pecuarias. Volumen X, 1, 1988.
8. Vekemans J., Lienhardt C., Sillarh J.S., Wheeler J.G., Lahai G.P., Doherty M.T., Corrah T., Andersen P., McAdam K.P., Marchant A., **Tuberculosis contact but not patients have higher Gamma interferon Responses to ESAT6 than do community controls in the Gambia.** Infection and immunity. Oct 2001; 69 (10): 6554 – 6557.
9. Neill, S. D., J. Hanna, D. P. Mackie, and D. G. Bryson. 1992 **Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tract of skin test-negative cattle.** Vet. Rec. 131:45-47.
10. Neill S.D., J. Cassidy, J. Hanna, D. P. Mackie, J. M. Pollock, A. Clemens, E. Walton, and D. G. Bryson. 1994. **Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle with an assay for bovine Interferon-gamma.** Vet. Rec. 135:134-135.
11. Lightbody K.A., Skuce R.A., Neill S.D., Pollock J.M., **Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status.** Vet. Rec. 1998 March 21; 142 (12): 295 – 300.
12. Pollock J.M., Pollock D.A., Campbell D.G., Girvin R.M., Crockard A.D., Neill S.D., Mackie D.P., **Dynamic change in circulating and antigen- responsive T-cell subpopulation post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle.** Immunology Feb 1996; 87 (2): 236 – 241.
13. Hernandez-Pando R., Oroscoe H., Sampieri A., Pavón L., Velasquillo C., Larriva-Shahd J., Alcocer J. M., and Madrid M. V. 1996. **Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis.** Immunology 89:26-33.
14. Frobisher, Martin. **Microbiología.** Salvat editores. 4ª edición. 1970.
15. Murray P. R. **Microbiología Médica.** 4ª ed. Editorial Elsevier, 2002.
16. Bwight, Hirsch, James, Maczachlan and Walker. **Veterinary microbiology.** Blackwell Publishing. 2ª ed. 2004

17. Fenton Matthew, Mary Vermeulen. **Immunopathology of tuberculosis: Role of macrophages and monocytes.** Infections and Immunity. Vol. 64 No. 3 March 1996. 683-690.
18. Chenggapa M. M. And Carter G. M. **Bacteriología y Microbiología Veterinaria.** Manual Moderno 1994.
19. Díaz Otero, Fernando, M. en C. Tesis doctoral. **Aislamiento y caracterización de antígenos inmunodominantes de *Micobacterium bovis* que estimulan linfocitos T de bovino.** Universidad Nacional Autónoma de México. 2000.
20. Ulrichs T., Peter Anding, Stevevn Porcelli, Stefan H. E. Kaufmann, and Martin E. Munk. Infection and Immunity, Oct. 2000 Vol 68, No. 10. 6073-6076.
21. Brandt L., Thomas Oettinger, Arne Holm, Ase B. Andersen, and Peter Andersen.. **Key epitopes on the ESAT 6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium bovis*.** Journal of Immunology, 1996; 157: 3527-3533.
22. Harboe Morten, Thomas Oettinger, Harold Gotten Wiher, Ida Rosenkrands, and Peter Andersen. **Evidence for occurrence of ESAT 6 protein in *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG.** Infections and Immunity Jan. 1996, Vol. 64 No. 1, 16-22.
23. Díaz O. Fernando, Leticia García Casanova, Ciro Estrada Chávez, Marco Antonio Vega López, Víctor Banda Ruíz, and Camila Arriaga Díaz. **Respuesta immune humoral de cobayos hacia componentes proteicos de micobacterias.** Téc. Pec. Méx., 2002; 40(2):157-164.
24. Quin P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J., and Leonard F. C. **Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias.** Acriba, 2002.
25. R. Stainer, J. Ingaham, M. Whellis. **Microbiología.** 2^a ed. Editorial Revieré. 1996
26. Estrada Chávez, Ciro, M. en C. Tesis doctoral. **Identificación de variantes genéticas del locus *Nramp1* (proteína de macrófagos asociada a resistencia natural) del bovino y análisis preliminar de su relación con la tuberculosis.** Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México D. F. Marzo de 2003.
27. Trigo T. Francisco J. **Patología Sistémica Veterinaria.** Tercera Edición. McGraw-Hill Interamericna. 1998.
28. Barrera L.F., Kramnik I., Skamene E. y Radzioch D. **Nitrite production by macrophages derivated from BCG-resistant and-suseptible congenics mouse strains in response to IFN γ and infection with BCG.** Immunology 84, 1994, p 457-454.
29. Abbas A. K., Lichtman A. H. y Pober J. S. **Inmunología Celular y Molecular.** McGraw-Hill Interamericana. Segunda Edición. 1995.
30. Carpenter E., Fray L. y Gormley E. **Antigen specific linphocytes enhance nitric oxide production in *Micobacterium bovis* BCG-infected bovine macropgages.** Immunology and Cell Biology 76, 1998. p 363-368.
31. Nathan C. y Shiloh M.U. Colloquium. **Reactive Oxigen and Nitrogen Intermediate in The Relationship Between Mammallians Host and Microbial Patogens.** PNAS, Agosto 1 2000, vol. 97 no. 16, p 8841-8848.
32. Jordar S. N., Ram G. C., Goswami T. K. ***Mycobacterium bovis* AN5 antigens vary in their ability to induce nitric oxide productions in blood monocytes of experimrentally infected cattle.** Vet. Immunology and Immunopathology 93(2003) 61-68.

33. Lammeli U. K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature (London) 277:680-685.
34. Ian M. Rosemberg. Protein Análisis and Purification: Benchtop Techniques. Editorial Birkhäuser. 1996.
35. F. M. Asubel, R. Brent, y R. Kingston. **Short Protocols in Molecular Biology.** 4^a ed. 1999.
36. Eleftherios P. Diamandis, Theodore K. Chritopoulos. **IMMUNOASSAY.** Academic Press. 1996.
37. C. Espitia, I. Cervera y R. Mancilla. **The antigenic structure of *Mycobacterium tuberculosis* examined by Immunoblot and ELISA. Influence of the age of the culture and of the obtaining method of composition of the antigenic extracts.** Archivo de Investigación Médica (México) 22:101, 1991.