



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL.

## ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA LA PROTEÍNA PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> DE *Mycobacterium* *tuberculosis* EN BOVINOS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIA CRISTINA PARADA COLIN

TUTOR: DRA. CLARA INES ESPITIA PINZÓN.  
COMITÉ TUTORAL: DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES  
DR. JOSE ÁNGEL GUTIERREZ PABELLO

MÉXICO, DF.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón por haberme permitido realizar este trabajo de tesis, por su asesoría y por darme la oportunidad de continuar en el camino de la investigación.

A mi comité tutorial Dr. Francisco Suárez Güemes y Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por sus enseñanzas, consejos y tiempo dedicado para mi formación.

A mis sinodales: Dra. Camila Arriaga, Dr. Fernando Díaz Otero, Dra. Clara Espitia, Dr. Francisco Suárez y Dr. José Ángel Gutiérrez por su tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A la MC Ingrid Beatriz Cohen Falquez por su ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Al MC Antonio Javier Vallecillo Maza por su ayuda en el análisis estadístico.

Al Dr. Fernando Díaz Otero por su colaboración y ayuda en la obtención de las muestras para el desarrollo de la tesis.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM: Antonio Javier, Ana Laura, Eden, Margarita, Ingrid, Anaid, Wendy, Martha, por su paciencia e invaluable amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas al conocimiento y por darme las herramientas para mi desarrollo profesional y personal.

Al financiamiento otorgado por PAPPIT y CONACYT.

## DEDICATORIAS

A Dios por ser mi fuerza, mi confianza y mi guía, porque siempre esta conmigo y por darme la oportunidad de alcanzar una meta más.

A la mujer más maravillosa del mundo, quien siempre ha estado conmigo por su gran amor apoyo incondicional y por ser mi motivo para seguir adelante. Gracias Mamá.

A mí querido esposo Rómulo Quezada (El Momis) por su amor, apoyo, comprensión, su gran paciencia y por dar alegría a mi vida. Gracias por ser lo más importante y hermoso en mi vida. Te quiero.

A mi padre Armando Parada por su ejemplo de vida y amor.

A mis hermanos Gabriel, Mariana y Graciela por ser parte de mis pensamientos.

A la Sra. Rosa Apolinar por su apoyo durante todo este tiempo.

A todas las personas que han tocado mi corazón y me han enseñado a mirar hacia delante.

A la Tolonga, Geo, Carmelito y Pochaco por ser mis mejores amigos.

## INDICE:

	Pagina
INDICE	i
LISTA DE GRAFICAS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.2 AGENTE CAUSAL DE LA TUBERCULOSIS	1
1.3 SITUACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN MÉXICO	2
1.4 PATOGENICIDAD DE <i>Mycobacterium bovis</i>	3
1.5 RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO A LA TUBERCULOSIS	4
1.6 MECANISMOS DE INMUNOSUPRESIÓN	6
1.7 DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS	8
2.0 ANTECEDENTES	11
3.0 JUSTIFICACIÓN	16
4.0 HIPÓTESIS	17
5.0 OBJETIVOS	17
6.0 MATERIAL Y METODOS	18
6.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	18
6.2 ANTÍGENOS PROTEÍCOS (PPD-B, PPD-A)	18
6.2.1 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	18
6.2.1.2 EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO PE-PGRS <sup>Rv1818c</sup> Y EL DOMINIO PGRS <sup>Rv1818c</sup>	19
6.2.1.2.1 EXPRESIÓN DEL DOMINIO PE <sup>Rv1818c</sup>	19
6.2.1.2.2 EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO ESAT-6	20
6.2.2 PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES	20
6.3 SUEROS DE BOVINO	21

6.3.1	PRUEBA ENZIMÁTICA ELISA	21
6.3.1.1	ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA	22
6.3.1.2	INMUNOBLOT	23
6.4	COLECCIÓN DE SANGRE PARA ESTIMULO CELULAR	23
6.4.1	DETERMINACIÓN INF- $\gamma$	24
7.0	RESULTADOS	25
7.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO	25
7.2	EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES	25
7.3	PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES	26
7.4	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL POR ELISA Y WESTERN-BLOT EN SUEROS DE LOS BOVINOS REACTORES Y NO REACTORES AL PPD	27
7.5	DETERMINACION DE INF- $\gamma$ EN CULTIVOS DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS REACTORES A LA TUBERCULINA Y BOVINOS SANOS.	28
8.0	DISCUSION	43
9.0	CONCLUSIONES	48
10.0	BIBLIOGRAFIA	49
11.0	ANEXOS	55

## LISTA DE GRAFICAS Y FIGURAS:

Graficas:	Pagina
1. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> que produce las proteínas recombinantes rPE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> ; rPGRS <sup>Rv1818c</sup> , rPE <sup>Rv1818</sup> y rESAT-6.	31
2. Evaluación de la reactividad en los sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina por ELISA, con el antígeno rPE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> y sus dominios rPGRS <sup>Rv1818c</sup> y rPE <sup>Rv1818c</sup> .	34
3. Evaluación de la reactividad de los sueros de bovino reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina por ELISA, con el antígeno rESAT-6.	35
4. Evaluación de INF- $\gamma$ en sobrenadantes de las células estimuladas con PPD-A, PPD-B y rESAT-6 obtenidas de animales reactivos y no reactivos a la prueba caudal de la tuberculina.	40
5. Evaluación de INF- $\gamma$ células estimuladas con el mitógeno (Pokeweed) obtenidos de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina.	41
6. Evaluación de INF- $\gamma$ en cultivos de células de sangre completa obtenida de animales reactivos y no reactivos a la prueba intradérmica de la tuberculina, estimuladas con la proteína completa rPE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> y sus dos dominios de forma independiente rPGRS <sup>Rv1818c</sup> y rPE <sup>Rv1818c</sup> .	42
<b>Figuras:</b>	
3: PAGE-SDS/ Westernblot de antígenos recombinantes rPE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> ; rPGRS <sup>Rv1818c</sup> ; rPE <sup>Rv1818</sup> y rESAT-6.	32
4: PAGE-SDS/ Westernblot de la purificación de las proteínas rPE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> ; rPGRS <sup>Rv1818c</sup> ; rPE <sup>Rv1818</sup> y rESAT-6 por cromatografía de afinidad a una columna de Níquel.	33
5. Reactividad del antígeno rPE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot.	36
6. Reactividad del dominio rPGRS <sup>Rv1818c</sup> con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot.	37
7. Reactividad del dominio rPE <sup>Rv1818c</sup> con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot.	38
8. Reactividad del antígeno rESAT-6, con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot.	39

## RESUMEN

Actualmente la tuberculosis bovina es uno de los problemas de salud pública de más relevancia a nivel mundial debido a las grandes pérdidas económicas que ocasiona y el alto riesgo que significa para la salud de humanos y bovinos. En los genomas de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* agentes causales de la tuberculosis humana y bovina se han identificado una familia multigenica compuesta por dos subfamilias designadas PE y PE\_PGRS, que difieren en la presencia de un dominio con numerosas repeticiones Glicina-Alanina en la región más próxima al carboxiterminal de la subfamilia PE\_PGRS (PGRS). En el presente trabajo se estudio la respuesta inmune humoral y celular en bovinos reactivos y no reactivos a prueba simple caudal de la tuberculina a la proteína recombinante rPE-PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios de forma independiente. Se utilizaron como controles positivos al estímulo celular el PPD-B, PPD-A, la proteína ESAT-6 y un mitógeno. El grupo experimental consistió de 90 bovinos de los cuales 58 (64.4%) provenían de hatos con alto prevalencia de tuberculosis y 32 (35.6%) de un hato libre de tuberculosis. Se midió la producción de IFN- $\gamma$  usando el estuche comercial BOVIGAM en linfocitos de sangre periférica estimulados con los controles y los antígenos rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup>. La respuesta de anticuerpos de todos los animales fue evaluada por ELISA e Inmunoblot con los mismos antígenos. El análisis de la respuesta inmune humoral mediante la prueba de ANOVA ( $p < 0.0001$ ) mostró diferencias estadísticas en el reconocimiento antigénico a la proteína completa y al dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> entre los grupos reactivos al PPD, cuando se comparó con la respuesta generada contra el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup>. Lo mismo se observó en el inmunoblot. En el suero de los bovinos no reactivos al PPD, el reconocimiento antigénico a los antígenos estudiados siempre fue menor cuando se compara con los animales reactivos. Utilizando una t-Student de datos no pareados se compararon los valores de IFN- $\gamma$  secretado por las células de los bovinos reactivos y los no reactivos al PPD. Se observó una diferencia estadística significativa entre los valores del PPD-B ( $p < 0.017$ ) y PPD-A en reactivos al PPD, lo cual no fue observado en los no reactivos, con el PPD-A ( $p < 0.002$ ). La producción de IFN- $\gamma$  con el antígeno rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> ( $p = 0.0256$ ), el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> ( $p = 0.0079$ ) y el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> ( $p = 0.0102$ ) muestra diferencias estadísticas significativas entre los bovinos reactivos y los no reactivos. En conclusión la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> induce una respuesta inmune humoral en bovinos reactivos dirigida principalmente hacia el dominio PGRS<sup>Rv1818c</sup>, en contraste no hubo diferencia entre la proteína completa y sus dominios en su capacidad de inducir una respuesta inmune celular.

Palabras Clave: Tuberculosis bovina, PPD reactivo, PPD no reactivo, IFN- $\gamma$ , PE\_PGRS.



## ABSTRACT

Bovine tuberculosis is one of most relevant public health problems worldwide, due to the heavy economic losses caused and the high risk it represent to humans and cattle. health. In the genome of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* the causal agents of human and bovine tuberculosis a multigenic family has been identified consisting of two subfamilies designated PE and PE\_PGRS, which differ in the presence of a domain with numerous repetitions Glycine-Alanine (PGRS) in the carboxiterminal region of the PE\_PGR subfamily. In this work we study the cellular and humoral immune response to the recombinant protein rPE-PGRS<sup>Rv1818c</sup> and their domains in tuberculin reactors and not reactors bovines. PPD-B, PPD-A and ESAT-6 were used as a controls. The experimental group consisted of 90 cattle of which 58 (64.4%) were from herds with a high prevalence of tuberculosis and 32 (35.6%) from a herd free of tuberculosis. INF- $\gamma$  production was measured by using the commercial kit BOVIGAM in peripheral blood lymphocytes stimulated with controls and antigens rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup>. The antibody response was evaluated by ELISA and Immunoblot with the same antigens. The analysis of humoral immune response by ANOVA test (0.0001) showed statistical differences in the protein antigen recognition and was higher with rPGRS<sup>Rv1818c</sup> domain in the PPD reactor group when compared with the response generated against the domination rPE<sup>Rv1818c</sup>. The same was observed in immunoblot. The antibody response to the antigens in the not PPD reactors animals always was lower when compared with reactors animals. Using a t-Student the INF- $\gamma$  values secreted by the cells of PPD reactors and reactors bovines were compared. A statistically significant difference was observed between the values of PPD-B ( $p < 0.017$ ) and PPD-A in PPD reactor animals, which was not observed in the PPD non reactors groups ( $p < 0.002$ ). The production of INF- $\gamma$  with rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> antigen ( $p = 0.0256$ ), the domain rPGRS<sup>Rv1818c</sup> ( $p = 0.0079$ ) and rPE<sup>Rv1818c</sup> ( $p = 0.0102$ ) showed statistically significant differences between the cattle reactors and non reactors. In conclusion PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> protein induces a humoral immune response in reactors cattle primarily directed toward PGRS<sup>Rv1818c</sup> domain. In contrast there were no differences between the complete protein and their domains in their ability to induce a cellular immune response.

Keywords: Bovine tuberculosis, PPD reactor, not PPD reactor, INF- $\gamma$ .

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La tuberculosis humana y la tuberculosis bovina (TB) continúan siendo uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo<sup>(56)</sup>, estas enfermedades son causadas por especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* que afectan al humano y al bovino respectivamente. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que durante el periodo comprendido entre 2000 al 2020 habrá 1000 millones de individuos infectados por *M. tuberculosis*, de los cuales 200 millones enfermarán y 35 millones morirán<sup>(15)</sup>. En el ganado, la enfermedad causa importantes pérdidas económicas ya que se disminuye significativamente la producción de leche y de carne. Aunado a esto, se suman las pérdidas por decomiso y los costos de los programas de control y erradicación.

El establecimiento de programas de control de la tuberculosis bovina, con base en pruebas de diagnóstico confiables y en el sacrificio de animales reactivos a la tuberculina, ha permitido eliminar casi por completo la enfermedad en países con baja incidencia, dentro de las cuales invariablemente se encuentran los países del primer mundo. Sin embargo, el control de la enfermedad no se logra fácilmente en países con alta incidencia, debido a factores económicos, sociales y culturales, que limitan que se lleven a cabo eficientemente los programas de control; aunado a esta situación, hay que considerar la presencia en los hatos de animales anérgicos, que diseminan la bacteria e infectan animales susceptibles; además, de que en algunos países es bien conocido que los animales silvestres son reservorios y juegan un papel importante en la diseminación de *M. bovis* al ganado, razón por la cual, la erradicación de la enfermedad se complica bajo estas circunstancias<sup>(56)</sup>.

## 1.2 Agente causal de la tuberculosis

La tuberculosis bovina se caracteriza por ser una enfermedad infecto-contagiosa, crónica y progresiva de distribución mundial, producida principalmente por *M. bovis*. Esta bacteria, pertenece a la subespecie del género *Mycobacterium* y del complejo *tuberculosis*, el que comprende otras especies como: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* y más recientemente *M. canettii*<sup>(16)</sup>. La micobacteria se caracteriza por poseer una envoltura celular que incluye la membrana plasmática y la pared celular constituida por el complejo de micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) y lipoarabinomana (LAM). El mAGP está formado por polímeros de arabinogalactano, peptidoglicano y ácidos micólicos.

El peptidoglicano de la pared celular es un polímero altamente entrecruzado, formado por aminoazúcares y aminoácidos (unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-glicolilmurámico), que se encuentra rodeando a la membrana plasmática; las moléculas de ácido murámico presentes en su estructura están unidas covalentemente al complejo micolil-arabinogalactano, formado por el arabinogalactano (polisacaridos de arabinosa y galactosa), que se encuentra esterificado a los ácidos micólicos (ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono), el LAM esta formado por residuos de D-arabinosa y D-manosa<sup>(5,25)</sup> siendo los ácidos micólicos, los responsables de que ciertos colorantes derivados de las anilinas (fucsina fenicada) sean retenidos a pesar de ser tratados con un ácido y alcohol, por esto se le ha denominado bacilo ácido alcohol resistente<sup>(72)</sup>. *M. bovis* es un bacilo alargado de aproximadamente 1-4µm de forma arrozada, de crecimiento lento, aerobio estricto, no esporulado, inmóvil, encapsulado<sup>(16)</sup>. El microorganismo puede sobrevivir en un clima seco durante largos periodos aunque puede ser eliminado, por ejemplo, mediante rayos de sol directos o por la radiación ultravioleta<sup>(39)</sup>. La tuberculosis bovina producida por *M. bovis*, afecta tanto al hombre como a los animales, sin embargo en raras ocasiones *M. tuberculosis* y *M. africanum*, puede producir problemas de tuberculosis en el bovino, siendo una enfermedad que guarda una estrecha relación con la producción intensiva de bovinos<sup>(75)</sup>.

El tipo de explotación y condiciones de alojamiento a las que se someten los animales, son factores que pueden favorecer la presentación de la enfermedad. El hacinamiento, las malas condiciones higiénicas del alojamiento, la mala alimentación, enfermedades recurrentes y una respuesta inmune deprimida, favorecen el desarrollo de la enfermedad<sup>(52,53,58)</sup>

### **1.3 Situación de la tuberculosis bovina en México**

En México, tanto la ganadería lechera como la ganadería de carne muestran fuertes diferencias en la incidencia de infección por *M. bovis*. La prevalencia a nivel nacional de TB en ganado de leche es de 11.1% y en ganado de carne de 2.9%. En el año 2002 los censos ganaderos indicaban 30,702,115 cabezas de ganado bovino, de los cuales el 10% correspondían a bovinos especializados para la producción de leche y el 90% a bovinos especializados para la producción de carne. En el mismo año, el servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria (SENASICA), informo los casos y focos de tuberculosis reportados en bovinos, donde se presentó un

total de 2258 focos con 3286 casos, en tuberculosis humana la Secretaría de Salud, se reportó 15,622 casos de tuberculosis desconociendo cuantos fueron causados por *M. bovis*<sup>(73)</sup>.

La TB bovina se encuentra en etapa de erradicación en 8 estados del país, principalmente en los estados del norte del país y actualmente en la península de Yucatán, el resto del país se encuentra en etapa de control sanitario. Por otro lado, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 21 regiones de baja prevalencia de tuberculosis bovina, de las cuales, 11 pueden exportar ganado con una sola prueba de tuberculina al lote de animales, 9 regiones con prueba a todos los animales del hato y del lote de ganado y una región que no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos<sup>(73)</sup>.

La TB bovina es un problema de salud pública, que causa graves pérdidas económicas en la producción de carne por parte ganado bovino, además, la presencia de esta enfermedad en hatos lecheros constituye un riesgo potencialmente importante en salud, tanto por el consumo de productos no pasteurizados, como por el contacto de los trabajadores en el campo y en rastros con animales infectados. Es por ello que el control de la tuberculosis bovina en el país es importante, no sólo para mejorar las condiciones sanitarias internas, sino que, además nos permite mantener las exportaciones de ganado hacia países como EUA.

#### **1.4 Patogenicidad de *Mycobacterium bovis***

*La especie micobacteriana que tiene mayor capacidad de infección aun amplio rango de hospederos es M bovis, dentro de los cuales se incluyen los primates, incluido el hombre, carnívoros, tanto domésticos como de vida silvestre*<sup>(3, 64)</sup>.

La enfermedad es más frecuente en las vacas lecheras, debido a su largo periodo productivo y explotación intensiva, en comparación con los animales que se sacrifican tempranamente para la producción de carne<sup>(51)</sup>. Las vías más usuales de infección al ganado son las respiratorias y las digestivas. Los hallazgos patológicos y los actuales conocimientos de los modos de transmisión de la enfermedad, apoyan la teoría de que la mayoría de los animales se infectan por vía respiratoria. Se ha observado que las vacas tuberculosas, presentan casi siempre lesiones en los nódulos linfáticos asociados al aparato respiratorio; mientras que sólo el 12% de vacas tuberculosas presentan lesiones pulmonares y por lo tanto son los que deben considerarse como

“casos abiertos” capaces de diseminar la enfermedad. El animal puede excretar micobacterias viables por moco nasal y traquea antes de que sean visibles lesiones pulmonares. Los bacilos tuberculosos son excretados preferentemente por aire espirado, esputo y moco nasal. Sin embargo, también se eliminan por heces, orina, descargas vaginales, uterinas, seminales y a partir de nódulos linfáticos supurantes<sup>(36,7,56)</sup>.

La remoción mucociliar en vías respiratorias altas, provee los mecanismos inespecíficos de defensa contra la infección micobacteriana. Sin embargo, los microorganismos dentro de pequeñas partículas de aerosoles expulsadas de una vaca con tuberculosis pueden pasar por los bronquios y logran llegar al espacio alveolar. El tamaño estimado de la parte final de los bronquios es de aproximadamente 20 $\mu$ m, comparado al de 1-4 $\mu$ m para un bacilo ácido alcohol resistente. La bacteria viaja a través de los pequeños espacios aéreos donde es ingerida por los macrófagos. Las células fagocíticas infectadas atraviesan la pared bronquial, entran a la circulación linfática y son transportados a los nódulos linfáticos, al parénquima de los pulmones o a otros sitios anatómicos. Después de la ingestión del bacilo, los macrófagos intentan destruir al microorganismo; sin embargo, los bacilos virulentos poseen la capacidad de resistir los mecanismos bactericidas como los radicales reactivos de oxígeno, que se generan después de la ingestión y que tienen poco efecto sobre el bacilo virulento de la tuberculosis. La ingestión del bacilo por los macrófagos y su presencia dentro de los fagosomas o vacuolas intracitoplasmáticas, protege a las micobacterias de los componentes bactericidas del suero. Para que se establezca la infección micobacteriana, se requiere que la bacteria sobreviva y se multiplique dentro de los fagocitos mononucleares, lo cual logran evadiendo los efectos microbicidas del macrófago<sup>(8,16)</sup>.

### **1.5 Respuesta inmune del hospedero a la tuberculosis.**

La infección por micobacterias se puede clasificar en tres etapas: establecimiento de la infección y adquisición de la inmunidad mediada por células; una fase latente crónica y en algunos individuos una fase de reactivación, que es caracterizada por un crecimiento bacteriano excesivo y con signos clínicos de la enfermedad<sup>(16)</sup>. La inmunidad a tuberculosis involucra interacciones complejas entre varias poblaciones celulares para el control y detención de la infección, además de prevenir la reactivación.

Los mecanismos inmunes mediados por células proporcionan protección y una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (RHT), mientras que las células T son mediadoras de la inmunidad y los macrófagos son las células que mantienen a las micobacterias dentro de su fagosoma. La inmunidad a infecciones micobacterianas es dependiente principalmente de la secreción de citocinas como interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), e Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-18 (IL-18) así como Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) las cuales regulan la población celular del sistema inmune<sup>(14)</sup>.

La respuesta inmunológica específica tanto humoral como mediada por células hacia un antígeno se inicia con la participación de las células T, a través del reconocimiento de porciones de antígeno proteicos (péptidos), unidos a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (MHCII) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA)<sup>(59)</sup>. Tras la activación por el antígeno específico (antígenos micobacterianos) estas células que juegan un papel central en la respuesta inmune pueden dividirse en dos diferentes subpoblaciones según la secreción de citocinas producidas, dictando el papel funcional de las células. Las células T cooperadoras o helper tipo 1 (Th1), producen principalmente IFN- $\gamma$  que activa a los fagocitos mononucleares e IL-12, siendo estas citocinas las que se asocian con la resistencia a parásitos intracelulares<sup>(48)</sup>; mientras que las células cooperadoras o helper tipo 2 (Th2) producen Interleucina-4 (IL-4), Interleucina -5 (IL-5) e Interleucina-6 (IL-6), citocinas necesarias para regular la síntesis de anticuerpos y promover la proliferación de eosinófilos y células cebadas<sup>(4)</sup>.

Ambas poblaciones celulares producen Interleucina-3 (IL-3) factor estimulante de la colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y TNF $\alpha$ . El curso de la respuesta inmune a un patógeno específico, las células Th1 y Th2, ejercen una influencia regulatoria que finalmente favorece el predominio de una subpoblación<sup>(16)</sup>.

Las citocinas secretadas por los macrófagos como las Interleucina-1 (IL-1), IL-6, Interleucina-10 (IL-10) e IL-12 ayudan a promover una respuesta tipo Th1 al inicio de la infección. A nivel de macrófagos existe evidencia de que el TNF- $\alpha$  y la IL-12 son moléculas reguladoras claves en la inmunidad celular, pues se sabe que el TNF $\alpha$  contribuye al desarrollo e integridad del granuloma activando neutrófilos y células endoteliales y puede sumar sus efectos con los del IFN- $\gamma$  para promover la destrucción de las bacterias intracelulares. La Interleucina-2 (IL-2) producida por los macrófagos en el sitio de la enfermedad no solo favorece la proliferación y expansión de las células Th1 específicas a antígenos micobacterianos, son quienes incrementan la citotoxicidad

y proliferación de las células T citolíticas y células “Natural Killer” ó asesinas naturales (NK). La IL-18 es una citosina que exhibe funciones biológicas similares a las de la IL-12 y por ende tiene influencia en el curso de la infección micobacteriana.

La respuesta inmune humoral se encuentra mediada por la IL-5 que causa la activación, crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, promoviendo la producción de anticuerpos<sup>(4)</sup>.

La RHT se dice que es una forma de reacción inmunitaria mediada por células, en la que la última célula efectora es el fagocito mononuclear (macrófago). Este tipo de inmunidad es parte del mecanismo básico de defensa frente a bacterias intracelulares, como las micobacterias, de hecho en condiciones normales los macrófagos no pueden matar a estos microorganismos e incluso estos sobreviven mejor en el citoplasma de estas células.

Para la eliminación de los bacilos ácidos-alcohol resistentes, es necesario que las citocinas, derivadas de las células T aumenten la función microbicida de los fagocitos. La misma secuencia de activación de las células T y del macrófago pueden producirse por medio de antígenos proteicos solubles. En esta situación como en la defensa del huésped, la activación de los macrófagos puede producir lesión tisular. Por ejemplo, como en el caso del derivado proteico purificado (PPD), que induce una RHT, cuando se inoculan animales que han estado expuestos a *M. bovis* bajo condiciones naturales o tienen una infección activa<sup>(55)</sup>.

## **1.6 Mecanismos de inmunosupresión**

La respuesta inmunitaria protectora contra la tuberculosis depende del balance entre la inmunidad inespecífica y la específica y esta última del predominio de la respuesta Th1 con producción de IFN- $\gamma$  sobre la respuesta Th2.

En la respuesta inmunitaria la participación de citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e Interleucina-8 (IL-8) resultan fundamentales para promover un microambiente que favorezca la migración leucocitaria al sitio de la invasión bacilar. Las alteraciones en la producción de citocinas proinflamatorias con defectos en la respuesta inmunitaria agudizan la infección. Se ha demostrado *in vitro* que componentes de la micobacteria como el LAM puede inducir en monocitos la producción de factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) con disminución de IL-1 y TNF- $\alpha$ , y se ha propuesto que esto facilita la sobrevivencia del bacilo a través del patrón de citocinas donde además de la

alteración en las citocinas proinflamatorias, el TGF- $\beta$  podría inducir supresión de la respuesta inmunitaria celular<sup>(30, 38)</sup>.

Es indispensable la participación de IL-12 e IL-18 producidas por macrófagos que promuevan la respuesta inmunitaria específica hacia Th1; por lo que deficiencias en el receptor de IL-12 en humanos y alteraciones en la producción de IL-18 en modelos animales dan como resultado una disminución en la producción de IFN- $\gamma$ , lo que incrementa la predisposición a infecciones micobacterianas o a una deficiente eliminación de las mismas<sup>(30, 38, 49)</sup>.

Los macrófagos activados poseen otros mecanismos para eliminar microorganismos, como la producción de altos niveles de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y la fusión fago-lisosoma, que permite la degradación bacteriana por parte de las enzimas hidrolíticas provenientes del lisosoma y la acidificación de la vacuola que alberga al bacilo. Sin embargo la micobacteria ha desarrollado mecanismos que le permiten evadir tales efectos adversos, uno de ellos consiste en prevenir la fusión fagosoma-lisosoma por medio de los sulfátidos de su pared celular o rodeándose de una cubierta rica en aspartato y triptofano (TACO); otro mecanismo es la producción de grandes cantidades de amonio, evitando así la acidificación de la vacuola fagocítica y afecta el tránsito de las moléculas de MHC-II, lo que interfiere con la capacidad presentadora de antígeno del macrófago<sup>(29, 30)</sup>.

El LAM puede inducir por un lado la quimiotaxis y por otro la inhibición de la actividad fagocítica de macrófagos al interactuar con receptores celulares de fagocitosis como el receptor de manosa. Algunos estudios han demostrado que la fagocitosis de la micobacteria mediada por receptores de complemento, interfiere con el incremento de calcio al interior de la célula, lo cual se ha asociado con un decremento en la fusión fagosoma-lisosoma que se traduce en la sobrevivencia de la micobacteria dentro de los macrófagos. Por algunas de estas razones los bacilos pueden permanecer al interior de los macrófagos en un estado "durmiente", con una actividad metabólica reducida y persistir sin producir enfermedad, creando un estado de latencia<sup>(30, 38, 39)</sup>.

Los macrófagos deben ser desactivados con el fin de no que induzcan un daño tisular excesivo después de la contención de la infección, esta función se encuentra a cargo de las citocinas como la IL-10 y TGF- $\beta$ . La IL-10 es producida por macrófagos y células T; su función es disminuir la expresión de IL-12, con lo que a su vez bloquea la liberación de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  desactivando así al macrófago<sup>(30, 38)</sup>.



El TGF- $\beta$  es producido por monocitos e inhibe la expresión de la sintetasa 2 de óxido nítrico (NOS2) por IFN- $\gamma$  en los macrófagos, interfiriendo con su actividad antimicobacteriana<sup>(30, 38)</sup>.

## 1.7 Diagnóstico de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad controlable, siempre que se utilice un programa de control adecuado, un manejo eficiente, se cuente con recursos humanos y financieros disponibles y métodos diagnósticos que faciliten la rápida identificación de animales enfermos. La estrategia que ha permitido controlar y erradicar la tuberculosis bovina esta basada en el uso de la prueba de la tuberculina (PPD) y el sacrificio de los reactivos<sup>(7,56)</sup>

Se han utilizado diversos métodos para el diagnóstico de la TB. La prueba de la tuberculina, aprobada y utilizada como un método diagnóstico oficial desde 1947 en muchos países, mide la RHT. En esta prueba se utiliza el derivado proteico purificado (PPD) preparado a partir de los sobrenadantes de cultivos líquidos de micobacterias. La prueba muestra una sensibilidad del 77% al 95%<sup>(32)</sup> y una especificidad del 90%<sup>(45)</sup>, lo cual implica que más del 10% de los animales no son detectados. Los resultados se basan en la medición de la reacción local al PPD, la cual está sujeta al error en la interpretación por parte del operador, al intervalo de espera de 60 días entre pruebas y a la reacción cruzada con micobacterias ambientales<sup>(47,60,67,11,21)</sup>. Para descartar y diferenciar las reacciones inespecíficas a micobacterias atípicas, se ha utilizado la prueba doble comparativa que se aplica dentro de los 10 o 60 días posteriores a la prueba simple caudal, en la que se aplica PPD bovino y PPD aviar simultáneamente en la tabla del cuello del bovino.

El hecho de que los animales no respondan a la tuberculina (anergia), puede deberse a infecciones recientes o generalizadas, y la frecuencia de estos casos puede llegar hasta un 20%. Este porcentaje puede ser mayor en zonas o regiones en donde no se lleva a cabo un programa de detección y eliminación rutinaria de reactivos<sup>(61)</sup>. A pesar de estas limitaciones, la prueba de tuberculina se ha utilizado con éxito en el programa de control y erradicación de la TB en distintos países.

El ensayo inmuno-enzimático como la prueba de ELISA mide la respuesta inmune humoral hacia antígenos de *M. bovis* tales como las proteínas del filtrado de cultivo, antígenos purificados, ya sean nativos o recombinantes, pero en general, se ha

observado una baja producción de anticuerpos en animales con tuberculosis<sup>(51,54,50,47,21,44)</sup>. Sin embargo, se han detectado niveles altos de anticuerpos en sueros de animales infectados en estados avanzados de la infección, así como en animales con lesiones diseminadas<sup>(50,61,68)</sup>, teniendo como consecuencia que pocos animales recientemente infectados con *M. bovis* tengan suficientes títulos de anticuerpos para ser detectados por medio de pruebas serológicas<sup>(34)</sup>. Diversos estudios han demostrado que existe una relación inversa entre la respuesta inmune celular y humoral en la tuberculosis<sup>(16,68)</sup>, por lo que aquellos animales en los que son anérgicos a la tuberculina pueden ser detectados en pruebas de ELISA<sup>(27)</sup>. Es posible que algunos animales no logren montar una adecuada respuesta humoral debido a la baja cantidad de antígenos bacterianos solubles<sup>(21)</sup> ya que se presume que la dosis infectiva que puede producir la enfermedad es baja<sup>(50, 32)</sup>.

La prueba de ELISA no alcanza niveles adecuados de sensibilidad para poder ser utilizada como una prueba de rutina única, excepto en países o regiones en donde no se realiza un programa de erradicación, permitiendo que los animales alcancen etapas avanzadas de la enfermedad y la producción de anticuerpos es mayor<sup>(61)</sup>.

Debido a la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de la prueba de tuberculina y el ELISA, se ha propuesto la utilización de pruebas alternativas o complementarias en el diagnóstico de la TB. Una de las alternativas es la determinación de IFN- $\gamma$ , la cual es una citosina liberada por los linfocitos T, cuya participación es importante durante el desarrollo de la inmunidad de tipo celular<sup>(13,29,80,61)</sup>.

Esta prueba presenta una sensibilidad y especificidad superior a la prueba de la tuberculina. Algunos de los trabajos mencionan que la prueba del IFN- $\gamma$  tiene una sensibilidad del 88% al 93.67% y una especificidad del 90% al 96.3%<sup>(68)</sup>. Diversas investigaciones han reportado que la prueba de tuberculina y la prueba de IFN- $\gamma$  detectan un número similar de animales infectados, aunque algunos de estos bovinos muestran positividad a la prueba de IFN- $\gamma$  y negatividad a la tuberculina y viceversa, pero en una menor proporción. El uso de ambas pruebas para diagnosticar TB, mejora la sensibilidad en un 95.2%<sup>(74)</sup>. Ryan y col. (2000), evaluaron la prueba de IFN- $\gamma$  para el diagnóstico de la TB a los 8 y 28 días después de la tuberculinización, obteniendo una sensibilidad y especificidad de 85% y 93% respectivamente. Estos resultados apoyan el uso de esta técnica como complemento de la prueba de tuberculina.

En estudios experimentales, la prueba de IFN- $\gamma$  permitió la identificación temprana de animales infectados desde los 14 días post-inoculación, mientras que la reactividad a la prueba de tuberculina, solo se observó después de 28 días de esos mismos animales<sup>(12)</sup>. Otro trabajo menciona que la prueba de IFN- $\gamma$  puede detectar a los animales infectados desde 90 hasta 150 días antes que la prueba de la tuberculina<sup>(81)</sup>. La prueba de IFN- $\gamma$  ha sido evaluado por muchos países en el mundo, apoyando la idea que se puede considerar como una prueba diagnostica complementaria a la prueba de la tuberculina para el diagnóstico de tuberculosis bovina.

Una ventaja al medir la secreción de INF- $\gamma$  *in vitro* como un indicador del estado de la enfermedad, a llevado a la búsqueda de mejorar la calidad de la prueba, utilizando antígenos inmunodominantes que puedan distinguir entre animales vacunados con alguna cepa vacunal de BCG de los infectados de forma natural con *M. bovis*<sup>(78)</sup>.

El análisis genómico de BCG reveló que los genes que codifican para los antígenos ESAT-6, CFP10 y MPB64 de *M. bovis* están ausentes en la cepa vacunal Pasteur de BCG. Por otro lado, el análisis fenotípico de *M. bovis* y BCG Pasteur, demostró que los antígenos MPB70 y MPB83 son fuertemente expresados en *M. bovis* y poco en BCG Pasteur<sup>(78)</sup>.

Uno de los mejores antígenos que tiene características inmunodominantes es ESAT-6, el cual se caracterizó y purificó en 1995 por Sorensen y col, esta proteína es de bajo peso molecular. En el genoma de *M. tuberculosis* se encuentra localizada en la región RD1, la cual codifica varias proteínas que se expresan durante fases tempranas de la infección incluyendo a la proteína del filtrado de cultivo CFP-10 y a la ESAT-6. La región RD1 esta presente en algunos de los miembros del complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, y *M. microti*) y desafortunadamente los genes ESAT-6 y CFP-10 también están presentes en micobacterias ambientales no tuberculosas como *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium smegmatis*<sup>(57)</sup>.

Debido a su expresión temprana y antigenicidad la proteína ESAT-6 es un candidato como subunidad vacunal contra la tuberculosis, se ha visto que en los ratones y bovinos vacunados con DNA-ESAT-6 se induce protección contra el bacilo tuberculoso<sup>(45)</sup>. Se ha utilizado para discriminar animales infectados de forma natural con *M. bovis* y animales sensibilizados ó infectados con micobacterias no tuberculosas y vacunados con paratuberculosis<sup>(57)</sup>.

Aunado a esto, los estudios hechos con vacas infectadas de forma natural y experimental con *M. bovis*, demostraron que el uso de ESAT-6 en concentraciones altas incrementa la respuesta de hipersensibilidad retardada en la prueba intradérmica en vacas infectados de tuberculosis<sup>(34)</sup>. En experimentos *in vitro* la proteína ESAT-6 es capaz de estimular una alta producción de INF- $\gamma$  en células de ratones, humanos y vacas enfermas de tuberculosis. Aagaard y col. (2006) observo que este antígeno es capaz de discriminar animales PPD positivos de los bovinos controles con una especificidad de 91% y un 69 % de sensibilidad. En estudios serológicos se ha visto que detecta anticuerpos circulantes específicos en animales infectados con *M. bovis*. Utilizándose también como un antígeno con potencial diagnóstico para la tuberculosis bovina y humana.

## 2.0 ANTECEDENTES

La secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv así como de algunos aislados clínicos y otras cepas del complejo tuberculosis<sup>(17,19,29,43)</sup> ha constituido una herramienta valiosa para el estudio de la biología de estos microorganismos así como para el entendimiento de los mecanismos que permiten a las micobacterias patógenas invadir, multiplicarse y persistir en su hospedero.

El genoma de *M. tuberculosis* contiene 4'411,529 pares de bases (pb) que codifican alrededor de 3924 proteínas, 40% de las cuales tienen una función predicha, 44% presentan similitud con otras proteínas y un 16% son proteínas hipotéticas. Interesantemente, dentro de este genoma se han identificado dos familias de genes conocidas como PE y PPE que ocupan aproximadamente el 5% de la capacidad codificadora. Las proteínas codificadas por estas dos familias presentan una región amino-terminal conservada seguida por una región carboxilo-terminal que varía en longitud y secuencia. La presencia del motivo Pro-Glu o Pro-Pro-Glu en la posición 8 y 9 o la posición 8, 9 y 10 del aminoterminal determinaron los nombres PE y PPE, respectivamente<sup>(17)</sup>.

La familia PE contiene 100 miembros que se distribuyen principalmente en dos subfamilias. Una de ellas corresponde a la subfamilia PE caracterizada por contener solo la región amino-terminal conservada de 110 aminoácidos. Alrededor de 38 de estos genes poseen un marco de lectura abierto con un promedio de 110 aminoácidos. La otra subfamilia se le conoce como PE\_PGRS (PGRS del inglés Polymorphic GC Rich Sequences) y comprende 61 miembros, caracterizados por presentar la región amino-terminal conservada PE, seguida por una serie de repeticiones en tandem con motivo Gly-Gly-A-Gly-Gly-X<sup>(17)</sup> (**Figura 1**).

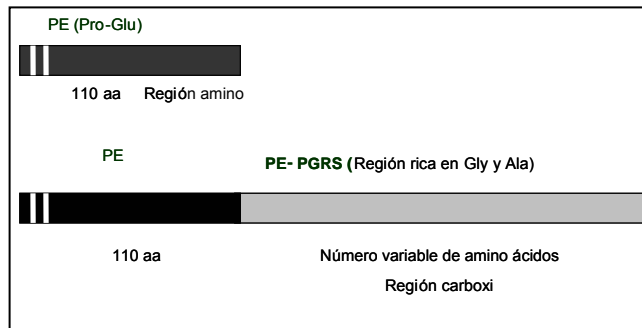


Figura 1. Características de los miembros de la familia PE. Tomados de Cole, S. T. et al, 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 393:537-544.

Hasta la fecha, las proteínas PE\_PGRS han sido encontradas únicamente en las micobacterias y dentro de estas se ha restringido principalmente a los miembros del complejo *M. tuberculosis* y en algunas otras especies cercanas. Su gran abundancia, el amplio polimorfismo y algunas evidencias experimentales hacen pensar que estos genes podrían estar involucrados en la patogénesis de la bacteria<sup>(66)</sup>.

Estudios de hibridación molecular usando como sondas la región PGRS de algunas PE\_PGRS han demostrado que los genes PE\_PGRS no se encuentran exclusivamente en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* sino también existen en *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. microti*, *M. bovis*<sup>(63,69)</sup>. La comparación de las secuencias de los genes PE/PE\_PGRS de *M. tuberculosis*, muestran una gran homología entre los dominios PE y PGRS, pero el polimorfismo particularmente ocurre dentro del dominio PGRS el cual es rico en GC y las proteínas codificadas por estos genes contienen regiones repetidas ricas en glicina<sup>(17)</sup>.

Aunado a esto, se ha visto que ciertas proteínas PE\_PGRS se encuentran en la superficie de las micobacterias y podrían tener funciones antigénicas y estructurales<sup>(6,9,10)</sup>. Igualmente, estudios por microscopia de fluorescencia de *M. smegmatis* que expresa el gen PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> fusionados con la proteína verde fluorescente muestran que esta proteína se localiza en la superficie de la micobacteria<sup>(22)</sup>. Interesantemente la mutación del gen PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> en BCG altera significativamente la interacción bacteria-bacteria

y la interacción bacteria-macrófago, sugiriendo que esta proteína pudiera funcionar como una adhesina de superficie<sup>(9)</sup>.

También existe evidencia de que algunas proteínas PE\_PGRS unen fibronectina, sugiriendo una interacción de la micobacteria con las células del huésped y la matriz extracelular<sup>(2, 26)</sup>.

La similitud de los dominios PGRS ricos en glicina con las proteínas fibrosas encontradas en el gusano de seda<sup>(35)</sup> y en la pared celular de las plantas<sup>(71, 81)</sup> que se caracterizan por su elasticidad y fuerza ténsil sugiere que las proteínas PE\_PGRS pudieran jugar un papel importante en la estructura de la pared celular de las micobacterias.

Es importante señalar que el dominio PGRS de las proteínas PE\_PGRS presenta una alta homología con el antígeno nuclear del virus del Epstein-Barr (EBNA-1), esta última es esencial para la persistencia del virus en las células B humanas<sup>(24)</sup>.

Aunque el EBNA-1 es el principal blanco para la respuesta inmune humoral, existen estudios que sugieren que los linfocitos T citotóxicos no son capaces de reconocer estas proteínas, porque el dominio repetido de Gly-Ala, previene el procesamiento de las proteínas dependientes del proteosoma y la presentación de los antígenos a través del MHC-1<sup>(24,40)</sup>. El hecho de que las proteínas PGRS contengan múltiples repeticiones de Gly-Ala, sugiere que estas también pudieran inhibir el procesamiento de antígenos por la vía del MHC-1, lo cual evitaría el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, permitiendo al *M. tuberculosis* persistir dentro del huésped por muchos años<sup>(41,20)</sup>.

La expresión de los genes PE\_PGRS *in vivo* se infirió inicialmente por la reacción de los sueros de animales o humanos infectados por *M. tuberculosis* con las proteínas PE\_PGRS recombinantes (rPE\_PGRS)<sup>(22,26,74)</sup>. Sin embargo, la presencia de reactividad cruzada de epitopes con el dominio repetitivo de las PGRS, impide concluir que la positividad de un anti-suero esté dirigida contra una proteína PE\_PGRS específica.

Recientemente, la expresión de los genes PE\_PGRS así como PE y PPE, se ha evidenciado con el uso del RT-PCR. Banu y col (2002) encontraron 10 diferentes genes PE\_PGRS expresados en *M. tuberculosis* H37Rv crecido *in vitro*. Otros estudios sugieren que la expresión de algunos genes PE\_PGRS ocurren únicamente *in vivo*<sup>(23)</sup>, tal es el

caso de 2 genes de *M. marinum* que corresponden a las PE\_PGRS Rv1651c y Rv0381 en *M. tuberculosis*. Estos genes se han asociado con virulencia, ya que la delección de los mismos lleva a una menor sobrevivencia de *M. marinum* en tejido granulomatoso en ranas sugiriendo que algunas proteínas PE\_PGRS están presentes en los estudios de la infección por *M. tuberculosis*<sup>(66)</sup>.

La proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> es un miembro típico de la subfamilia PE\_PGRS. Posee una región amino-terminal que tiene un alto grado de homología con las proteínas que pertenecen a la subfamilia PE. Así mismo, posee una región carboxilo-terminal con un alto contenido de glicina y alanina (41% y 20% respectivamente), que contiene numerosas repeticiones del motivo GGAGGA en el dominio PGRS. Además, tiene un tamaño cercano a los 500 aminoácidos, que es el tamaño promedio de los genes PE\_PGRS<sup>(10)</sup> (**Figura 2**). No obstante comparte un alto grado de homología con varios miembros de su subfamilia PE\_PGRS, el miembro más cercano es la proteína Rv1756c, con la cual comparte un 60% de homología<sup>(17)</sup>.

En la secuencia del genoma de *M. bovis* se encuentra la proteína Mb1849 homóloga a la PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> en *M. tuberculosis* teniendo con una similitud del 99.9% con su región amino-terminal de 110aa (PE), mientras que el dominio PGRS tiene una delección de 3 aminoácidos en comparación con la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> de H37Rv.

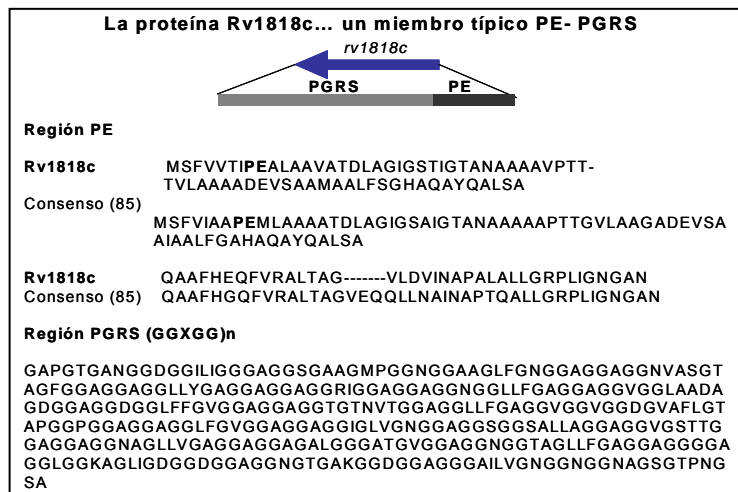


Figura 2. Dominios identificados en la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.



Al parecer, esta proteína se localiza en la pared celular; en un trabajo experimental, mediante mutagénesis por transposones se identificaron mutantes de *M. bovis* BCG cuyo crecimiento era disperso en medio líquido, además de que perdían la habilidad de entrar y de sobrevivir en macrófagos. La bacteria que presentaba el fenotipo disperso tenían insertados un transposon en la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c(9)</sup>.

La inmunogenicidad de la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> ha sido estudiada ampliamente en el ratón<sup>(6)</sup>. Se ha investigado la respuesta inmune celular contra la rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y contra su región rPE<sup>Rv1818c</sup> mediante la inmunización con construcciones de DNA. Se observó una respuesta inmune humoral significativa contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> pero no contra la rPE<sup>Rv1818c</sup>, mientras que la respuesta inmune celular medida por la producción de IFN- $\gamma$  fue inducida principalmente por la región rPE<sup>(22)</sup>.

La expresión de algunas proteínas rPE\_PGRS también ha sido evaluada en estudios clínicos con pacientes infectados por *M. tuberculosis*<sup>(26)</sup>. La evidencia que se tiene hasta el momento, sugiere que algunas proteínas codificadas por ciertos miembros de la subfamilia génica PE\_PGRS podrían estar presentes en la pared celular micobacteriana y se ha postulado que podrían ser fuentes de variación antigénica dado el alto polimorfismo existente intra e intercepas<sup>(10)</sup>.

La evidencia que se tiene hasta la fecha, sugiere que numerosos genes PE y PE\_PGRS están restringidos a miembros del complejo *M. tuberculosis* y a otras pocas especies micobacterianas que prefieren hospederos humanos así como otras especies mamíferas<sup>(18, 26, 63, 76)</sup>. Esto implica que la familia multigénica PE podría tener un papel en la infección y supervivencia micobacteriana en tejidos del hospedero, o como se ha sugerido, que muchos genes PE\_PGRS podrían funcionar como fuentes de variación antigénica para *M. tuberculosis* con el objetivo de evadir la respuesta inmune montada por el hospedero<sup>(65)</sup>.

Sin embargo, es poco aún lo que se sabe acerca de la función de la familia génica PE aunque se ha demostrado que algunas proteínas PE\_PGRS son preferentemente expresadas dentro de las células del hospedero<sup>(66)</sup>.

En resultados preliminares se ha visto la producción de anticuerpos contra una proteína rPE-PGRS en bovinos reactivos a la prueba de la tuberculina. Además de tener una producción de INF- $\gamma$  frente a la región rPGRS de la proteína codificada por el gen Rv1759c en bovinos infectados con *M. bovis*.

A pesar de la amplia información disponible, aún no se establece con precisión la función biológica que tiene la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>; por lo que ha sido difícil determinar los mecanismos inmunológicos que utiliza el hospedero para responder a ellas. Es por tanto necesario establecer de manera detallada la respuesta global del sistema inmune a la proteína completa y a cada uno de sus dominios. Por esto en el presente trabajo se estudió la expresión y la respuesta inmune inducida por el producto del gen PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> en tuberculosis bovina.

### 3.0 JUSTIFICACIÓN:

Algunos miembros de la familia PE\_PGRS juegan un papel importante en la interacción de las micobacterias con sus hospederos, constituyéndose un blanco de la respuesta inmunológica. Dadas las diferencias en los dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup> de dicha proteína, se plantea evaluar la respuesta inmune contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> con el fin de establecer diferencia inmunológica en la respuesta de bovinos reactivos al PPD.

#### **4.0 HIPÓTESIS**

El dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> de la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, puede inducir una respuesta inmunológica de diferente naturaleza que la producida por el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> en bovinos reactivos al PPD.

## 5.0 OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta inmune humoral y celular generada en bovinos reactivos a la tuberculina (PPD) contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup>.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar la respuesta inmune humoral generada contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios (rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup>) en suero de bovinos de hatos reactivos a la prueba de la tuberculina (PPD) y bovinos de hatos libres de tuberculosis.

Estudiar la respuesta inmune celular generada contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios (rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup>) en sangre de bovinos de hatos reactivos a la prueba de la tuberculina (PPD) y bovinos de hatos libres de tuberculosis.

## 6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 ANIMALES

En el presente trabajo se realizó con 90 bovinos adultos de la raza Holstein, de los cuales 58 son bovinos reactivos a la prueba de la tuberculina simple caudal de hatos lecheros ubicado en una zona de alta prevalencia de tuberculosis ubicado en los estados de Oaxaca (21), Jalisco (31) e Hidalgo (6) y como testigo negativos del estudio se utilizaron 32 bovinos no reactivos a la prueba de la tuberculina simple caudal, de una zona y hato libre de tuberculosis, pertenecientes a la Universidad Autónoma de Yucatán, considerada por SENASICA un estado en etapa de erradicación de tuberculosis según que marca la Norma Oficial Mexicana (NOM-031.ZOO-1995).

### 6.2 ANTÍGENOS

El derivado proteico purificado aviar (PPD-A) y derivado proteico purificado bovino (PPD-B) se obtuvieron de *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle (BOVIGAM (Pfizer Animal Health, Victoria Australia).

#### 6.2.1 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Los genes de *M. tuberculosis* correspondientes a las proteínas recombinantes rPE-rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup> están clonados en el vector de expresión pET15b (realizados por la M.C. Ingrid Beatriz Cohen Falquez del grupo de la Dra. Clara Espitia, IIB-UNAM) el cual posibilita la adición de un tallo de histidina a la proteína recombinante, permitiendo su detección con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-histidina y facilitando su purificación por cromatografía de afinidad a metales (níquel). Por otro lado, la proteína ESAT-6 esta clonada en el vector de expresión pRset proporcionando a ésta las mismas características que el vector anterior.

Se estableció la cinética de crecimiento para cada bacteria estableciendo el tiempo en el que se alcanzan la fase logarítmica intermedia. La cepa C41 de *E. coli* se transformó con cada uno de estos vectores recombinantes, sembrándose por agotamiento en una caja con medio Luria Bertani (LB) agar (tryptone (Amresco, House hola USA), yeast extract

(Bioxon, Becton Dickinson México), cloruro de sodio (NaCl (Quimica Meyer, Tlahuac Estado de México), agar (Disco, Michigan Detroit USA)) y ampicilina (amp) 100µg/ml (ROCHE Indianápolis, USA). Una colonia aislada de cada construcción se sembró en caldo LB-amp 100µg/ml, incubándose a 37°C, con agitación constante de 200 revoluciones por minuto (rpm). En este momento se considera el tiempo inicial, cada 60 minutos (ml) se determinó la absorbancia a 600 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Espectrophotometer Jenway) por un periodo de 15 horas (h). Se graficaron las lecturas de la absorbancia obtenidas.

#### **6.2.1.2 EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> Y EL DOMINIO rPGRS<sup>Rv1818c</sup>**

Una vez establecida la fase logarítmica intermedia, se hicieron cultivos de 1 L de caldo LB-amp 100 µg/ml. La sobre expresión de la proteína se indujo con 250µM isopropyl-β-D-Thiogalactopuranside (IPTG, (Research Organicas, Cleveland, USA)) concentración final en el cultivo por 4 h a 37°C y en agitación constante de 200 rpm. El cultivo bacteriano fue centrifugado a 454 x g por 30 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó por decantación y la pastilla se resuspendió en 12 mL de buffer de lisis desnaturizante (Tris 0.01M (Bio-Rad), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M (J.T. Baker, Xalostoc Estado de México), urea 8M (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA)), imidazol 10 mM (Research Organics, St Cleveland USA), pH 8.0, en un tubo falcón con capacidad para 50 ml (CORNING, NJ USA) con movimiento suave (Rotator 3-D LAB-LINE USA) por 18 h 4°C. Se centrifugó a 20196 x g por 20 min. a 4°C y la suspensión obtenida se transfirió en cantidades de 1 ml a tubos de 1.5 ml (Ependorf, Axigen, USA) y almacenados a -80°C en un ultracongelador (Termo Electrón Corpotation, Asheville, NC USA) hasta su purificación.

##### **6.2.1.2.1 EXPRESIÓN DEL DOMINIO rPE<sup>Rv1818c</sup>**

A partir de un cultivo a 30°C con agitación constante de 200 rpm en caldo LB-amp 100µg/ml que alcanzó a la fase estacionaria (cultivo de toda la noche), se inocularon 10 mL de este cultivo en 1L de medio LB-amp 100µg/ml bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas hasta alcanzar su fase logarítmica intermedia, posteriormente se adicionó IPTG a una concentración final de 250µM para inducir la expresión de la proteína recombinante, dejando el cultivo por 4 h más. Al término del tiempo se centrifugó a 454 x g por 30 min a 4°C, se decantó el sobrenadante, y se cosechó la pastilla bacteriana,

resuspendiendo con 9 ml de solución de lisis desnaturalizante en un tubo falcón para 15 ml (FALCON, Becton Dickinson Labware, USA) en movimiento suave durante 20 horas. Posteriormente, la muestra se centrifugó y almacenó como se mencionó anteriormente.

#### **6.2.1.2.2 EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO rESAT-6**

Esta construcción fue donada por la Dra. Fabiana Bigi del Instituto de INTA Buenos Aires Argentina. Se hicieron cultivos a partir de la inoculación con una colonia a 1L de caldo LB-amp 100 ug/ml cuando el cultivo alcanzó la fase logarítmica intermedia, se indujo la sobre expresión de la proteína con 250 $\mu$ M IPTG durante 4h en agitación constante a 200 rpm y 37°C. El cultivo bacteriano se centrifugó a 454 x g por 30 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó por decantación. Posteriormente las células fueron rotas mediante sonicación con 3 pulsos de 1 min y 1 min de descanso entre cada pulso (71.5 Watts VirSonic, sonicador Virtis). La muestra se centrifugó a 10304 x g por 15 min a 4°C, recuperando una parte de proteína soluble en la suspensión. Se lavaron los cuerpos de inclusión producto de la sobre-expresión de la proteína insoluble recombinante del botón bacteriano, este se resuspendió en 5 ml de triton X-100 (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA) al 2% en PBS (NaCl 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (J.T. Baker, Xalostoc Estado de México), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O 10m (J.T. Baker, Xalostoc Estado de México) pH 7.4, lavándolo 2 veces con esta solución, se centrifugó a 10304 x g por 15 min entre cada lavado. Posteriormente los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 9 ml de solución de lisis desnaturalizante se solubilizarón por 18 h en movimiento suave. El material soluble se clarificó por centrifugación a 20196 x g por 15 min a 4°C y se almacenó en alícuotas de 1ml a -80°C hasta su purificación.

#### **6.2.2 PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES**

Los sobrenadantes de la lisis bacteriana se descongelaron en frío. Para purificar las proteínas se emplearon dos tipos de columna, la HisTrap Chelating HP (Pharmacia Biotech, Germany) y HisTrap<sup>MT</sup> HP (GE Healthcare). La cromatografía se llevo a cabo empleando el equipo semiautomatizado ÄKTA-Prime (Pharmacia Biotech, Germany). Según protocolo diseñado para las purificaciones.



A la columna HiTrap Chelating HP se le acopló sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  100mM) (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA), La solución de equilibrio que se utilizó para esta columna fue: tris 0.01M (Bio-Rad), fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M) (J.T. Baker, Xalostoc Estado de México), urea 8M (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA), imidazol 10 mM (Research Organics, St Cleveland USA) pH 8.0. Una vez unida a la columna la proteína se eluyó con tris 0.01M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M, urea 8M, imidazol 500mM, pH 8.0, empleando un gradiente por pasos del 10%, 30% y 100% con el imidazol.

La columna HisTrap<sup>MT</sup> HP ya tiene acoplado el sulfato de níquel a la sefarosa, por lo que es equilibrada con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, cloruro de sodio 300 mM (NaCl) (Quimica Meyer, Tlahuac Estado de México), imidazol 10 mM y urea 8M, pH 8.0. Haciendo el mismo gradiente por pasos con imidazol (Imidazol 500mM). Se colectaron fracciones de 1 mL en tubos de ensayo.

La renaturalización lenta de las proteínas recombinantes se llevó a cabo por diálisis en membranas Spectra/Por. (Molecular Poros Membrana MWCO 3500, Broadwick St. USA) contra la solución de equilibrio en concentraciones decrecientes de urea (6, 4, 2, 1, 0 M) sin imidazol. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado y ajustado para placas de microtitulación, haciendo alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  y almacenando a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **6.3 SUEROS DE BOVINO**

Los animales se sangraron en tubos (Venoject, Terumo Europe N.V. Interleuvenlaan Leuven, Belgium) sin anticoagulante. Se conservaron a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Se centrifugaron a  $824 \times g$  por 15 min a temperatura ambiente (TA). Los sueros se distribuyeron en alícuotas de 1 ml, almacenándolos a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización en el ELISA e Inmunoblot.

#### **6.3.1 PRUEBA ENZIMÁTICA ELISA**

Para determinar la reactividad de los sueros obtenidos de los bovinos reactivos y sanos sobre los antígenos  $\text{rPE\_PGRS}^{\text{Rv1818c}}$ ,  $\text{rPE}^{\text{Rv1818c}}$ ,  $\text{rPGRS}^{\text{Rv1818c}}$  y rESAT-6, se utilizaron

placas para ELISA de 96 pozos con fondo plano Maxisorp (Nalguen Nunc, Rochester NJ USA), en las cuales se pegaron 0.5µg de antígeno por pozo en 100µl de solución de carbonatos Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2M, NaHCO<sub>3</sub> 0.2M (J.T. Baker, Xalostoc Estado de México) pH 9.6, durante toda la noche a 37°C. Lavado\*. Los sitios inespecíficos se bloquearon con 200µl por pozo de albúmina serica bovina (BSA) (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA)) al 2% en PBS con 0.05% Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween-20 (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA)) por 2 h a TA y agitación rotatoria suave. Lavado\*. Los sueros a probar se diluyeron 1:100 en PBS-Tween20-BSA1% adicionando 100µl en cada pozo por duplicado e incubando por 1 h a TA y agitación suave. Lavado\*. Enseguida, se incubaron con 100µl por pozo de proteína G marcada con peroxidasa HRP-rec-Protein G (Zymed, SF California USA), diluida 1:2000 en PBS-tween20-BSA 1% por 1 h a TA. Lavado\*. La actividad enzimática se reveló con 100µl por pozo de o-phenyldiamine dihydrochloride tablets (OPD) (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA)) incubando durante 15 min en oscuridad. La reacción se detuvo con 50µl por pozo de 3N ácido clorhídrico (HCl) (J.T. Baker, Xalostoc Estado de México) y se leyó a una densidad óptica de 450 nm en un lector de ELISA automático (TermoLab System Multiscan Ascent).

\*Se lavan 3 veces con 250µl de PBS-tween-20 al 0.05%, de 3 min cada lavado, en constante agitación.

### **6.3.1.1 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

Las proteínas recombinantes se sometieron a un análisis electroforético en geles preparativos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes. Se utilizaron dos concentraciones de gel separador, una al 12% para los antígenos recombinantes de mayor peso molecular (rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>), y al 15% para los de menor peso molecular (rPE<sup>Rv1818c</sup>, rESAT-6). Se cargaron 5µg de proteína total para cada antígeno por carril. El corrimiento electroforético se efectuó a 120 volts constantes (Power PAC-3000, Bio-Rad), usando una solución de tris-glicina (tris 250 mM (Bio-Rad) glicina 1.91 M (Bio-Rad)) y 1%. SDS (Bio-Rad).

Después de la separación electroforética las proteínas se transfirieron a membranas de polyvinylidene difluoride P-Innunobilon nylonv (PVDF (Millipore, CO. Bedford, Mass) a 60 volts constantes durante 1 h en solución de tris-glicina (tris 250 mM (Bio-Rad), glicina

1.91 M (Bio-Rad)). Para evidenciar la presencia de los antígenos, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 (Boehringer Mannheim Corp. Indpls, IN USA), o se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-histidina peroxidasa (HRP anti-hist<sub>6</sub> (Roche, Indianápolis USA)), 1:2000 en PBS-Tween-20 al 0.05% BSA al 1% a TA por 1 h en agitación suave. La membrana se lavó 2 veces con PBS-Tween-20 0.05% 3 min cada lavado. Se reveló por 3 min en oscuridad con 1µl de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (MERCK KGaA, Germany) al 30% en PBS y 3,3-diaminobencidina BAD (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA)

### **6.3.1.2 INMUNOBLOT**

Las membranas teñidas con azul de Coomassie se destiñeron con una mezcla de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH (Química MEYER, Del Mar, Tlahuac México) y alcohol metílico (CH<sub>3</sub>OH (J.T. Baker, Xalostoc Estado de México)). Los sitios libres de las membranas se bloquearon con 2% de BSA en PBS-Tween-20 0.05% a T.A. por espacio de 1 h en agitación suave. Posteriormente se realizaron lavados con PBS-Tween-20 0.05% 3 tiempos de 3 minutos cada uno. Las membranas se cortaron en tiras de 3mm de ancho, el corte se realizó en forma vertical a la orientación en que se encontraban los antígenos recombinantes. Las tiras se incubaron por 1 h a TA con cada uno de los sueros del estudio diluidos 1:100 en PBS-Tween-20 0.05% BSA 1% y en agitación suave. Posteriormente, se incubaron con proteína G peroxidasa diluida 1:2000 en PBS-Tween-20-BSA 1%, durante 1 h a TA en agitación, seguido por 3 lavados con PBS-Tween-20, la reacción se reveló por oxidación activa con 3,3-diaminobencidina y 1µl peróxido de hidrógeno en PBS durante 5 min en oscuridad, la reacción se detuvo con agua bidestilada.

### **6.4 COLECCIÓN DE SANGRE PARA ESTIMULO CELULAR**

Se colectaron 10 mL de sangre de los 90 animales evaluados, en tubos vacutainer con anticoagulante heparina (BD Vacutainer Sodium Heparin, Franklin Lakes, NJ USA), la muestra se tomó dentro de los 60 días posteriores a la prueba de la tuberculina. Las muestras se procesaron durante las primeras 10 horas de haberse obtenido, respetando la temperatura no mayor a los 37°C. El estímulo de los linfocitos en las muestras de sangre periférica se hizo en condiciones de esterilidad, utilizando placas para cultivo

celular de 96 pozo (Costar, Corning NJ USA). En cada pozo se depositaron 200µl de sangre y las células se estimularon por duplicado con 4µg a concentración final en el cultivo de antígeno por pozo (PPD-A y PPD-B, rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rESAT-6). Como control positivo se utilizó la Lectina de *Phytolacca americana* Pokeweed (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA) a una concentración final en el cultivo de 1µg, como control negativo se usó el PBS estéril por filtración. Los antígenos se diluyeron de tal manera que la concentración final estuviera contenida en 25µl del mismo PBS estéril. Las placas se incubaron por 20 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> (Revco Habitat, Asheville, NC. USA). Los plasmas se recuperaron por centrifugación a 824 x g por 15 min a 4°C y se depositaron en placas de 96 pozos nuevas las cuales se almacenaron a -70 °C para posteriormente evaluar la producción de IFN-γ empleando la prueba comercial de BOVIGAM.

#### **6.4.1 DETERMINACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IFN-γ)**

El IFN-γ liberado en los plasmas de los cultivos, se midió usando la prueba de diagnóstico BOVIGAM (*Mycobacterium bovis* Gamma Interferón Test Kit for Cattle (Pfizer Animal Health, Victoria Australia)) según como marcan las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas de las placas de IFN-γ se leyeron en un lector de placas de ELISA automático, utilizando el filtro de 450 nm.

Se utilizaron controles positivos y negativos por triplicado en cada placa los cuales están incluidos en el mismo kit. Para la validación de la prueba fueron evaluadas las densidades ópticas (D.O.) de los controles y se aceptó un rango del control negativo de < 0.130 y > 0.700 en el positivo. Posteriormente se comprobó que las D.O. del blanco (PBS) fueran menores a las de las D.O. de los demás antígenos utilizados. Los resultados están expresados como índice de densidades ópticas (ODI's) obteniendo este valor como se indica: "La DO del antígeno (PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, PGRS<sup>Rv1818c</sup>, PE<sup>Rv1818c</sup>, ESAT-6 o Pokeweed) entre (/) la D.O. del PBS". Indicando así, las veces en que está representado el valor del PBS en cada uno de los resultados obtenidos de los antígenos.

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1.- CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La cinética de crecimiento que se realizó con cada una de las construcciones clonadas en la cepa de expresión C41 de *E. coli* se muestran en la **Grafica 1** en la cual se observa que la fase logarítmica intermedia de crecimientos para las bacterias transformadas con los plasmidos que contienen los genes que codifican para las proteínas rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPGRS<sup>Rv1818c</sup> se alcanzó a las 4 horas de incubación a una temperatura de 37°C mientras que para la transformada con el gen rPE<sup>Rv1818c</sup> alcanza la fase logarítmica intermedia a las 5 h de incubación a 30°C y en el caso de la proteína de las bacterias transformadas con el gen que codifica para la rESAT-6 alcanza la fase logarítmica intermedia las 4:30 h de cultivo con una temperatura de 37°C.

### 7.2.- EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Una vez obtenidas las cinéticas de crecimiento de las bacterias transformadas con los genes de estudio, se indujo la sobre-expresión de las proteínas recombinantes utilizando IPTG a una concentración final en el cultivo de 250µM. En la Figura 3 se observa que las proteínas rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rESAT-6, se logro inducir una mayor cantidad de expresión que la observada en los mismos cultivos sin inducir, sin embargo, con la proteína rPE<sup>Rv1818c</sup> no se observo una mayor inducción.

La migración de las proteínas recombinantes fue analizada en PAGE-SDS. Las proteínas recombinante rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup> migran al peso esperado de 45.0, 31.0 y 14.0 kDa respectivamente, mientras que la rESAT-6 migra a los 14.4 kDa esperados. Con la finalidad de corroborar que las proteínas sobre-expresadas fueran las esperadas, se utilizó un anticuerpo monoclonal específico, que reconoce las histidinas, que reconoció fuertemente a los 4 antígenos recombinantes y un segundo anticuerpo policlonal que esta dirigido contra la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y el cual reconoce fuertemente a dicha proteína así como a sus dominio PGRS<sup>Rv1818c</sup> y muy poco el dominio PE<sup>Rv1818c</sup> (**Figura 3**).

### 7.3.- PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Las proteínas recombinantes desnaturalizadas con urea, se purificaron por cromatografía de afinidad Ni-NTA. Esta columna utiliza como cama seferosa afín al níquel, los antígenos rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup> y rESAT-6 se unen a la columna utilizando 10 mM de imidazol, asimismo, las proteínas se eluyen de la columna utilizando 500 mM de imidazol como competidor de los sitios de unión al níquel mediante un gradiente del 10%, 30% y 100% del buffer de elusión. Para cada proteína se observaron diferentes picos durante el periodo de elusión, sin embargo las fracciones en donde se encuentra la proteína con un mínimo de contaminantes corresponden a la elusión con 30% de imidazol. Cabe mencionar que el rendimiento de la purificación varió para los diferentes antígenos siendo alrededor de 1.5 mg/l en el caso de los antígenos rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup> 0.8mg/l para la ESAT-6 y en el caso del antígeno PE<sup>Rv1818c</sup> su rendimiento fue de 0.5 mg/l casi aproximadamente 60% menor al obtenido con las otras proteínas con la desventaja que contenía mas contaminantes.

Las fracciones eluidas que se identificaron con la mayor cantidad de antígeno y con la menor cantidad de contaminantes se analizaron por SDS-PAGE, posteriormente se renaturalizarón por gradiente decreciente de urea (6, 4, 2, 1 0 M) y sin imidazol. El tiempo de diálisis se realizo por periodos de 14 horas en cada paso, al final de la diálisis las proteínas se cuantificando por método de lowry.

En la **Figura 4**, se muestran las fracciones obtenidas con la purificación de las proteínas rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup> y rESAT-6. Las proteínas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y el monoclonal anti-histidina. Como era de esperarse se observa un fuerte reconocimiento de los dominio rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, y un bajo reconocimiento del dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> y el no reconocimiento de la rESTA6. Todas las proteínas fueron fuertemente reconocidas por el anticuerpo anti-histidina.

#### 7.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL POR ELISA Y WESTERN-BLOT EN SUEROS DE LOS BOVINOS REACTORES Y NO REACTORES AL PPD

Los antígeno rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> así como sus dos dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup> y la proteína rESAT-6 purificadas por cromatografía de afinidad a metales (Níquel) se estudiaron de dos formas, una de manera cuantitativa por el Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) y la otra forma es por Western-Blot con los 55 sueros de los bovinos reactivos a la tuberculina, y los 32 sueros de bovinos sanos, cada uno de los suero se probó a una dilución de 1:100.

Los niveles de anticuerpos observados en los bovinos reactivos para la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, oscilan entre 0.078 y 0.617 DO<sub>450nm</sub>, teniendo como media 0.319; para el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> 0.089 y 0.62 DO<sub>450nm</sub> con una media de 0.33, para el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup>, de 0.029 a 0.29 y su media es de 0.155. En el caso de los bovinos no reactivos al PPD, reflejan lo que se esperaba, las lecturas de los valores máximos fueron más bajas que los bovinos reactivos, siendo estos de 0.44 para la rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, de 0.49 para el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y en el caso del dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> fue de 0.28, y las medias de estas proteínas en los bovinos no reactivos fueron de 0.25, 0.28 y 0.16 respectivamente.

A pesar de que el nivel de anticuerpos observados entre los dos grupos es muy cercano, se observó una mayor cantidad de anticuerpos que reconocieron la proteína completa rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> que con el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> en los bovinos reactivos al PPD ( $p < 0.001$ . ANOVA). Al igual que para los bovinos reactivos, los bovinos no reactivos reconocieron menos el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> que con la proteína completa de los bovinos no reactivos ( $p < 0.001$ . ANOVA), siendo estos significativamente diferentes. Por otro lado también se encontraron diferencias estadísticas significativas en el reconocimiento antigénico entre el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> de los bovinos reactivos y el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> de los mismos bovinos ( $p < 0.001$ . ANOVA). Interesantemente en sueros de los bovinos no reactivos, se reconoció mayor cantidad de anticuerpos con el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> que con el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> en los bovinos reactivos ( $p < 0.001$ . ANOVA), de igual forma se observa que con el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> de los bovinos reactivos tiene mayor cantidad de anticuerpos comparado con el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> de los bovinos no reactivos ( $p < 0.001$ . ANOVA). También se encontraron diferencias entre el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> y el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> en los bovinos no reactivos ( $p < 0.004$ . ANOVA). No se encontraron diferencias significativas muy altas cuando se comparó el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> de los bovinos reactivos

contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> de los bovinos no reactivos ( $p < 0.026$ , ANOVA) (Grafica 2). A pesar de no existir diferencias estadísticas en el reconocimiento antigénico por parte de los bovinos reactivos y no reactivos al PPD frente a la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPGRS<sup>Rv1818c</sup> se observó que hay mayor cantidad de anticuerpos dirigidos contra la región rica en glicina y alanina (PGRS) que el observado con la proteína completa.

Los resultados obtenidos utilizando los mismos sueros pero evaluando el antígeno ESAT-6 muestran que el valor de la media es más alto con los bovinos reactivos (0.24) que con los bovinos sanos (0.18), siendo significativamente diferentes ( $p < 0.001$ , t-student para valores no pareados) (**Grafica 3**).

La respuesta humoral se evaluó también de forma cualitativa por Western blot. En este caso los antígenos se utilizaron de forma semi desnaturalizada fijándose por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS-PAGE al 12 ó 15% y transferidos a membranas de PVDF utilizando una concentración final de 90 µg por gel preparativo, siguiendo el procedimiento como se menciona anteriormente. Los resultados fueron similares a los obtenidos por ELISA donde se muestra que hay una mayor reactividad por parte de los anticuerpos presentes en los sueros de los bovinos reactivos al PPD hacia el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y la proteína completa rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> (**Figura 5 y 6**) comparado con la reactividad hacia el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> cuyo reconocimiento fue muy bajo ó casi nulo (**Figura 7**). En cuanto a la reactividad observada por parte en los sueros de los bovinos no reactivos, para los tres casos se observó solo una marca de fondo debido al efecto de dilución de los sueros. No se observó ningún reconocimiento antigénico con los sueros de los bovinos reactivos y no reactivos al PPD hacia el antígeno ESAT-6 (**Figura 8**).

## **7.5. DETERMINACION DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS REACTIVOS A LA TUBERCULINA Y BOVINOS SANOS.**

El ensayo de IFN- $\gamma$  se realizó utilizando sangre completa de bovinos reactivos a la prueba de la tuberculina simple caudal de los estados de Oaxaca, Jalisco e Hidalgo, y de bovinos libres de tuberculosis originarios del estado de Yucatán el cual se encuentra en etapa de erradicación de tuberculosis, tomándose estos como los 2 grupos de trabajo.



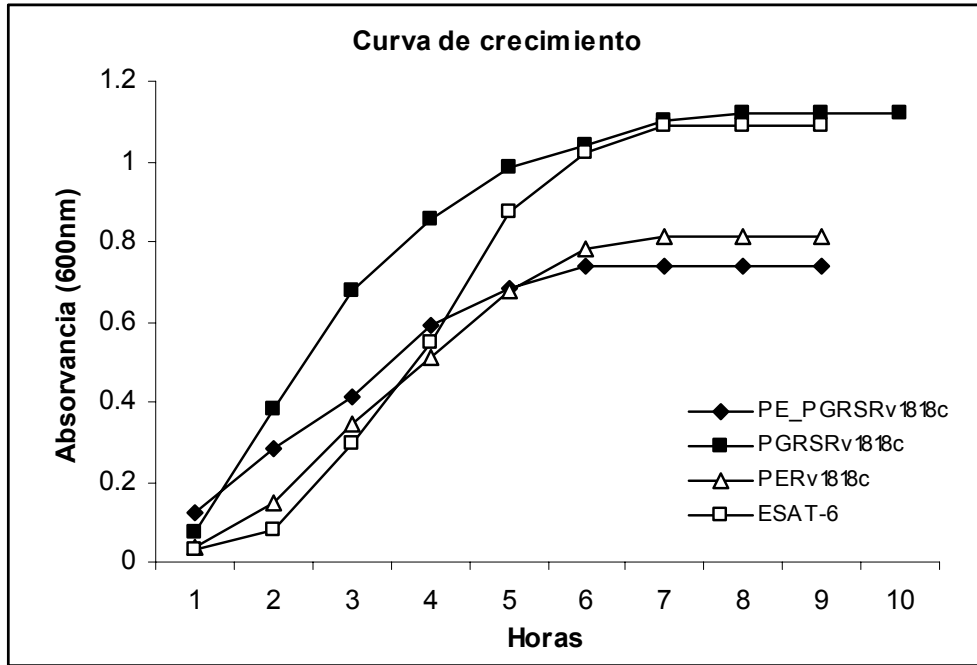
Los linfocitos de la sangre completa en los bovinos reactivos y no reactivos, se estimularon *in vitro* concentración final en el cultivo de 4µg de antígeno por pozo para los antígenos recombinantes rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv18181c</sup> y rESAT-6, al igual que con el PPD-B, PPD-A, para el estímulo con el Pokeweed (mitógeno) se utilizó 1µg/pozo concentración final en el cultivo y el PBS como control de la prueba al igual que el mitógeno. Los valores están representados como índice de estimulación ó índice de densidades ópticas.

El grupo de bovinos reactivos al PPD respondieron fuertemente al estímulo con el PPD-B, la media en el índice de estimulación de este grupo fue 2.9, siendo estadísticamente diferente esta respuesta con respecto al grupo de bovinos no reactivos al PPD, los cuales tienen una media en el índice de estimulación de 1.08 ( $p < 0.017$ ; T-Student de datos no pareados). Por otro lado, la respuesta al estímulo celular con el PPD-A en las células de los bovinos reactivos al PPD, tienen un valor en la media del índice de estimulación de 2.29 mientras que el estímulo de los bovinos no reactivos es de 1.25, de esta forma, la producción de INF-γ de las células al estímulo con PPD-A tiene diferencia estadística con una  $p < 0.0022$  (T-Student de datos no pareados). Sin embargo, la media en el índice de estimulación en el grupo de bovinos no reactivos a PPD fue más alta estimulando con PPD-A comparado con la respuesta al estímulo con el PPD-B en los mismos bovinos. Esto podría decirnos que estos bovinos están infectados con *M. avium* ó que han estado en contacto con otras micobacterias ambientales (**Grafica 4**).

También el grupo de bovinos reactivos y no reactivos al PPD se comparó utilizando el antígeno recombinante rESAT-6, encontrando una diferencia estadística significativa ( $p < 0.004$ . T-Student de datos no pareados) entre las dos poblaciones de bovinos estudiadas. En los bovinos no reactivos, el valor de la media es de 1.11 unidades menos que el valor de la media en el índice de estimulación de los bovinos reactivos al PPD (**Grafica 4**).

La producción de IFN-γ obtenida por el estímulo celular de los bovinos reactivos (media en el índice de estimulación de 11.76) y los no reactivos (media en el índice de estimulación de 7.73) con el mitógeno es estadísticamente diferente ( $p < 0.0003$ ) (**Grafica 5**).

En el caso de los antígenos estudiados, la media de los valores para la rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios rPRGS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup> fue muy similar 1.20, 1.20 y 1.21 respectivamente. El mismo patrón se manifiesta con los bovinos no reactivos estimulados con el antígeno recombinante rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y los dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup> donde se observan que las medias se encuentran en valores de 1.04, 1.03 y 1.02 respectivamente. El análisis estadístico utilizando una t-Student de datos no pareados para comparar los valores de los bovinos reactivos al PPD y los bovinos no reactivos al PPD, reflejada en la producción de IFN- $\gamma$  producida en las células de estos bovinos estimulados con el antígeno rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> ( $p=0.0256$ ), el dominio rPGRS<sup>Rv1818</sup> ( $p=0.0079$ ) y el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> ( $p=0.0102$ ) muestra diferencias estadísticas significativas entre los bovinos reactivos y los no reactivos (**Grafica 6**).



Gráfica 1: Cinética de crecimiento de  $\blacklozenge$  rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>,  $\blacksquare$  rPGRS<sup>Rv1818c</sup>,  $\triangle$  rPE<sup>Rv1818</sup> y  $\square$  rESAT-6. Crecidas en medio Luria Bertani (LB) (Tryptone (Amresco, House hola USA), Yeast Extract (Bioxon, Becton Dickinson México), NaCl (Quimica Meyer, Tlahuac Estado de México) y ampicilina (amp) 100 $\mu$ g/ml (ROCHE Indianápolis, USA). Incubadas a 30°C y 37°C con agitación (200 rpm). Se determino la absorbancia (600 nm) cada 60 minutos durante 15 horas. Se graficaron los resultados de dos repeticiones.

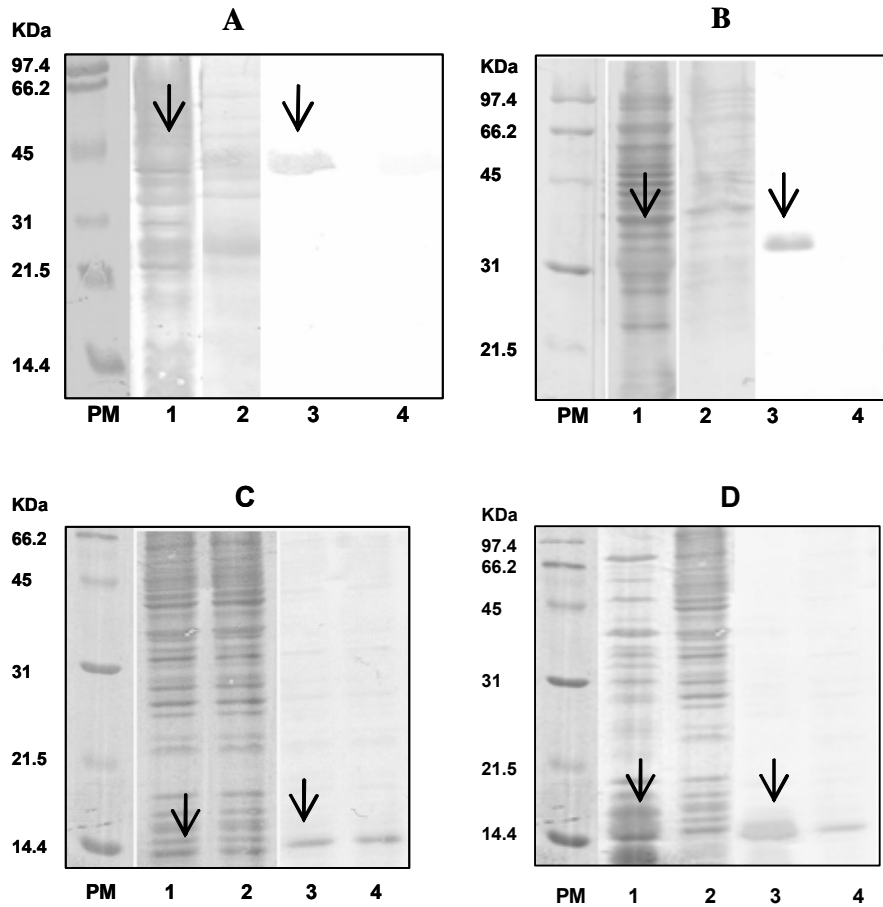


Figura 3: PAGE-SDS e Inmunoblot de la expresión de antígenos recombinantes rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>; rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818</sup> y rESAT-6 inducidas con 250  $\mu$ m de IPTG y sin inducir. A: Proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, B: Proteína rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, C: Proteína rPE<sup>Rv1818c</sup>, D: Proteína rESAT-6. PM: Peso Molecular. Carril 1: Lisado celular con inducción, teñido con azul de Coomassie. Carril 2: Lisado celular sin inducir, teñido con azul de Coomassie. Carril 3: Inmunoblot anti-histidina (1/2000) inducción. Carril 4: Inmunoblot anti-PE-PGRS<sup>Rv1818c</sup> (1/2000) del lisado sin inducir. Las flechas muestran las bandas de las proteínas sobre-expresada.

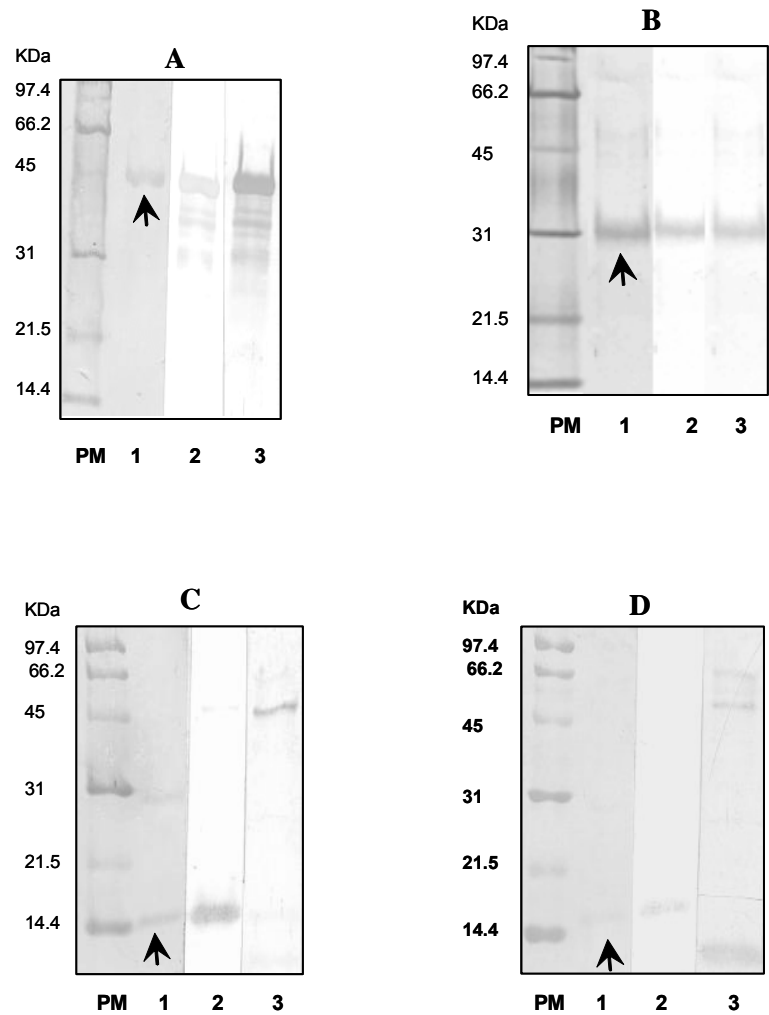
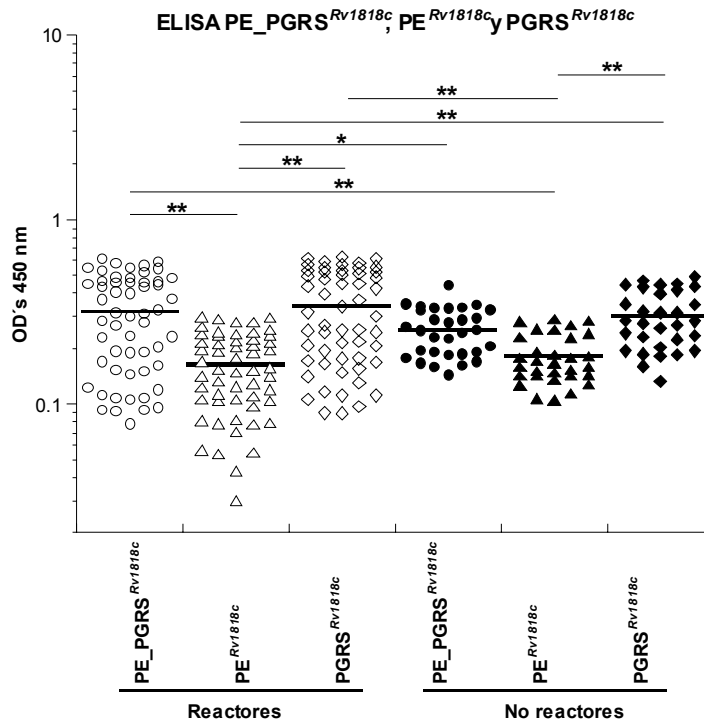
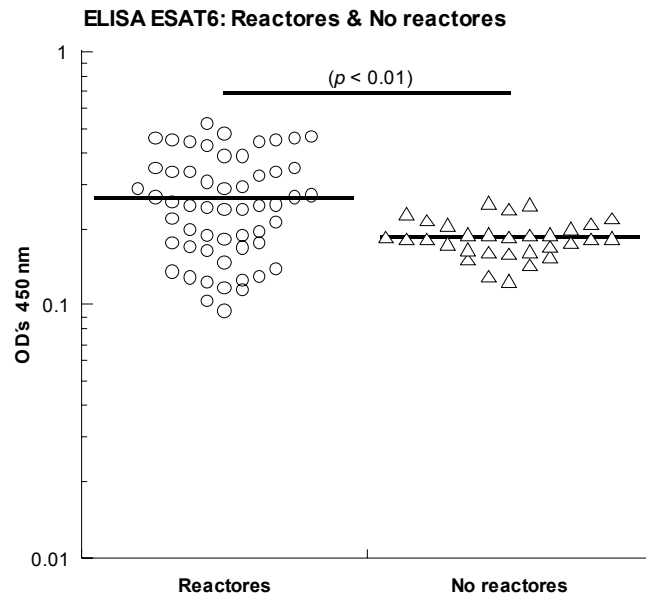


Figura 4: PAGE-SDS e Inmunoblot de la purificación de las proteínas rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPE<sup>Rv1818c</sup> y rESAT-6 por cromatografía de afinidad a una columna de Níquel. SDS-PAGE al 12% para la proteína de mayor peso molecular rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> (45.0 kDa), rPGRS<sup>Rv1818c</sup> (31.0 kDa) y al 15% para la rPE<sup>Rv1818c</sup> (14.0 kDa) y rESAT-6 (14.4 kDa). Transferidas a membranas de PVDF. A: Proteína rPE\_PGRES<sup>Rv1818c</sup>, B: Proteína rPGRS<sup>Rv1818c</sup>, C: Proteína rPE<sup>Rv1818c</sup>, D: Proteína rESAT-6. PM: Peso Molecular. Carril 1: Tinción con azul de Coomassie (flecha). Carril 2: Inmunoblot anti-histidina (1/2000). Carril 3: Inmunoblot anti-PE-PGRS<sup>Rv1818c</sup> (1/2000).



Gráfica 2. Evaluación de la reactividad en los sueros de bovinos reactores y no reactores a la prueba de la tuberculina por ELISA, con el antígeno rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup>. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la reactividad al antígeno rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y PE<sup>Rv1818c</sup> (\*p<0.005, \*\* p<0.001). La barra horizontal representa el valor de la media de las D.O<sub>450</sub>.



Gráfica 3. Evaluación de la reactividad en los sueros de bovinos reactores y no reactores a la prueba de la tuberculina por ELISA, con el antígeno rESAT-6. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la reactividad al antígeno rESAT-6 ( $p < 0.01$ ). La barra horizontal representa el valor de la media de las D.O<sub>450</sub>.

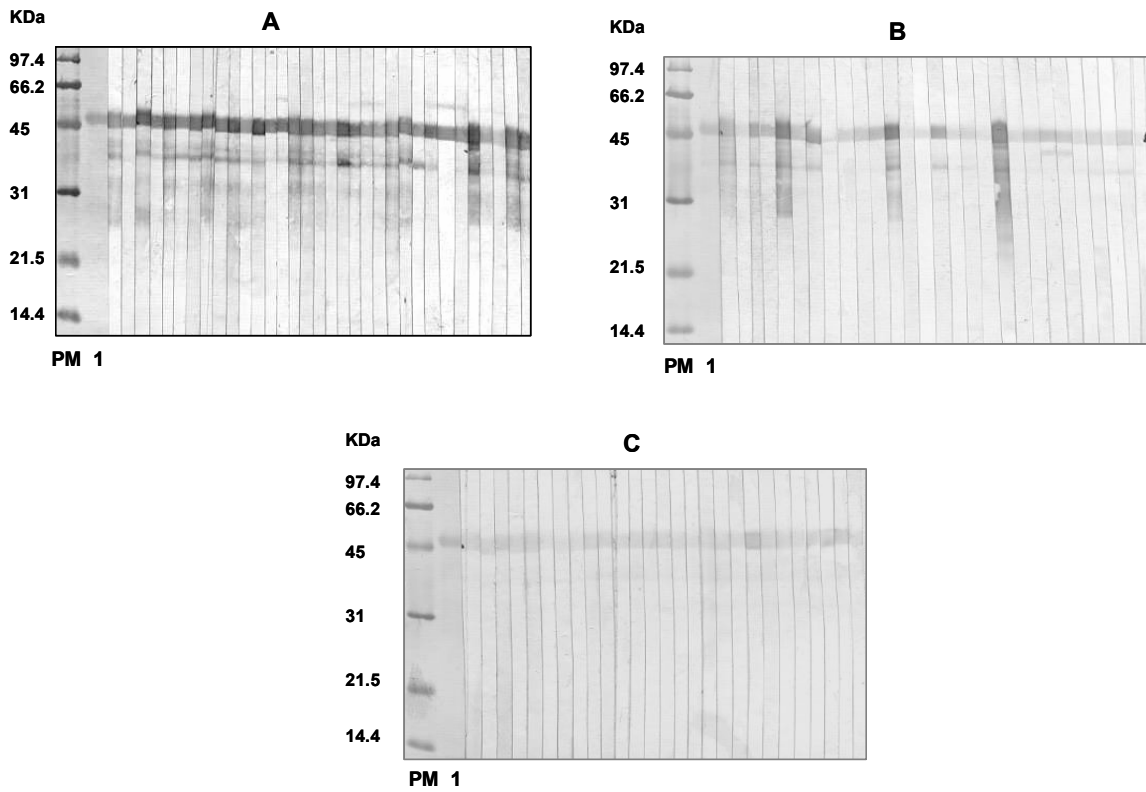


Figura 5. Reactividad del antígeno rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot. Los sueros se utilizaron en dilución 1:100. A y B: Sueros de bovinos reactivos a la tuberculina. C: Sueros de bovinos no reactivos. PM: Peso Molecular. Carril 1: Antígeno rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> teñido con azul de Coomassie.



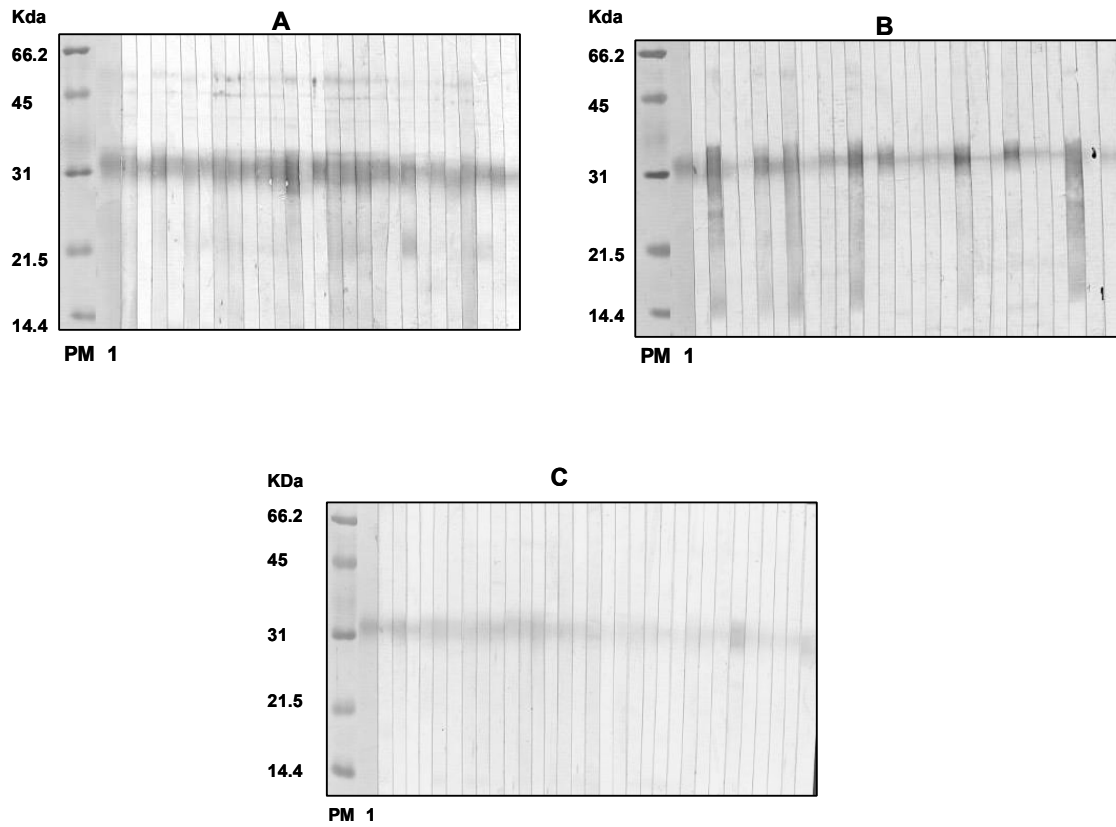


Figura 6. Reactividad del dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot. Los sueros se utilizaron en dilución 1:100. A y B: Sueros de bovinos reactivos a la tuberculina. C: Sueros de bovinos no reactivos. PM: Peso Molecular. Carril 1: Antígeno rPGRS<sup>Rv1818c</sup> teñido con azul de Coomassie.

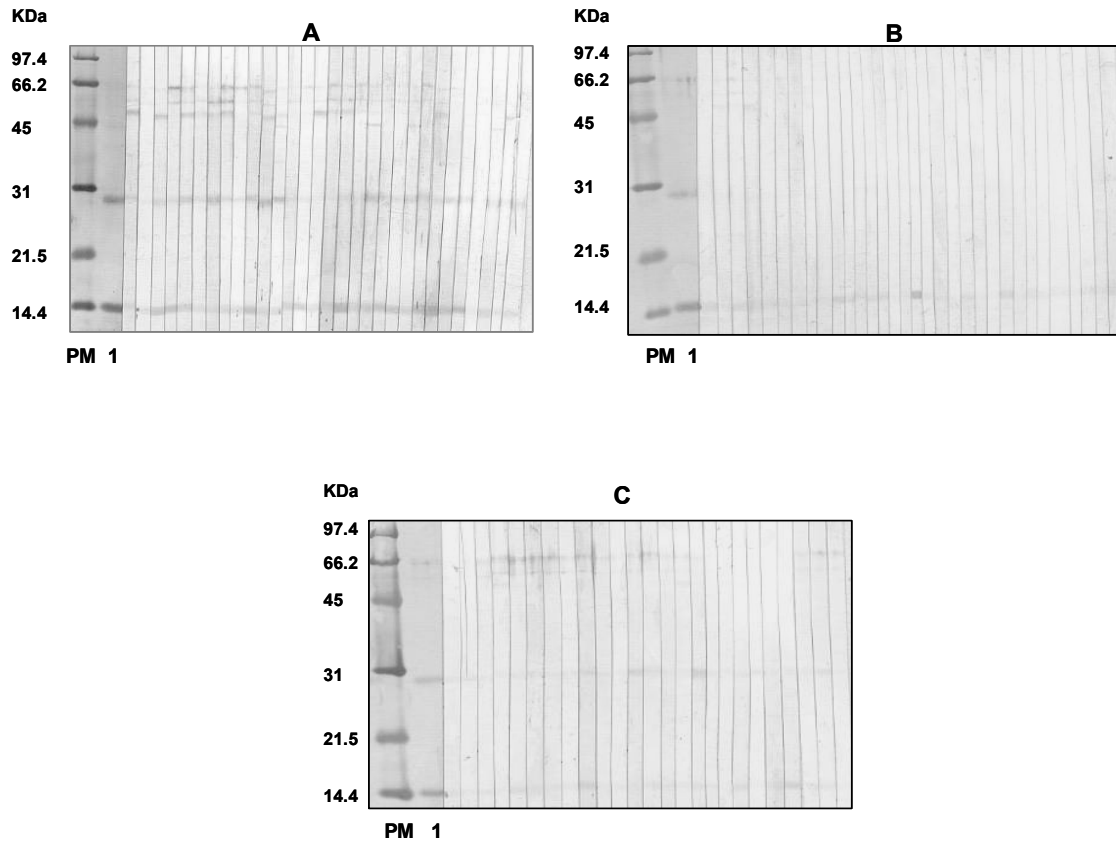


Figura 7. Reactividad del dominio  $rPE^{Rv1818c}$  con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot. Los sueros se utilizaron en dilución 1:100. A y B: Sueros de bovinos reactivos a la tuberculina. C: Sueros de bovinos no reactivos. PM: Peso Molecular. Carril 1: Antígeno  $rPE^{Rv1818c}$  teñido con azul de Coomassie.

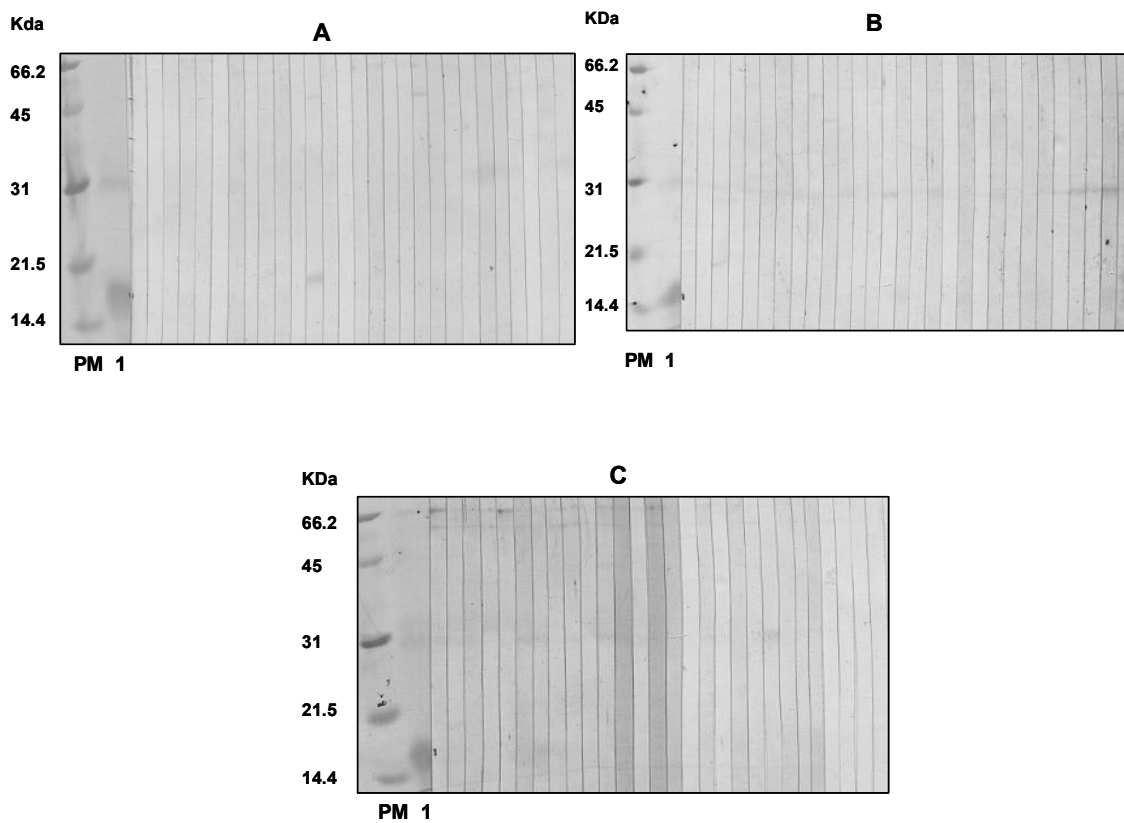
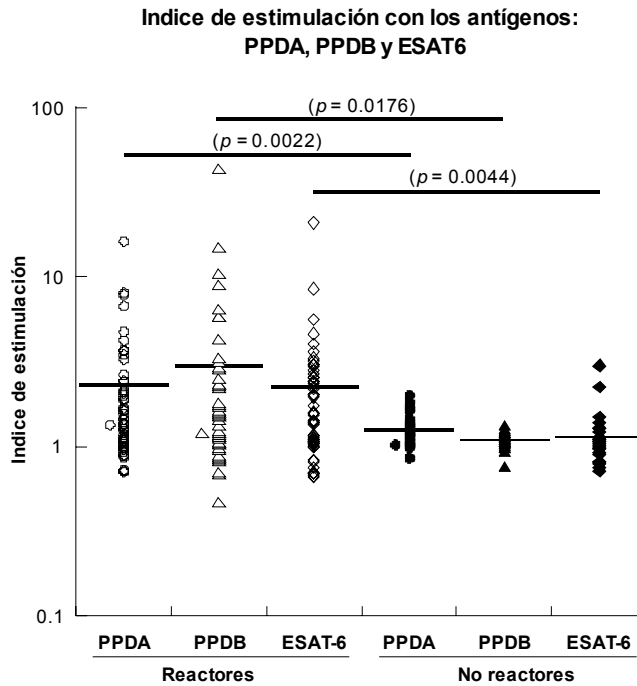
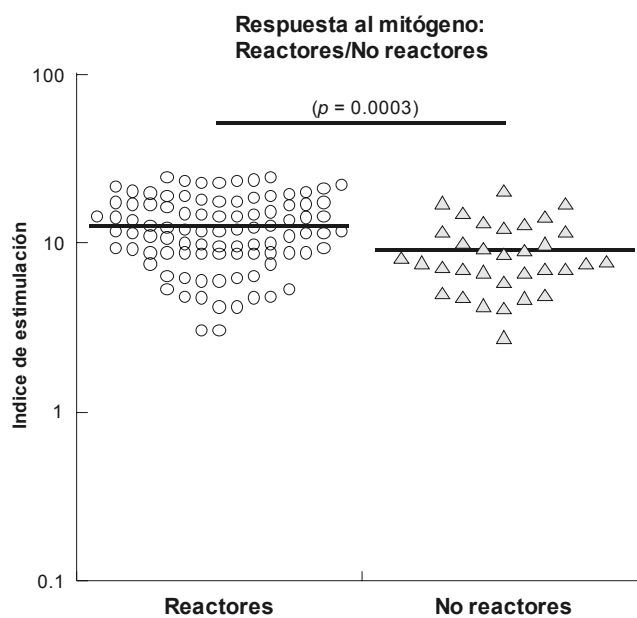


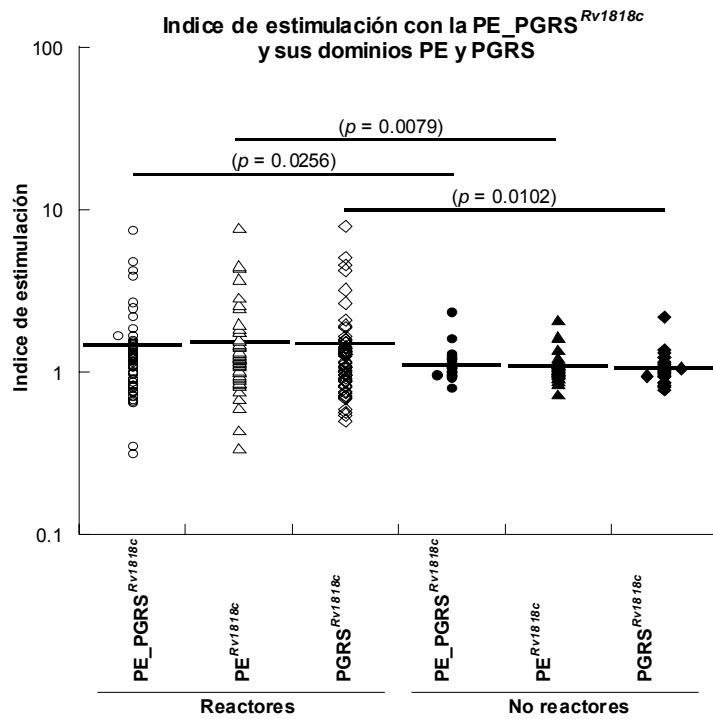
Figura 8. Reactividad del antígeno rESAT-6, con sueros de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina mediante la técnica de Inmunoblot. Los sueros se utilizaron en dilución 1:100. A y B: Sueros de bovinos reactivos a la tuberculina. C: Sueros de bovinos no reactivos. PM: Peso Molecular. Carril 1: Antígeno rESAT-6 teñido con azul de Coomassie.



Gráfica 4. Evaluación de IFN- $\gamma$  en cultivos de sangre periférica obtenida de animales reactores y no reactores a la prueba caudal de la tuberculina. Los cultivos fueron estimulados con un 4 $\mu$ g de derivado proteico purificado aviar y bovino (PPD-A, PPD-B) y rESAT-6. Los valores graficados corresponden al índice de estimulación, estos valores se obtuvieron con el valor promedio de las densidades ópticas para cada antígeno dividido entre el valor promedio obtenido del PBS. La barra horizontal representa el valor de la media.



Gráfica 5. Evaluación de IFN- $\gamma$  en cultivos de sangre periférica obtenida de animales ( $\circ$ ) reactores y ( $\Delta$ ) no reactores a la prueba de la tuberculina. Los cultivos fueron estimulados con un  $1\mu\text{g}$  de mitógeno (Pokeweed). Los valores graficados corresponden al índice de estimulación, estos valores se obtuvieron con el valor promedio de las densidades ópticas del mitógeno dividido entre el valor promedio obtenido del PBS. La barra horizontal representa el valor de la media.



Gráfica 6. Evaluación de IFN- $\gamma$  en cultivos de sangre periférica obtenida de animales reactores y no reactores a la prueba intradérmica de la tuberculina. Los linfocitos fueron estimulados con un 4 $\mu$ g de la proteína completa rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dos dominios de forma independiente rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup>. Los valores graficados corresponden al índice de estimulación, estos valores se obtuvieron con el valor promedio de las densidades ópticas para cada antígeno de estudio dividido entre el valor promedio obtenido con el PBS. La barra horizontal representa el valor de la media.

## 8.0 DISCUSIÓN

Existe un gran interés en el área de TB bovina de identificar antígenos de la micobacteria que pudieran tener un uso potencial en el desarrollo de inmunógenos, así como para la elaboración de reactivos específicos para el diagnóstico de la enfermedad. Esto implica el aislamiento y caracterización de antígenos que estén involucrados en la respuesta inmune.

A la fecha, en TB bovina es poca la investigación que se ha llevado a cabo para identificar los antígenos que puedan favorecer una respuesta inmune. Sin embargo, la secuencia del genoma de las micobacterias del complejo tuberculosis<sup>(17,30)</sup>, ha sido un paso crucial para la caracterización de nuevos antígenos. Entre los genes que han llamado la atención por su gran polimorfismo están los miembros de la familia multigénica PE y dentro de esta un miembro típico de la subfamilia PE\_PGRS, es la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, la cual se encuentra en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* (Mb1849c) y *M. bovis* BCG (BCG\_1853c) las dos últimas tienen un 99.9% de homología con la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, la diferencia radica en una delección de 3 aa en el dominio rico en alanina y glicina (PGRS). El gen *Rv1818c*, tiene un tamaño promedio 500 aminoácidos y muestra 60% de identidad con el gen PE\_PGRS<sup>Rv1756c</sup>. Como muchos otros genes PE\_PGRS, el gen *Rv1818c* codifica para una proteína con alto contenido de alanina (20%) y glicina (41%) encontrándose en repeticiones a lo largo del dominio PGRS, además de la región N-terminal de estas proteínas presentan alta homología con las proteínas PE.

Por otro lado, la expresión de algunas proteínas rPE\_PGRS ha sido evaluada en estudios clínicos con pacientes infectados por *M. tuberculosis*, observando que el dominio PGRS de la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1759c(37)</sup> es el blanco de la respuesta inmune humoral. Así mismo, en resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio se encontró que en el suero de los bovinos reactivos a la prueba de la tuberculina se reconoce fuertemente el dominio PGRS de la proteína Rv1759c. Estos resultados coinciden con los observados por Brennan y col. (2001) quienes estudiaron la respuesta inmune a la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> en el ratón. Los autores observaron, que la respuesta inmune humoral estaba dirigida contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> ya que solo los animales inmunizados con plásmidos que contenían al gen *Rv1818c* completo mostraron una respuesta de anticuerpos, mientras que los inmunizados con el plásmido que contenía el gen que codifica para el dominio PE no se detectaron anticuerpos contra rPE<sup>Rv1818c</sup>. De estas

observaciones se deduce que es en el dominio PGRS en donde radican los epitopes B. Interesantemente es también en este dominio donde se encuentra el polimorfismo de estas moléculas y por lo tanto el dominio que contribuye mayormente a la variación antigénica. Se esperaría entonces que los antisueros contra una proteína PE\_PGRS presenten una reactividad cruzada con otras proteínas PE\_PGRS pero no necesariamente con todas<sup>(6)</sup>. En el caso de respuesta celular se observó que esta estaba dirigida principalmente contra el dominio PE y no se detectó respuesta contra la proteína completa, lo cual llevo a suponer que la región PGRS podría estar inhibiendo la respuesta celular al dominio PE.

Con el fin de estudiar la respuesta inmune a la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios PGRS<sup>Rv1818c</sup> y PE<sup>Rv1818c</sup> de manera independientes, en este trabajo se evaluó la respuesta inmune humoral y celular de bovinos reactivos y no reactivos al PPD contra la proteína rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y sus dominios.

Para este propósito, fue necesario primero, obtener los antígenos rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup> recombinantes en *E. coli*. Las diferencias estructurales entre los dominios se vieron reflejadas en la cantidad de proteína producida 1.5mg/l para la rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y el dominio rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y 0.5mg/l para la rPE<sup>Rv1818c</sup> donde su rendimiento es mucho menor que el esperado.

En este trabajo se utilizó también la proteína recombinante ESAT-6 denominado así por su peso molecular de 6 kDa. En su forma nativa esta proteína se encuentra en los filtrados de cultivo de *M. bovis* y *M. tuberculosis* y es un potente antígeno reconocido por las células T el cual se encuentra en el sobrenadante de cultivos de corto tiempo (CFP, short-term culture filtrate). El rendimiento que se obtuvo para esta proteína fue moderado (0.8mg/l) comparando con lo observado por Wang BL y col. (2005) el cual obtuvo 1.2 mg/l de cultivo y con un peso molecular de 11kDa. Estas diferencias pueden deberse a que en el trabajo descrito se utilizó un vector de expresión diferente. En este trabajo la proteína rESAT-6 migra en PAGE-SDS alrededor de los 14.4 kDa ya que tiende a formar dímeros con moléculas de la misma proteína (comunicación personal con la Dra Fabiana Bigi, del Instituto de INTA Buenos Aires Argentina).



Se sabe que la infección con las micobacterias induce una respuesta de anticuerpos específica que es más fácil de detectar durante la enfermedad latente, además de estar correlacionada con la severidad de la enfermedad. Algunos estudios han demostrado que los anticuerpos para varios componentes de *M. bovis* aparecen en diferentes estados de la enfermedad y que la elevación de los títulos de anticuerpos se correlaciona con la severidad de la enfermedad<sup>(74)</sup>.

En nuestro estudio encontramos que los títulos más altos de anticuerpos medidos por ELISA en el suero de bovinos reactivos al PPD están dirigidos contra el dominio PGRS<sup>Rv1818c</sup> y la proteína completa PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>. Sin embargo, con el mismo método, no se detectaron anticuerpos contra el dominio PE<sup>Rv1818c</sup> en los bovinos reactivos al PPD. Estos resultados fueron corroborados por el inmunoblot para las proteínas PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y PGRS<sup>Rv1818c</sup>, sin embargo un 45% de animales mostró reactividad contra el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup>. Estas diferencias podrían deberse a que la desnaturalización que sufre el dominio rPE<sup>Rv1818c</sup> expone algunos epítopes más inmunogénicos que no son reconocidos cuando la proteína se encuentra de forma soluble.

La producción de anticuerpos observada con los bovinos no reactivos al PPD comparada con los bovinos reactivos al PPD fue menor, utilizando los tres antígenos del estudio.

Los resultados confirman que la respuesta de anticuerpos está dirigida hacia epítopes que se encuentran en el dominio PGRS de la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, indicando que ciertos genes PE\_PGRS que expresan el dominio inmunogénico PGRS, se producen durante la infección con *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

En bovinos experimentalmente infectados *M. bovis* se ha visto una producción elevada de anticuerpos contra los antígenos de 16kDa y ESAT-6, esta última fue reconocida en alta proporción hasta 27 meses después de la infección, sin embargo, a periodos más largos post-infección los niveles de anticuerpos bajaron significativamente<sup>(62)</sup>. También se han detectado anticuerpos en contra de la proteína de 16kDa y ESAT-6 en tuberculosis humana en estudios previos hechos por Lyashchenko y col. (1998), concluyendo que estas dos proteínas son potentes antígenos seroreactivos tanto en humanos como en bovinos. En nuestro estudio observamos una baja producción de anticuerpos en los bovinos reactivos contra la proteína ESAT-6 mediante la prueba de ELISA, mientras que

por inmunoblot esta proteína no fue reconocida con ninguno suero de los bovinos analizados. Estas diferencias podrían radicar en el tiempo que tenían los animales con la infección natural, así como nos indica que la proteína desnaturalizada pierde su capacidad de ser reconocida por los anticuerpos.

Uno de los antígenos más usados para el diagnóstico de la tuberculosis bovina es el PPD ó tuberculina el cual tiene una alta sensibilidad para el diagnóstico pero poca especificidad debido a que comparte epítopes con varias micobacterias ambientales así como con otro tipo de bacterias. El método diagnóstico hecho *in vivo* (prueba dérmica) o *in vitro* (IFN- $\gamma$ ) comparan la respuesta generada por el PPD-de *M. bovis* (PPD-B) y el PPD-de *M. avium* (PPD-A) con la finalidad de diferenciar la respuesta inmune generada para cada micobacteria. Se ha tratado de mejorar la especificidad de las pruebas utilizando antígenos específicos, sobretodo aquel que pueda distinguir la infección con *M. bovis* de *M. avium* así como de otras micobacterias ambientales. La proteína ESAT-6 esta presente únicamente en *M. tuberculosis* y *M. bovis* y ha destacado por su capacidad de actuar sobre las células T como fuerte inductor de la producción de IFN- $\gamma$  en la infección con tuberculosis, Se ha visto que usando este antígeno en ensayos basados la producción de IFN- $\gamma$  aumenta la especificidad cuando se compara con el PPD-B<sup>(11)</sup>. También se ha visto que es capaz de discriminar en bovinos infectados con *M. bovis* de forma natural y bovinos sensibilizados con micobacterias ambientales ó vacunados contra paratuberculosis.

En el presente trabajo, el índice de estimulación más alto se observó con las células de los bovinos reactivos al PPD estimuladas con el PPD-B. Sin embargo, cuando analizamos el IFN- $\gamma$  producido por el estímulo con PPD-A en las células de los bovinos no reactivos al PPD el índice de estimulación fue mas alto que con el PPD-B. Estos resultados sugieren que los bovinos reactivos al PPD están infectados con *M. bovis* ya que la cantidad de IFN- $\gamma$  secretado es mayor con el PPD-B que con el PPD-A. Lo contrario sucede con los bovinos no reactivos al PPD ya que hay mayor cantidad de IFN- $\gamma$  secretado cuando se estimularon las células con el PPD-A fue mayor que con el PPD-B reflejando con esto que los bovinos pudieran estar infectados con *M. avium* o quizás hayan sido expuestos a otras micobacterias del ambiente que pueden presentar reacción cruzada. De igual forma se evaluó la respuesta de los bovinos antes mencionados con el antígeno ESAT-6. Los resultados muestran que en los animales reactivos al PPD la secreción de IFN- $\gamma$  fue

menor que la observada con el PPD-B y para los no reactores la cantidad de IFN- $\gamma$  fue igual que para el PPD-B

Si bien el uso de un mitógeno como un control positivo no se considera en muchos trabajos, su inclusión en el diseño experimental es absolutamente necesaria. La inclusión de un mitógeno (pokeweed) nos permitió comparar el grado del estímulo el cual fue similar al encontrado en otros estudios<sup>(76)</sup>. En general las células bovinas responden con una alta producción de IFN $\gamma$ . Se ha reportado que la secreción de IFN- $\gamma$  secretada en respuesta al mitógeno en bovinos con paratuberculosis subclínica y paratuberculosis clínica es elevada<sup>(76)</sup>. La utilización de este control nos da una visión amplia para poder validar los resultados de la prueba del IFN- $\gamma$  ya que permite determinar la calidad de las células a ser estimuladas con los antígenos bacterianos en estudio y por lo tanto que los resultados sean comparables. En este caso cabe mencionar que las diferencias entre las medias de los reactores (11.76) y los bovinos no reactores (7.73) se deba a la cantidad de animales estudiados por grupo ya que el número de bovinos en el grupo reactor fue de 58 y en los no reactores fue de 32.

Se sabe poco sobre la función de la familia génica PE aunque se ha demostrado que algunas proteínas PE\_PGRS son preferentemente expresadas dentro de las células del hospedero. De esta forma la inmunogenicidad de la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> ha sido estudiada en un modelo murino, donde se ha investigado la respuesta inmune celular contra la PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y contra su región PE<sup>Rv1818c</sup> mediante la inmunización con construcciones de DNA, observándose que la respuesta inmune celular medida por la producción de IFN- $\gamma$  fue inducida principalmente por la región PE<sup>(21)</sup>. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente trabajo, donde la producción de INF- $\gamma$  inducida por la proteína completa y el dominio PGRS en los animales reactores fue significativamente más alta a la obtenida con el dominio PE. Resultados similares ya habían sido observados en nuestro laboratorio en bovinos infectados con *M. bovis* utilizando el dominio PGRS de la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1759c</sup> miembro de la subfamilia PE\_PGRS.

En contraste con los resultados obtenidos de la respuesta inmune humoral inducida por la proteína PGRS<sup>Rv1818c</sup> de los bovinos reactores al PPD, la secreción de IFN- $\gamma$  producido por el estímulo de las células de sangre periférica de estos bovinos reactores a la

tuberculina con los antígenos rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>, rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup> se observó que no hubo diferencias significativas en la producción de INF- $\gamma$  inducida por cada dominio con respecto a la proteína completa. Sin embargo, cuando se evaluaron estos tres antígenos en células de bovinos no reactivos al PPD se observó una disminución en la secreción de INF- $\gamma$  con un estímulo similar para los tres antígenos. Estos resultados demuestran que tanto la proteína como sus dominios son capaces de inducir una respuesta celular en bovinos y descartan la posibilidad de que el dominio rico en glicina y alanina (PGRS) este modulando la respuesta del dominio PE según lo reportado por Delogu et al (2001).

## 9.0 CONCLUSIONES:

En los bovinos reactivos a la prueba de la tuberculina (PPD), la respuesta inmune humoral está dirigida principalmente hacia la región carboxiterminal rica en glicina y alanina (dominio PGRS) de la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup>.

Al evaluar la respuesta inmune humoral en suero de bovinos no reactivos al PPD no se encontraron anticuerpos que reconocieran epítopes en la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> o en algunos de los dominios (PGRS<sup>Rv1818c</sup> y PE<sup>Rv1818c</sup>).

La producción de IFN- $\gamma$  por células de memoria presentes en sangre periférica de bovinos reactivos al PPD estimulada *in vitro* con los antígenos PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> dominio PGRS<sup>Rv1818c</sup> y el dominio PE<sup>Rv1818c</sup> fue mayor que el observado en los bovinos no reactivos al PPD.

La proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> así como sus dominios PGRS<sup>Rv1818c</sup> y PE<sup>Rv1818c</sup> son capaces de inducir una respuesta celular en bovinos

## 10.0 BIBLIOGRAFIA:

- 1.- **Aagaard C., M. Govaerts, V. Meikle, AJ. Vallecillo, JA. Gutierrez-Pabello, F. Suarez-Güemes, J. McNair, A. Cataldi, C. Espitia, P. Andersen, JM. Pollock.** 2006. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT-6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(12):4326-4335.
- 2.- **Abou-Zeid C., Garbe T., Lathigra R., Wiker HG., Harboe M., Rook GA., Young DB.** 1991. Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect Immun*. Aug; 58(8):2712-8.
- 3.- **Annon.** 1984. Ann report on research and technical work, Belfast. Her Majesty's Stationery Office. pp 244.
- 4.- **Annunziato F., Galli G., Romagnani P., Cosmi L., Manetti R., Maggi E., Romagnani S.** 1999. Chemokine receptors and other surface molecules preferentially associated with human Th1 or Th2 cells. *Microbes and Infection*. 1:103-106.
- 5.- **Ausina RV.** 1995. Tuberculosis. Farrera Valenti, P. 13<sup>o</sup> edición. Mosby/Doyma libros. Madrid. pp2367-2371.
- 6.- **Banu S., Nonoré N., S-J Brigitte, Philpott D., Prevost MC., Cole TS.** 2002. Are the PE\_PGRS Proteins Of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens?. *Molecular Microbiology*. 44 (1):9-19.
- 7.- **Biet F., Boschioli ML., Thorel MF., Guilloteau L.A.** 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Sciences*, review article. 36, 411-436.
- 8.- **Bloom BR.** 1994. Tuberculosis. Patogénesis, protection and control. Ed. Woward Hughes Medical Research Institute / Albert Einstein College of Medicine. NY, USA. pp 3-47.
- 9.- **Brennan MJ., G. Delogu, Y. Chen, S. Bardarov, J. Kriakov, M. Alavi, and W. R. Jacob, Jr.** 2001. Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interaction with other cell. *Infect. Immun*. 69:7326-7333.
- 10.- **Brennan, MJ Delogu.** 2002. The PE multigene family: a "molecular mantra" for mycobacteria. *Trends in Microbiol*, 10:246-249.
- 11.- **Bryce M., Buddle, Pollock MJ.** 2001. Use of the ESAT-6 in interferon gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin test. *Vet Microbiol*. 80:37-40.
- 12.- **Buddle BM., Aldwell FE.** 1995. Experimental *M bovis* infection in cattle: effect of the dose of *M bovis*, pregnancy and immune response and distribution of lesions. *N. Zeland Vet. Journal*. 42:167-172.

- 13.- Cagiola M., Feliziani F., Severi G., Pasquali P., Rutili D.** 2004. Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11:952-956.
- 14.- Caruso A., Serbina N., Triebold K., Bloom B., Flyb J.** 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of INF- $\gamma$ , yet succumb to tuberculosis. *J Immunol*. 162:5407-16.
- 15.- Cauten GM., Pio A., Tem Dam HG.** 2002 Annual Risk of Tuberculosis Infección. *Bull World Health Organ*. 80(6):503-11.
- 16.- Charles O., Thoen, DVM, PHd, James H. Steele, DVM, MPH.** *Mycobacterium bovis* infection in animal and humans. Iowa state university press/ Ames. 1995 1er. edición.
- 17.- Cole ST., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S V., Eiglmeier K., Gas S., Barry III CE., Tekai F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail MA., Rajandream MA., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulton JE., Taylor K., Whitehead S., Barrell DG.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393-537.544.
- 18.- Cole ST.** 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. 85:2919-28.
- 19.- Cole ST., Eiglmeier K., Parkhill J., James KD., Thomson NR., Wheeler PR., Honore N., Garnier T., Churcher C., Harris D., Mungall K., Basham D., Chillingworth T., Connor R., Davies RM., Devlin K., Duthoy S., Feltwell T., Fraser A., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jogels K., Lacroix C., Maclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Quail MA., Rajandream MA., Rutherford KM., Rutter S., Seeger K., Simon S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Taylor K., Whitehead S., Woodward JR., Barrell BG.** 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. Feb; 409(6823):1007-11.
- 20.- Collins FM.** 1993. Tuberculosis: the return of an old enemy. *Crit Rev. Microbiol*. 19:1-16.
- 21.- Costello E., O'Rielly PF., Yearsley DK., Collins JD., Monaghan ML., Basset HF.** 1997. A study of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of tuberculosis in cattle. *Irish Veterinary Journal*. 50:35-38.
- 22.- Delogu G., Brennan MJ.** 2001. Comparative immune response to PE and PE-PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*. 69:5606-5611.
- 23.- Dheenadhayalan V., Delogu G., Sanguinetti M., Fadda G., Brennan M.** 2006. Variable expression patterns of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS genes: Evidence that PE\_PGRS16 and PE\_PGRS26 are inversely regulated in vivo. *J Biol Chem*; 281(10):3721-5.

- 24.- **Dillner J., Sternas L., Kallin B., Alexander H., Ehlin-Henriksson D., Jornall H., Klein G., Lerner R.** 1984. Antibodies against a synthetic peptide identify the Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen. *Proc. Natk. Acad. Sci. USA* 81:4652-56.
- 25.- **Drappe P.** 1991. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. *Res. Microbiol.* 142:420-422.
- 26.- **Espitia C., Laclette JP., Mondragon-Palomino M., Amador A., Campuzano J., Martens A., Singh M., Cicero R., Zhang Y., Moreno C.** 1999. The PE-PGRS-glycine-rich proteins *Mycobacterium tuberculosis*; a New family of fibronectin-binding proteins?. *Microbiol.* 145:3487-3895.
- 27.- **Estrada-Chávez C., Mancila R., Arriaga DC., Otero DF.** 2001. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Veterinaria México.* 32(3):207-211.
- 28.- **Fleischmann RD., Alland D., Eisen JA., Carpenter L., White O., Peterson. J., Deboy R., Dodson R., Gwinn M., Haft D., Hickey E., Kolonay JF., Nelson WC., Umayam LA., Ermolaeva M., Salzberg SL., Delcher A., Utterback T., Weidman J., Khouri H., Gill J., Mikula A., Bishai W., Jacobs Jr WR., Venter JC., Fraser CM.** 2002. Whole-genome comparasion of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.* Oct;184(19):5479-90.
- 29.- **Flyn LJA., Chan J.** 2001 Immunology of the tuberculosis. *Annual Review of Immunology.* 19:93-129.
- 30.- **Garnier Thierry, Karin Eiglmeier, Jean-Christophe Camus, Nadie Medina, Huma Mansoor, Melinda Pryor, Stephanie Duthoy, Sophie Grondin, Celine Lacroix, Chistel Monsempe, Sylvie Simon, Barbara Harris, Rebeca Atkin, Jon Doggett, Rebeca Mayes, Lisa Keating, Paul R. Eheeler, Julian Parkhill, Bart G. Barrell, Stewart T. Cole, Stephen V. Gordon, R. Glyn Hewinson.** 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Microbiology.* 1-6.
- 31.- **Goldsby R., Kindt T., Osborn B., Kuby J.** In *Immunology.* 2003. W. H. Freeman and Company.
- 32.- **González OR., Gutierrez CB.** 1999. Field evaluation of the single intraderma cervical tuberculin test and the interferon gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *70:55-66.*
- 33.- **Goodchild AV., Clifton-hadley RS.** 2001. Cattle-to-Cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis.* 81(1/2):23-41.
- 34.- **Gormley E., Goyle MB., Fitzsimons T., McGill K., Collins JD.** 2005. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam<sup>R</sup>) assay. *Veterinary Microbiology.*
- 35.- **Hayashi CY., Lewis RV.** 1998. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *J Mol. Biol.* Feb 6;275(5):773-84.



**36.- Hermoso de Mendoza SM.** 1992 Tratado de Veterinaria práctica. Tuberculosis Bovina. Madrid, España. pp21-32.

**37.- Jaime Campuzano, Diana Aguilar, Kutzy Arriaga, Juan Carlos León, Laura Patricia Salas-Rangel, Jorge González-Y-Merchand, Rogelio Hernández Pando, Clara Espitia.** 2007. The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS Rv1759c antigen is an efficient subunit vaccine to prevent reactivation in a murine model of chronic tuberculosis. *Vaccine*, 25(18):3722-3729.

**38.- Jiménez MMC., Báez SR., Linares CM., Chávez SR., Lascurain LR., Zenteno GE.** 2001. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER.* 14:39-48.

**39.- Kaufman S.** 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*. 1(1): 20-30.

**40.- Levitskaya J., Coram M., Levitsky V., Imreh S., Steiger-wald-Mullen, Klein G., Kurille MG., Massuci MG.** 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*. 375:685-688.

**41.- Levitskaya J., Sjaripo A., Leonchicks A., Ciechanover A., Massuci MG.** 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94;12216-21.

**42.- Lyashchenko K., R. Colangeli MH.** 1998. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect. And Immun.* 66: 3936-3940.

**43.- Li Lingling, Bannantie John P., Zhang Quing, Amonsin Alongkorns, May Barbara J., Alt David, Banerji Nilanjana, Kanjilal Sagarika, Kapur Vivek.** 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. August 30;102(35):12344-9.

**44.- Lightbody KA., Skucce RA., Nelly SD., Pollock JM.** 1998. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet. Rec.* 142:295-300.

**45.- Manuel AC., Waters RW., Davis WC., Palmer MV., Minion FCh., Estes DM.** 2005. Analysis of Immune Responses Directed toward a Recombinant early secretory antigenic target six-kilodalton protein-culture filtrate protein 10 fusion protein in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Infection and immunity*. 73:6659-6667.

**46.- Monaghan, Doherty ML., Collins.** 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiology*. 40:111-124.

**47.- Morrison WI., Bourne FJ., Cox DR., Donnelly CA., Gettinby G., Woodroffe R.** 2000. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Vet. Rec.* 146:236-242.

- 48.- **Muriaille E., Leo O.** 1998. Revising the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol*, 47:1-9.
- 49.- **Murray P.** 1999. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends in Microbiology*. 7 (9): 366-372.
- 50.- **Neill SD., Bryson DG., Pollock JM.** 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*. 81(1/2):79-86.
- 51.- **Neill SD., Cassidy J., Hanna J., Pollock JM.** 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* in skin test negative cattle with an assay from bovine interferon gamma. *Vet. Rec.* 135:134-135.
- 52.- **Neill SD., Hanna SD., O'Brien JJ.** 1989. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 124,340-347.
- 53.- **Neill SD., O'Brien JJ., Hanna SD.** 1991. Mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculosis cattle. *Vet. Rec.* 124,269-275.
- 54.- **Neill SD., Pollock JM., Bryson DB., Hanna J.** 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet. Rec.* 131:45-47.
- 55.- **Otero DF.** 2000. Aislamiento y caracterización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium bovis* que estimulan linfocitos T de bovino. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina C.U-UNAM:
- 56.- **Otto M., Radostits, Clive C., Gay, Douglas C., Blood, Kenneth W., Hinchcliff.** 2001. *Veterinary Medicine a Textbook of the disease of cattle sheep, pig, goats and horses.* W.B. Saunders Company Ltd.
- 57.- **Palmer MV., Waters RW.** 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know? *Veterinary Microbiology*. 112:181-190.
- 58.- **Pan/American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, regional office of the World Health Organization.** International Meeting on the Eradication of Bovine Tuberculosis in the Americas; Saltillo, Coahuila, México. Nov. 1991. pp 18-20.
- 59.- **Pancholi P., Mirza A., Schauf V., Steinman RM., Bhardway N.** 1993. Presentation of mycobacterial antigens by human dendritic cells; lack of transfer from infected macrophages. *Infect. Immun.* 61:5326-322.
- 60.- **Pollock JM., Girvin RM., Buddle BM.** 2000. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Vet. Rec.* 146:695-665
- 61.- **Pollock JM., McNair J., Welsh MD., Girvi RM., Kennedy HE., Mackie DP., Neill SD.** 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. 81(1/2):103-107.
- 62.- **Pollock JM., McNair J., Bassett H., Cassidy PJ., Costello E., Aggerbeck H., Posenkrands I., Andersen P.** 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(5):1856-1860.

- 63.- Poulet S., Cole TS.** 1995. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch. Microbiol. 163:87-95.
- 64.- Pritchard DG.** 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988. Conquest and controversy. J. Comp. Pathol. 99:357-399.
- 65.- Raja A., Uma Devi KR., Ramalingam B., Brennan PJ.** 2002. Immunoglobulin G, A and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Diag. Lab. Immunology. 9:308-12.
- 66.- Ramakrishnan L., Federspiel NA., Falkow S.** 2000. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the Glycine-rich PE\_PGRS family. Science. 288:1436-39.
- 67.- Rhodes SG., Buddle BM.** 2000. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. Immunology. 99:195-202.
- 68.- Ritacco V., de Kantor L., Barrera L., Errico F.** 1991. Reciprocal cellular and humoral immune response in bovine tuberculosis. Research in Veterinary Science. 50:365-67.
- 69.- Ross BC., Raios K., Jackson K., Dwyer B.** 1992. Molecular cloning of a highly repeat DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J Clin. Microbiol. 30:942-6.
- 70.- Ryan TJ., Buddle BM., Lisle GW.** 2000. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. Research in Veterinary Science. 69:57-61.
- 71.- Sachetto-Martins G., Franco LO., de Oliveira DE.** 2000. Plant glycine-rich protein: a family or just protein with a common motif. Biochimica et Biophysica Acta. 1492:1-14.
- 72.- Schlossberg D.** 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. MC Graw Hill. Cuarta edición. USA.
- 73.- SENASICA.** 2006. [contacto@senasica.sagarpa.gob.mx](mailto:contacto@senasica.sagarpa.gob.mx)
- 74.- Sing KK., Zhang X., Patibandla AS., Chien P Jr, Laal S.** 2001. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. Infect Immun. Jun;69(6):4185-91.
- 75.- Smith PG., Moos AR.** 1994. Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. Epidemiology of tuberculosis. pp 47-62. Bloom, BR. Asm Press. Washington, DC.
- 76.- Sreevatan S., Pan X., Stockbauer KE., Connell ND., Kreiswirth BN., Whittan TS., Musser JM.** ----- Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 294(18):9869-74.

**77.- Stabel J R.** 1996. Production of  $\gamma$ -interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of sub-clinical paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:345-250.

**78.- Vordermeier HM., Whelan A., Cockle PJ., Farrant L., Parmer N., Hewinson RG.** 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 y CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 8:571-578.

**79.- Wang Bao-Lin, Ying Xu, Chao-Qun Wu, Yun-Min Xu, Hong-Hai Wang.** 2005. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification.* 39:184-188.

**80.- Wood PR., Jones SL.** 2001. BOVIGAM<sup>TM</sup>: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 81(1/2):147-55

**81.- Ye ZH., Song YR., Marcus A., Varner JE.** 1991. Comparative localization of three classes of cell wall protein. *Plant J. Sep;*1(2):175-83.

**Anexo1:**

Situación actual de tuberculosis bovina en México.



<b>ERRADICACION</b>	<b>CONTROL</b>
AGUASCALIENTES (A)	AGUASCALIENTES (B)
BAJA CALIFORNIA (A)	BAJA CALIFORNIA (B)
CAMPECHE (A)	CAMPECHE (B)
CHIAPAS (A)	CHIAPAS (B)
DURANGO (A)	DURANGO (B)
GUANAJUATO (A)	GUANAJUATO (B)
GUERRERO (A)	GUERRERO (B)
JALISCO (A1) (A2) (A3) (A4)	JALISCO (B)
MICHOACAN (A)	MICHOACAN (B)
NAYARIT (A)	NAYARIT (B)
OAXACA (A1)	OAXACA (B)
PUEBLA (A1) (A2) (A3)	PUEBLA (B)
TABASCO (A)	TABASCO (B)
ZACATECAS (A)	ZACATECAS (B)
COAHUILA (Excepto La Laguna)	BAJA CALIFORNIA SUR
COLIMA	DISTRITO FEDERAL
CHIHUAHUA	MORELOS
NUEVO LEON	SAN LUIS POTOSÍ
QUINTANA ROO	QUERETARO
SINALOA	HIDALGO
SONORA	MÉXICO
TAMAULIPAS	TLAXCALA
VERACRUZ	
YUCATÁN	05/09/2007

## ANEXO 2:

Comparación entre secuencia que codifican para la proteína PE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> de *M. tuberculosis* y la proteína Mb1849c de *M. bovis*. El alineamiento fue realizado en el programa GeneDoc. La proteína Mb1849c de *M. bovis*, tiene una delección de 3 aminoácidos en la posición 361 de la región carboxiterminal ó dominio PGRS, en comparación con su homóloga en *M. tuberculosis* H37Rv.

Rv1818c:	MSFVVVTIPEALAAVATDLAGIGSTIGTANAAAAPTTTTVLA AAAADEVSAAMAALFSGHAQ	1
Mb1849c:	MSFVVVTIPEALAAVATDLAGIGSTIGTANAAAAPTTTTVLA AAAADEVSAAMAALFSGHAQ	1
Rv1818c:	AYQALSAQAALFHEQFVRALTAGAGSYAAAEASAAPLEGVLDVINAP ALALLGRPLIGN	60
Mb1849c:	AYQALSAQAALFHEQFVRALTAGAGSYAAAEASAAPLEGVLDVINAPALALLGRPLIGN	60
Rv1818c:	GANGAPGTGANGDGGILIGNGGAGGSGAAGMPGGNGGAAGLFGNGGAGGAGGNVASGTA	121
Mb1849c:	GANGAPGTGANGDGGILIGNGGAGGSGAAGMPGGNGGAAGLFGNGGAGGAGGNVASGTA	121
Rv1818c:	GFGGAGGAGGLLYGAGGAGGAGGRAGGGVGGIGGAGGAGGNGLLFGAGGAGSVGGLAAD	181
Mb1849c:	GFGGAGGAGGLLYGAGGAGGAGGRAGGGVGGIGGAGGAGGNGLLFGAGGAGSVGGLAAD	181
Rv1818c:	AGDGGAGGDGGLFFGVGGAGGAGGTGTNVTGGAGGAGGNGLLFGAGGVGGVGGDGVAF	241
Mb1849c:	AGDGGAGGDGGLFFGVGGAGGAGGTGTNVTGGAGGAGGNGLLFGAGGVGGVGGDGVAF	241
Rv1818c:	GTAPGGPGGAGGAGGLFVGGAGGAGGIGLVNGGAGGSGGSALLWGDGGAGGAGGVG	301
Mb1849c:	GTAPGGPGGAGGAGGLFVGGAGGAGGIGLVNGGAGGSGGSALLWGDGGAGGAGGVG	301
Rv1818c:	TGGAGGAGGNAGLLVGAGGAGGAGALGGGATGVGGAGGNGGTAGLLFGAGGAGGAGGF	361
Mb1849c:	TGGAGGAGGNAGLLVGAGGAGGAGALGGGATGVGGAGGNGGTAGLLFGAGGAGG . . FGF	361
Rv1818c:	GGAGGAGGLGKKAGLIGDGGDGGAGGNGTGAKGGDGGAGGGAILVNGGNGGNAGS	421
Mb1849c:	GGAGGAGGLGKKAGLIGDGGDGGAGGNGTGAKGGDGGAGGGAILVNGGNGGNAGS	418
Rv1818c:	GSAGTGGAGGLLGKNGMNGLP	481
Mb1849c:	GSAGTGGAGGLLGKNGMNGLP	478

### ANEXO 3:

Estadísticos de datos obtenidos del promedio del índice de estimulación de células de bovinos reactivos y no reactivos al PPD con el mitógeno (Pokeweed):

	Reactores	No reactivos
Valor Máximo	3.0380001	2.7939999
Valor Mínimo	24.464001	20.693001
Sumatoria	1185.384	303.236
Muestras	58	32
Media	12.746065	9.1889697
Mediana	11.769	7.7309999
RMS	13.928144	10.115853
Desv. estándar	5.6456858	4.2956342
Varianza	31.873768	18.452473
Error estándar	0.58543035	0.74777393
Skewness	0.3296811	0.85791958
Kurtosis	-0.79224776	0.12713065

Resumen de resultados de la prueba de t de Student para datos no pareados con varianzas desiguales. Las comparaciones se realizaron con los valores obtenidos del índice de estimulación de las células estimuladas con el mitógeno.

	Reactores	No Reactores
Muestras	93	33
Media	12.7461	9.18897
Varianza	31.8738	18.4525
Std. Dev	5.64569	4.29563
Std. Err	0.58543	0.747774

Diferencia de medias	3.55709
Degrees of Freedom	73
Valor de t	3.7456
Probabilidad de t	0.0003549
Valor de F	1.727
Probabilidad de F	0.08164

#### ANEXO 4:

Resumen de estadísticos de datos obtenidos del índice de estimulación arrojados por las células de bovinos reactivos y no reactivos estimuladas con el PPD-A, PPD-B y el antígeno rESAT-6:

	Reactores			No reactivos		
	PPDA	PPDB	ESAT-6	PPDA	PPDB	ESAT-6
Val. mínimo	0.70700	0.46399	0.65799	0.85600	0.764	0.72100
Val. máximo	16.1889	43.1959	20.7689	2.01099	1.322	3.003
Sumatoria	133.177	173.651	131.323	40.113	34.749	36.685
Muestras	58	58	58	32	32	32
Media	2.29615	2.99398	2.26418	1.25353	1.08590	1.14640
Mediana	1.3985	1.458	1.4185	1.1735	1.0865	1.0715
RMS	3.34900	6.60971	3.59963	1.28012	1.09107	1.22366
Desv. estándar	2.45922	5.94420	2.82279	0.26374	0.10776	0.43475
Varianza	6.04777	35.3336	7.96816	0.06956	0.01161	0.18901
Error estándar	0.32291	0.78051	0.37065	0.04662	0.01904	0.07685
Skewness	3.69123	5.65175	5.17223	1.18886	-0.47762	2.98657
Kurtosis	16.4385	34.7011	30.4510	0.93899	1.31286	9.57507

Resultado de la prueba de t de Student para datos no pareados con varianzas desiguales realizados sobre los valores obtenidos del índice de estimulación con el antígeno PPD-A en células de bovinos reactivos y no reactivos al PPD.

	Reactores	No Reactores
Muestras	58	32
Media	2.29616	1.25353
Varianza	6.04777	0.0695626
Std. Dev	2.45922	0.263747
Std. Err	0.322912	0.0466244

Diferencia de medias	1.04262
Degrees of Freedom	59
Valor de t	3.1957
Probabilidad de t	0.002236
Valor de F	86.94
Probabilidad de F	< .0001



Continuación anexo 4

Resultado de la prueba de t de Student para datos no pareados con varianzas desiguales realizados sobre los valores obtenidos del índice de estimulación con el antígeno PPD-B en células de bovinos reactivos y no reactivos al PPD-

	Reactivos	No Reactivos
Muestras	58	32
Media	2.99398	1.08591
Varianza	35.3336	0.0116123
Std. Dev	5.94421	0.107761
Std. Err	0.780513	0.0190496

Diferencia de medias	1.90808
Degrees of Freedom	57
Valor de t	2.4439
Probabilidad de t	0.01764
Valor de F	3043
Probabilidad de F	< .0001

Resultado de la prueba de t de Student para datos no pareados con varianzas desiguales realizados sobre los valores obtenidos del índice de estimulación con el antígeno rESAT-6 en células de bovinos reactivos y no reactivos al PPD-

	Reactivos	No Reactivos
Muestras	58	32
Media	2.26419	1.14641
Varianza	7.96817	0.189014
Std. Dev	2.82279	0.434757
Std. Err	0.370651	0.076855

Diferencia de medias	1.11778
Degrees of Freedom	61
Valor de t	2.9529
Probabilidad de t	0.004446
Valor de F	42.16
Probabilidad de F	< .0001

## ANEXO 5:

Resumen de estadísticos de datos obtenidos de promedio de densidades ópticas obtenidas del reconocimiento antigénico en suero de bovinos reactivos y no reactivos al PPD frente al antígeno rESAT-6 por el ELISA.

	Reactivos	No reactivos
Valor mínimo	0.094999999	0.125
Valor máximo	0.52450001	0.2545
Sumatoria	14.6955	5.7695
Muestras	55	31
Media	0.26719091	0.1861129
Mediana	0.2475	0.18449999
RMS	0.29141577	0.18873067
Desv. estandar	0.11740002	0.031842768
Varianza	0.013782764	0.0010139619
Error estandar	0.015830215	0.00571913
Skewness	0.44233842	0.31432414
Kurtosis	-0.92053687	-0.18886986

Resultado de la prueba de t de Student para datos no pareados con varianzas desiguales realizados sobre el promedio de las densidades ópticas del reconocimiento antigénico con el rESAT-6 en suero de bovinos reactivos y no reactivos al PPD.

	Reactivos	No Reactivos
Muestras	55	31
Media	0.267191	0.186113
Varianza	0.0137828	0.00101396
Std. Dev.	0.1174	0.0318428
Std. Err	0.0158302	0.00571913

Diferencia de medias	0.081078
Degrees of Freedom	66
Valor de t	4.817
Probabilidad de t	< .0001
Valor de F	13.59
Probabilidad de F	< .0001

## ANEXO 6:

Resumen de estadísticos de datos obtenidos de promedio de densidades ópticas obtenidas del reconocimiento antigénico en suero de bovinos reactivos y no reactivos al PPD frente a los antígenos rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y los dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup> por el ELISA.

	Reactores			No reactivos		
	PE_PGRS <sup>Rv1818c</sup>	PE <sup>Rv1818c</sup>	PGRS <sup>Rv1818c</sup>	PE_PGRS <sup>Rv1818c</sup>	PE <sup>Rv1818c</sup>	PGRS <sup>Rv1818c</sup>
Mínimo	0.07850	0.02999	0.089002	0.14399	0.1055	0.132
Maximo	0.61750	0.29699	0.6275	0.44299	0.28999	0.49000
Sumatoria	17.5765	8.999	18.5855	7.89450	5.6495	9.35450
Muestras	55	55	55	31	31	31
Media	0.31957	0.16361	0.299499	0.25466	0.18224	0.30175
Mediana	0.31099	0.155	0.337918	0.25	0.1675	0.28200
RMS	0.36056	0.17930	0.381303	0.26501	0.19024	0.31904
Std. Dev	0.16851	0.07403	0.178273	0.07455	0.05549	0.10531
Varianza	0.02839	0.00548	0.031781	0.00555	0.00307	0.01109
Std. Err	0.02272	0.00998	0.024038	0.01338	0.00996	0.01891
Skewness	0.09355	0.08281	0.143381	0.42214	0.60968	0.29333
Kurtosis	-1.39992	-1.1214	-1.51479	-0.58621	-0.86969	-1.1953

Resumen de resultados de la prueba de análisis de varianza (ANOVA) realizado con el promedio de las densidades ópticas del reconocimiento antigénico con las proteínas rPE\_PGRS<sup>Rv1818c</sup> y los dominios rPGRS<sup>Rv1818c</sup> y rPE<sup>Rv1818c</sup>, comparando los grupos de bovinos reactivos y no reactivos a la tuberculina.

Grupos			P 95%	
PE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> vs PE <sup>Rv1818c</sup>	0.1559	6.382	< .0001	0.083545 to 0.22836
PE_PGRS <sup>Rv1818c</sup> vs PE <sup>Rv1818c</sup>	0.13731	4.772	< .0001	0.05205 to 0.22261
PE <sup>Rv1818c</sup> vs PGRS <sup>Rv1818c</sup>	-0.1743	7.133	< .0001	-0.24671 to -0.10189
PE <sup>Rv1818c</sup> vs PE_PGRS <sup>Rv1818c</sup>	-0.0910	3.163	0.0262	-0.17632 to -0.005762
PE <sup>Rv1818c</sup> vs PGRS <sup>Rv1818c</sup>	-0.1381	4.800	< .0001	-0.22342 to -0.052859
PGRS <sup>Rv1818c</sup> vs PE <sup>Rv1818c</sup>	0.1556	5.409	< .0001	0.070396 to 0.24096
PE <sup>Rv1818c</sup> vs PGRS <sup>Rv1818c</sup>	-0.1195	3.672	0.0044	-0.21596 to -0.023067