



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Gen de la invasina Mce2A de *Mycobacterium bovis*: Su expresión *in vitro* e *in vivo*, generación y evaluación de una vacuna mutante ($\Delta mce2A$), proteína recombinante (Mce2Ar) y herramienta de diagnóstico para la tuberculosis.

T E S I S

**QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

EDGAR ALFONSECA SILVA

Tutor principal: Rogelio Enrique Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Comité Tutor:

José Ángel Gutiérrez Pabello

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM

Ángel Cataldi

Instituto de Biotecnología, INTA Castelar - Argentina

México D.F. enero 2013



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.

El autor da consentimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Edgar Alfonseca Silva

Agradecimientos

BECA DE DOCTORADO DEL PROGRAMA DE APOYOS PARA LA SUPERACIÓN DEL PERSONAL ACADÉMICO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

PROGRAMA DE COLABORACIÓN BILATERAL MÉXICO-ARGENTINA PROYECTO: CONICET/CONACYT J000.345.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y Dr. Ángel Cataldi, por su dirección y comentarios para llevar a cabo este proyecto.

Dra. Fabiana Bigi y Dr. Federico Blanco del Instituto de Biotecnología del INTA-Castelar, Argentina, por su apoyo en la producción de la mutante $\Delta mce2$ del *M. bovis* y técnicas de cuantificación de la expresión del gen *mce2* de *M. bovis*.

Dra. Dulce Mata Espinosa, Dra. Nesty Olivares Arzuaga, Dr. Jorge Barrios Payan y compañeros del Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por su apoyo y consejos en esta experiencia.

MC. Cristina Parada Colin del Laboratorio de Inmunología y micobacterias del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su apoyo en la purificación de la proteína recombinante Mce2A y producción de anticuerpos policlonales α -Mce2A.

MC. Uziel Castillo Velazquez del Laboratorio de Tuberculosis Bovina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por su apoyo en las técnicas de cuantificación de la expresión génica de macrófagos bovinos infectados con *M. bovis*.

Ricardo Aguilar Guadarrama y Juan Carlos León, del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por su apoyo en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunomicroscopía electrónica.

CON TODO MI AMOR PARA ALEX Y ARI

Tabla de contenido

Resumen	9
Abstract	11
1.- INTRODUCCIÓN	13
1.1.- Tuberculosis bovina, características, transmisión e impacto en la salud pública	14
1.2.- Desarrollo de lesiones y respuesta inmune	15
1.3.- Estrategias de vacunación.....	15
2.- JUSTIFICACIÓN.....	18
3.- HIPÓTESIS.....	19
4.- OBJETIVO GENERAL	19
4.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5.- MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	20
5.2.- Expresión del gen <i>mce2A</i> (mammalian cell-entry) del operon <i>mce2</i> de <i>M. bovis</i> en diferentes condiciones de cultivo in vitro e in vivo y localización de la invasina Mce2A en tejido infectado	21
5.3.- Expresión del gen que codifica para la invasina Mce2A en un cultivo bacteriano de <i>M. bovis</i> in vitro	21
5.4.- Expresión del gen que codifica para la invasina Mce2A en un cultivo de macrófagos infectados con <i>M. bovis</i> in vitro	22
5.5.- Extracción de RNA de <i>M. bovis</i>	23
5.6.- Expresión del gen <i>mce2A</i> y localización de la invasina Mce2A de <i>M. tuberculosis</i> en tejido pulmonar en una cinética de infección en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.....	24
5.7.- Extracción de RNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en tejidos pulmonares de ratones infectados.....	24
5.8.- Expresión y purificación de la invasina Mce2A recombinante de <i>M. bovis</i>	25
5.9.- Inmunohistoquímica e Inmunomicroscopía electrónica de tejido pulmonar de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	26
5.10.- Tinción de inmunohistoquímica	26
5.11.- Tinción de Inmunomicroscopía electrónica	26
5.12.- Técnica de inmunomicroscopía electrónica para la localización de antígenos	26
5.13.- Utilidad del anticuerpo policlonal anti- Mce2A en el diagnóstico de la tuberculosis	27
5.14.- Ensayo de inmunogenicidad de la proteína Mce2A.....	27
5.15.- Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>M. tuberculosis</i> utilizando el anticuerpo α -Mce2A	27

5.16.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de <i>M. bovis</i> en cultivo de macrófagos bovinos.....	28
5.17.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de <i>M. tuberculosis</i> en ratones Balb/c en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.....	28
5.18.- Modelo Experimental de Tuberculosis Pulmonar Progresiva en ratones Balb/c...29	
5.19.- Ensayo microbicida y expresión de genes selectos de macrófagos bovinos derivados de animales con fenotipo natural de Resistencia o Susceptibilidad a patógenos intracelulares e infectados con la cepa atenuada de <i>M. bovis</i> $\Delta mce2$ o con la cepa virulenta de <i>M. bovis</i> AN5.	30
5.20.- Ensayo microbicida	30
5.21.- Cuantificación de ARNm de genes selectos de macrófagos bovinos infectados con <i>M. bovis</i> por PCR Tiempo Real	31
5.22.- Análisis Estadístico.....	34
5.23.- Evaluación de la cepa mutante $\Delta mce2A$ de <i>M. bovis</i> como candidato a ser utilizado como vacuna contra la tuberculosis en un modelo murino.	34
5.24.- Modelo Experimental de Tuberculosis Pulmonar Progresiva en ratones Balb/c...34	
A) Sobrevida.....	35
B) Evolución de la infección	35
C) Atenuación de la virulencia.....	35
D) Comparación de la diseminación e inmunogenicidad de BCG y la mutante de <i>M. bovis</i> $\Delta mce2$ en ratones vacunados antes del desafío	35
E) Inmunogenicidad	36
5.25.- Protección contra las cepas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y <i>M. tuberculosis</i> LAM 09995186 y contra cepas las de <i>M. bovis</i> AN5, 534 y 04-302 en ratones Balb/c vacunados con la mutante <i>M. bovis</i> $\Delta mce2A$ o con <i>M. bovis</i> BCG Phips.	36
5.26.- Análisis estadístico	37
6.- RESULTADOS	38
6.1.- Expresión del gen de la invasina Mce2A en un cultivo bacteriano de <i>M. bovis</i> <i>in vitro</i>	38
6.2.- Expresión del gen <i>mce2A</i> y localización de la invasina Mce2A de <i>M. tuberculosis</i> en tejido pulmonar en una cinética de infección en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.....	39
6.3.- Expresión y purificación de la invasina Mce2A recombinante de <i>M. bovis</i>	40
6.4.- La clonación y expresión del gen <i>mce2A</i> de <i>M. bovis</i>	40
6.5.- Localización de la invasina Mce2A en tejido pulmonar de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por Inmunohistoquímica e Inmunomicroscopía electrónica.....	42

6.6.- El anticuerpo policlonal α -Mce2A es útil en el diagnóstico de la tuberculosis por inmunohistoquímica	47
6.8.- Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano de un cultivo in vitro de <i>M. tuberculosis</i> utilizando el anticuerpo policlonal α -Mce2A.....	48
6.9.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de <i>M. bovis</i> en cultivo de macrófagos bovinos.....	49
6.10.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de <i>M. tuberculosis</i> en ratones Balb/c en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.....	50
6.11.- Ensayo microbicida y expresión de genes selectos de macrófagos derivados de bovinos con fenotipo natural de Resistencia o Susceptibilidad a patógenos intracelulares e infectados con la cepa mutante de <i>M. bovis</i> Δ mce2 (atenuada) o con la cepa de <i>M. bovis</i> AN5 (virulenta).	52
6.12.- Las cepas de <i>M. bovis</i> Δ mce2A y <i>M. bovis</i> AN5 promueven la transcripción de genes de receptores de superficie de macrófagos bovinos.....	52
6.13.- Las enzimas óxido nítrico sintasa inducible y arginasa II aumentan su expresión en macrófagos de bovinos susceptibles infectados con <i>M. bovis</i> Δ mce2A	54
6.14.- Los macrófagos con fenotipo de susceptibilidad infectados con la cepa <i>M. bovis</i> Δ mce2 inducen una mayor expresión de IL-10.....	55
6.15.- <i>M. bovis</i> Δ mce2 induce sobre expresión de interleucinas y citocinas pro-inflamatorias en macrófagos de bovinos susceptibles particularmente IL-1 β	56
6.16.- Los macrófagos de bovinos con fenotipo de susceptibilidad expresan menos MCP-1 en comparación con el fenotipo de resistencia y mayor expresión de MCP-2 y MIP-1 cuando son infectados con la cepa atenuada de <i>M. bovis</i> Δ mce2.	58
6.17.- Evaluación de la cepa mutante Δ mce2A de <i>M. bovis</i> como candidato a ser utilizado como vacuna contra la tuberculosis en un modelo murino.	59
6.18.- Atenuación de la virulencia en ratones inmunocomprometidos (desnudos)	59
6.19.- Comparación de la patología pulmonar y la carga bacilar en ratones Balb/c infectados por ruta intratraqueal con la mutante de <i>M. bovis</i> Δ mce2 ó su cepa parental	60
6.20.- Comparación de la diseminación e inmunogenicidad en ratones vacunados con la cepa mutante <i>M. bovis</i> Δ mce2 o BCG.....	61
6.21.- Comparación de la protección contra diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> en ratones Balb/c vacunados con la mutante <i>M. bovis</i> Δ mce2 o BCG	65
7.- DISCUSIÓN	70
7.1.- Expresión de genes selectos de macrófagos derivados de bovinos con fenotipo natural de Resistencia o Susceptibilidad a patógenos intracelulares e infectados con la cepa mutante <i>M. bovis</i> Δ mce2 (atenuada) o con la cepa de <i>M. bovis</i> AN5 (virulenta).....	74

7.2.- Evaluación de la protección inducida por la mutante <i>M. bovis</i> $\Delta mce2$ en ratones contra la infección de cepas virulentas del complejo <i>M. tuberculosis</i>	78
9.- REFERENCIAS	81
Apéndice	90

Resumen

Alfonseca Silva Edgar. Gen de la invasina Mce2A de *Mycobacterium bovis*: Su expresión *in vitro* e *in vivo*, generación y evaluación de una vacuna mutante ($\Delta mce2A$), proteína recombinante (Mce2Ar) y herramienta de diagnóstico para la tuberculosis. Tutor: Dr. Rogelio Hernández Pando

La tuberculosis (TB) sigue siendo una gran amenaza para la salud pública y veterinaria. La TB zoonótica (causada por *Mycobacterium bovis*) está presente en una gran variedad de animales silvestres, quienes mantienen y diseminan al microorganismo entre sus poblaciones y hacia el ganado. En el ganado bovino está presente en la mayoría de los países en desarrollo. *M. bovis* también puede infectar a los humanos, existiendo reportes en casi todo el mundo. Así, la alta incidencia de la tuberculosis bovina en algunas zonas del planeta, es un problema de importancia económica y un riesgo adicional para la salud humana, siendo urgente el conocimiento de la interacción de la micobacteria con su hospedador y un gran desafío el desarrollo de nuevas vacunas para prevenir la tuberculosis, tanto en humanos como en bovinos. Los objetivos del presente estudio fueron determinar el nivel de expresión del gen *mce2A* de *M. bovis* en diferentes condiciones y la detección de la invasina Mce2A en los tejidos de animales infectados como indicador en su relación con la patogenicidad y como una posible herramienta de diagnóstico posmortem de la tuberculosis, además de evaluar la expresión de genes de la respuesta inmune en macrófagos bovinos infectados con cepas de *M. bovis* y caracterizar la patogenicidad y la inmunogenicidad de la mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ en ratones BALB /c, y luego evaluar su potencial como vacuna contra el desafío con cepas virulentas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Se estudió por PCR tiempo real cuantitativo (qPCR) la expresión del gen *mce2A* de *M. bovis* y se observó que este gen está sobre regulado en las fases de crecimiento logarítmico y en mayor proporción en la fase de crecimiento estacionaria. También se observó que al infectar macrófagos bovinos con *M. bovis*, este gen está sobre regulado desde las primeras horas pos infección. De igual forma, en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, el gen está sobre regulado desde el primer día pos infección y su máximo nivel se encuentra al final de la etapa protectora y principio de la fase progresiva de la enfermedad (día 28). El gen *mce2A* de *M. bovis* fue clonado en *E. coli* y se procedió a obtener la proteína Mce2Ar y un antisuero α -Mce2A, el cuál fue utilizado para la localización y cuantificación cualitativa de la invasina Mce2A en tejidos de animales infectados, corroborando la expresión y presencia de esta proteína desde el primer día pos infección y en mayor cantidad al final de la fase protectora de la enfermedad. También se evaluó por inmunohistoquímica, la utilidad del antisuero α -Mce2A, en el diagnóstico posmortem de la tuberculosis, mostrando una alta afinidad en tejidos de diferentes especies infectados con micobacterias. Se estudió la capacidad

del antisuero α -Mce2A para bloquear la infección por *M. bovis* en cultivo de macrófagos bovinos y en ratones en un modelo de tuberculosis pulmonar, observando una disminución en las UFC en los macrófagos tratados con el antisuero antes de la infección en comparación con el grupo no tratado. En los ratones que recibieron el α -Mce2A, antes y después de la infección, se incrementó la supervivencia y se observó una disminución en las UFC y menor daño pulmonar. Se estudió por qPCR los patrones de transcripción de 18 genes involucrados en inmunoregulación en macrófagos bovinos al ser infectados con *M. bovis*. Se observó una sobre regulación de estos genes en los macrófagos infectados, la cual puede variar dependiendo del grado de virulencia de la cepa de *M. bovis* utilizada y al fondo genético de susceptibilidad o resistencia a patógenos intracelulares de los macrófagos bovinos utilizados. Al evaluar la cepa mutante $\Delta mce2A$ de *M. bovis* para ser utilizada como vacuna se observó que esta mutante produce un daño limitado en el tejido pulmonar y menor carga bacilar en comparación con su cepa parental cuando son administradas por vía intratraqueal con una dosis alta y muestra una diseminación limitada cuando es utilizada como vacuna subcutánea. En el desafío experimental utilizando cepas con baja, media y alta virulencia de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, se observa un nivel de protección similar con la mutante $\Delta mce2A$ de *M. bovis* y con BCG. De manera interesante, los animales vacunados muestran una baja carga bacteriana en los pulmones pero una alta respuesta inflamatoria cuando fueron desafiados con cepas de *M. bovis*, mientras que los animales vacunados y desafiados con cepas de *M. tuberculosis* exhiben baja carga bacilar y escasa inflamación pulmonar. Así, a pesar de que la homología del genoma es alta entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, parece que hay un mayor reconocimiento antigénico y, en consecuencia, una respuesta inflamatoria extensa cuando la cepa utilizada como vacuna es homóloga a la cepa de desafío, en este caso *M. bovis*.

Palabras clave: Tuberculosis, vacunas e inmunidad contra la tuberculosis bovina, gen *mce2A* e invasina Mce2A de *M. bovis*

Abstract

Alfonseca-Silva Edgar. Mce2A invasin gene of *Mycobacterium bovis*: Its expression *in vitro* and *in vivo*, generation and evaluation of a vaccine mutant ($\Delta mce2A$), recombinant protein (Mce2Ar) and diagnostic tool for tuberculosis. Directed by Dr. Rogelio Hernandez-Pando

Tuberculosis (TB) remains a major threat to public and veterinary health. Zoonotic TB (caused by *Mycobacterium bovis*) is present in wild animals and cattle in most developing countries, and *M. bovis* is also able to infect humans on a worldwide basis. Thus, the high incidence of bovine TB is a major economic problem and an additional risk to human health, being the development of new vaccines to prevent both human and bovine TB urgent and a major challenge. The aims of the present study were to set the level of expression from the *mce2A* gene of *M. bovis* in different types of conditions and also the detection from the invasin Mce2A in the infected animal's tissues as an indicator in its relationship with the pathogenicity and as a possible tool of diagnostic postmortem from tuberculosis, besides to evaluate the genes expressions profile from the immune response in bovine macrophages infected with *M. bovis* strains and to characterize the pathogenicity and immunogenicity of *M. bovis mce2A* mutant in BALB/c mice, and then evaluate its potential as vaccine against the challenge with virulent *M. bovis* and *M. tuberculosis* strains. It was studied by quantitative real time PCR (qPCR) the expression from the *mce2A* gene of *M. bovis* and it was observed that this gene is upregulated in the growing logarithmic stages and in more proportion in the stationary growing stage. Furthermore, it was observed that when infecting bovine macrophages with *M. bovis*, this gene is upregulated from the very first hours of post infection. In the same way, in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis, *mce2A* gene is upregulated since the first day post infection and its highest level is at the end of the protective stage and the beginning of the progressive stage of illness (day 28). The *mce2A* gene from *M. bovis* was cloned in *E. coli* and it was proceeded to obtain the protein Mce2Ar and an antiserum α -Mce2A, which was used for the localization and qualitative quantification of the invasin Mce2A in infected animal tissues fortifying the expression and presence of this protein since the first day post infection and in more quantity up to the end of the protective stage of illness. It was also evaluated by immunohistochemistry, the utility of the antiserum α -Mce2A, at the postmortem diagnostic of tuberculosis, showing a high affinity in tissues of different infected species with micobacteria. It was studied the capability of the antiserum α -Mce2A for block the infection by *M. bovis* in a culture of bovines macrophages and in a mice model of pulmonary tuberculosis, observing a decreasing in the CFU in the treated macrophages with the antiserum before the infection in comparison with the group which was not treated. Mice which received the α -Mce2A, before and after of infection, increased their over life and was observed a decrease in the CFU and lower pulmonary damage. It were studied by qPCR the profile of transcription from 18 genes involved in immune regulation in bovine macrophages when were infected with *M. bovis*. It was observed an upregulation from these genes in the infected macrophages, which may differ depending the degree of virulence from the *M. bovis* strain which was used, and also to the genetic background of

susceptibility or resistance to the intracellular pathogens from bovine macrophages which were used. In evaluating the *M. bovis* $\Delta mce2A$ mutant as vaccine this strain produced limited tissue damage (pneumonia) and lower bacilli burdens than its parental strain when administered in high dose by intratracheal inoculation, and showed limited dissemination when used as subcutaneous vaccine. Challenge experiments using low, middle and highly virulent *M. tuberculosis* or *M. bovis* strains showed similar protection conferred by $\Delta mce2$ mutant than BCG. Interestingly, vaccinated animals showed low bacilli loads but high inflammatory response when were challenged with *M. bovis* strains, while vaccinated mice challenged with *M. tuberculosis* exhibited low bacilli burdens and scarce inflammation. Thus, in spite of the high genome homology between *M. tuberculosis* and *M. bovis*, it seems that there is higher antigenic recognition and in consequence extensive inflammatory response when the strain used as vaccine is homologous to the challenge strain, in this case *M. bovis*.

Keywords: Tuberculosis, vaccine and immunity against bovine tuberculosis, *mce2A* gene and Mce2A invasin from *M. bovis*

1.- INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es considerada una de las primeras enfermedades humanas de las que se tiene constancia, como lo ha establecido la paleomicrobiología. Las primeras evidencias se han encontrado en restos óseos del neolítico datados alrededor de 5000 A.C. También existen evidencias de datos sugestivos de lesiones de tipo tuberculoso en momias egipcias entre los años 3000 a 2400 AC. El caso más evidente es el de la momia de Nesperahán, (1500- A.C) sacerdote de Amón, descubierta en 1881, que presenta lesiones de tipo tuberculoso en vertebras dorsales y lumbares. En América las primeras evidencias se presentan en una momia en Perú del año 900 D.C. y en esqueletos en California y Arizona, lo que sugiere su difusión por todo el continente (Donoghue, et al 2004).

A principio del siglo XVII se presenta la epidemia de tuberculosis en Europa, llamada la Gran Plaga Blanca que se continúa por más de 200 años siendo la principal causa de muerte en la población. Tras los experimentos de Jean Antoine de Villemin, en 1869, que confirman que la tuberculosis es provocada por un agente infeccioso y es altamente contagiosa, comienza la búsqueda del microorganismo. El 24 de marzo de 1882, Robert Koch, publica sus resultados donde emplea un método de tinción y lo aplica a muestras de pacientes con tuberculosis, revelándose por primera vez el agente causante de la enfermedad, al que se le llamó “Bacilo de Koch” o Bacilo Tuberculoso, es capaz de cultivarlo y lo inocula en conejos observando que mueren con lesiones de la enfermedad y de sus cadáveres puede obtener, de nuevo, el microorganismo. Posteriormente se le denomina *Mycobacterium tuberculosis*. En 1898 Theobald Smith hace una distinción entre la presentación de la enfermedad en bovinos y en humanos y no es hasta que en 1902, Ravanel realiza el aislamiento del microorganismo bovino a partir de un niño con meningitis tuberculosa (Donoghue, et al 2004; Gradmann 2006).

En 1891 el mismo Koch desarrolla la tuberculina en colaboración con el veterinario Camille Guerin. Posteriormente en 1907 Charles Mantoux, desarrolla una prueba cutánea de intradermorreacción para detectar infección tuberculosa y que utiliza como reactivo el Derivado Proteico Purificado (PPD). En 1921 Albert Calmette y Camille Guerin producen la vacuna contra la tuberculosis, el bacilo de Calmette y Guerin (BCG), empleando una variante atenuada de *Mycobacterium bovis* (Calmette 1931).

Las micobacterias patógenas producen enfermedades granulomatosas en el hombre y en una gran variedad de especies animales domésticas y silvestres. Los agentes etiológicos de la tuberculosis en mamíferos pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, dentro de este se encuentran *M. tuberculosis*, que es el principal agente de la tuberculosis humana, produce enfermedad progresiva y generalizada en primates no humanos, perros, gatos, conejos y en algunos animales silvestres; los bovinos muestran una alta resistencia al microorganismo. *M. africanum* que produce la tuberculosis humana en África tropical y *M. bovis* agente etiológico de la tuberculosis bovina y que causa la enfermedad en otros animales domésticos y silvestres. (Kaneene y Thoen 2004).

1.1.- Tuberculosis bovina, características, transmisión e impacto en la salud pública

Los bovinos enfermos mantienen latente el riesgo de infección entre el ganado y la población humana, se calcula que en América Latina hasta un 1% de los casos de tuberculosis humana son de origen zoonótico, otros autores reportan incidencias más altas. En el mundo se calcula que hasta un 10 % de la tuberculosis humana es provocada por *M. bovis* (Acha 1997, Cosivi 1998, Thoen et al 2006, Hope 2008, Thoen et al 2009).

La tuberculosis bovina continúa siendo uno de los principales problemas de salud animal y su incidencia sigue incrementándose en países en vías de desarrollo provocando significantes pérdidas económicas.

El principal reservorio de *M. bovis* es el bovino, este lo transmite a otros bovinos principalmente por vía aerógena, la vía entérica es importante en becerros amamantados con leche contaminada.

La forma clínica más común es la tuberculosis pulmonar (Neill et al 1994; McNair 2007). *M. bovis* penetra a los pulmones y se multiplica formando un foco primario, que es acompañada de una lesión tuberculosa en los linfonódulos bronquiales, de esta manera se forma el complejo primario. Estas lesiones pueden permanecer latentes o progresar. La infección puede difundirse a otros órganos por vía linfática y hemática. Si el sistema inmune es incapaz de eliminar al microorganismo, este forma nuevos focos, principalmente en pulmones, riñones, bazo, hígado y nódulos linfáticos regionales.

La mayoría de los casos de tuberculosis tienen un curso crónico, limitado al pulmón y al tejido linfoide de cabeza y cuello, principalmente. El proceso es lento y generalmente pasa clínicamente inaparente, sin presentar signología, siendo estos animales una amenaza para el resto del hato. En otros se presenta una bronconeumonía crónica, tos y una baja en la producción, en algunos casos el tejido pulmonar esta tan afectado, que los animales presentan una marcada disnea. En la tuberculosis adquirida por vía oral se presenta tumefacción en los nódulos retrofaringeos y mesentéricos. A mayor edad del animal la enfermedad es más frecuente, la prevalencia de la infección es más alta en vacas lecheras que bovinos productores de carne, ya que en los primeros su vida productiva es más prolongada y existe un mayor contacto entre ellos (Acha 1997).

En los países desarrollados la tuberculosis bovina esta erradicada o se encuentra en fases avanzadas de control, aunque se mantienen reservorios de *M. bovis* en fauna silvestre (Hope y Villareal 2007, Palmer, et al 2012), mientras que en los países en vías de desarrollo, la situación no ha mejorado o la prevalencia se encuentra en aumento. En América Latina, incluyendo México, se han establecido programas de control de cobertura nacional, se han estimado las prevalencias en algunos de ellos, por ejemplo Argentina reporto 3-5 %, mientras que México reporta prevalencias que van del 0.5 % al 2.05 % (SENASICA 2012) y existen estimaciones que van del 3 % en la zona norte hasta del 25

% en algunos hatos del centro del país (Gurría 1994; Kantor and Ritacco 1994; Milian y Gallegos 2001).

La erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino ha sido un avance importante en muchos países, la estrategia que ha sido utilizada para evitar la diseminación de la enfermedad está basada en la prueba de tuberculina como medida de diagnóstico. Sin embargo esta prueba resulta incómoda ya que requiere de una segunda visita del veterinario 3 días después de la aplicación. Además estos programas requieren un fuerte financiamiento, por el alto costo que implica el control de la enfermedad, ya que los animales positivos deben ser enviados al rastro sin ningún beneficio económico para el productor, por lo que en ocasiones deciden no entrar a estos programas manteniéndose así las tasas de prevalencia (Ryan 2006, Meikle 2007, McNair 2007).

1.2.- Desarrollo de lesiones y respuesta inmune

En bovinos infectados experimentalmente, se pueden observar lesiones microscópicas a los 7 días, sin embargo, el grueso de las lesiones se observan hasta los 14 días posinfección (PI), durante esta etapa se observan células T CD2+, que es un marcador específico de células T y NK, y el incremento de bacilos ácido alcohol resistentes en la lesión. Al día 21 se observan células T y un área necrótica en la lesión rodeada de macrófagos y la presencia de neutrófilos intactos y degenerados en asociación con numerosos bacilos ácido alcohol resistentes. Al día 41 hay mineralización de la lesión con una moderada encapsulación y gran número de células linfoides expresando CD2+. Asociado a los cambios patológicos está el reclutamiento, estimulación y participación de varios tipos de células T (CD4+, CD8+), que juegan un papel importante en el desarrollo de la lesión y la respuesta a la infección. La liberación de las citocinas, IL12 e interferón γ (IFN- γ) contribuyen a la contención de los bacilos, estimulando la activación de macrófagos (Adwell et al 2001; Thacker 2007).

Solo una poca proporción de bovinos con lesiones de tuberculosis presentan una respuesta de anticuerpos medible, sin embargo, el isotipo IgG1, ha sido asociado con el desarrollo de las lesiones y puede ser un indicador del estatus de la enfermedad (McNair et al 2007).

1.3.- Estrategias de vacunación

La vacuna utilizada a nivel mundial para el control de la tuberculosis es la BCG, la variedad de cepas derivadas de la original BCG cepa Pasteur, explica en parte la eficiencia de la vacuna en el mundo. La atenuación de la cepa se debe a que no tiene la región RD1, la reintroducción de RD1 restablece la virulencia. A pesar de que la vacunación con la cepa BCG ha sido utilizada extensamente a nivel mundial para prevenir la tuberculosis en humanos, su uso en el ganado bovino ha sido mucho más limitado (Fine, 1995, Fine et al. 1999; Clements 2003; Jonge et al 2005; Murphy et al. 2008; Weir et al 2008; Whelan et al 2008).

Se han descrito vacunas experimentales para uso en humanos, particularmente basadas en Ag85 ó en combinación con otros antígenos como ESAT-6 ó TB 10.4 que inducen protección contra el desafío en varias especies animales (Dietrich 2005, Dietrich 2006, Johnson 2006).

Algunas vacunas experimentales en ganado utilizan ADN que codifica proteínas micobacterianas, por ejemplo MPB70 y MPB83, las cuales no han dado resultados adecuados en los desafíos (Wedlock et al, 2003) pero al combinarse con vacunas que codifican para ESAT-6, CD80 y CD86, también conocidas como proteínas B7.1 y B7.2 respectivamente cuyo receptor sobre las células T se denomina CD28 y que al unirse estimula a la célula presentadora de antígenos (APC) a producir interleucinas, se ha observado que esta vacuna reduce las lesiones de los animales que fueron desafiados con una suspensión en aerosol de *M. bovis*. (Garnier et al 2003; Meikle et al 2004; Maue 2004 y 2007; Hernández et al 2006; Mc Nair 2007).

Pocas vacunas han sido probadas en ganado bovino en comparación con las evaluadas en modelos de animales de laboratorio que han sido desarrolladas para ser eventualmente usadas en humanos. Estas vacunas podrían ser candidatos potenciales para ser utilizadas en bovinos, sin embargo, deberán ser primero evaluadas en esta especie para determinar su eficacia ya que existen diferencias significativas entre la respuesta inmune entre las especies (Buddle 2001, Bigi et al 2005, Buddle et al 2006).

El estudio de los principales antígenos de bacterias del genero *Mycobacterium* ha contribuido al entendimiento de los mecanismos de patogenicidad y en consecuencia al conocimiento de la respuesta inmune contra estas bacterias. La identificación y caracterización de proteínas antigénicas es necesario para el diseño de nuevas herramientas de diagnóstico y nuevos inmunógenos.

Numerosos antígenos micobacterianos han sido descritos y muchos de ellos han sido clonados y expresados en *E. coli* con lo que se ha tenido una importante contribución en el conocimiento de la respuesta inmune celular y humoral contra ellos y su posible función protectora o de antígeno dominante (Cataldi et al 1984, Young et al 1992, Bigi et al 1997).

En 1991 Young y Garbe describen la presencia de 4 antígenos de naturaleza lipoproteína en *M. tuberculosis* con pesos moleculares de 19, 26, 27 y 38 kDa y proponen que estas lipoproteínas están involucradas en la inducción de la respuesta inmune humoral y celular a *Mycobacterium* y que estas tiene un rol funcional en el transporte de nutrientes a través de la pared.

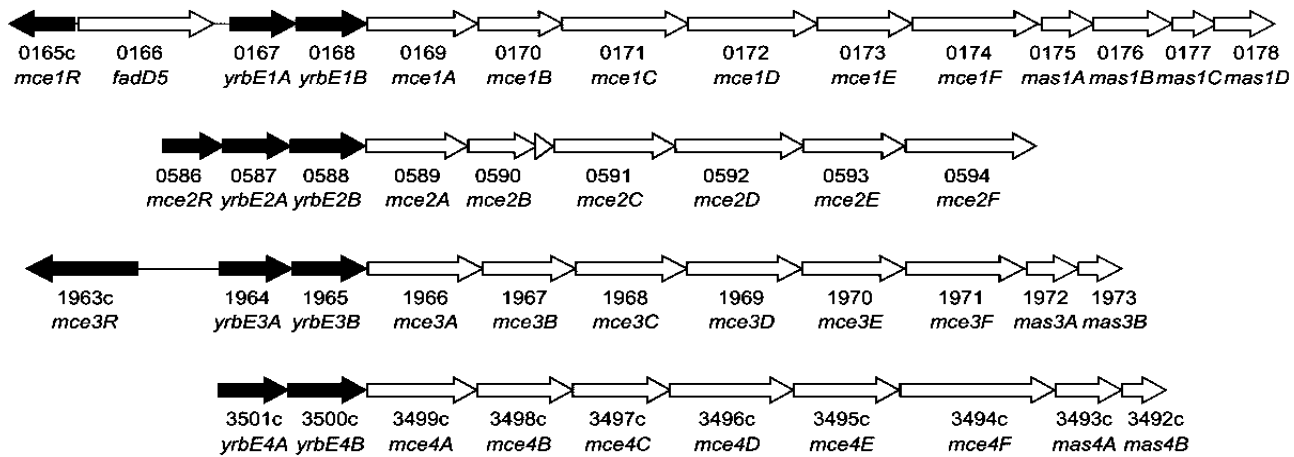
Ahmad et al (1999) proponen el uso de una proteína codificada dentro de la región RD1 para el serodiagnóstico de individuos infectados con *M. tuberculosis*. La región genómica denominada RD1, está presente en cepas virulentas y aislados clínicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* y se ha observado que esta deletada en la cepa *M. bovis* BCG. Los segmentos de ADN correspondientes a tres marcos abiertos de lectura (ORF): ORF-10, ORF-14, y ORF-15 de la región RD1 codifican para diferentes antígenos. La proteína codificada en

ORF-14 reacciona con anticuerpos de pacientes con tuberculosis pero no con sueros de pacientes sanos vacunados con BCG.

Bigi et al (1997) identifican una lipoproteína de 27 kDa de *M. bovis*, denominada P27, identificada a partir de una biblioteca genómica, utilizando sueros de bovinos naturalmente infectados, el gen que codifica esta proteína es idéntico al gen identificado en *M. tuberculosis* (Rv2108) y se sugiere que esta es una lipoproteína integral de membrana activa inmunológicamente que reacciona con sueros de animales infectados, al igual que en individuos infectados por *M. tuberculosis*, que solo está presente en especies del complejo *M. tuberculosis*. Posteriormente se describe que los genes que codifican para P27 y P55 forman un operón con función de resistencia a antibióticos, bomba de expulsión para aminoglucósidos y tetraciclina. También se confirma la presencia del antígeno P27 en *M. bovis* BCG. Los resultados obtenidos sugieren que esta lipoproteína debe ser considerada para el diseño de nuevas vacunas. (Bigi, et al 2000, Silva et al 2000, Le Moigne et al 2005).

Se observó que la inmunización de ratones Balb/c con el antígeno recombinante P27 de *M. tuberculosis* induce un alto título de IgG1 e IgG2 con un típico patrón Th1 y una fuerte respuesta de hipersensibilidad retardada, una significativa producción de IFN γ y óxido nítrico, resultados que sugieren que el antígeno de 27 kDa induce una respuesta protectora. Sorprendentemente los autores encontraron que en los ratones vacunados con la proteína o con el ADN, el desafío con *M. tuberculosis* incrementó significativamente el número de UFC y que la protección inducida por BCG u otros antígenos fue abolida cuando se adicionaba el antígeno de 27 kDa a las preparaciones, por lo que se llegó a la conclusión de que este antígeno tiene un efecto adverso en la protección conferida por vacunas reconocidas (Hovav et al 2003).

El genoma de *M. tuberculosis* alberga cuatro copias de un grupo de genes llamados operones mce, de "entrada a células de mamífero", por sus siglas en inglés (mammalian cell entry), *M. bovis* carece del operón 3, por lo que solo presenta tres copias (Zumarraga et al 1999), todas las proteínas codificadas por estos genes tienen una secuencia señal o extensión hidrofóbica en el amino terminal. Estas proteínas se localizan en la superficie celular y juega un papel importante en la invasión de las células del huésped y en la interacción huésped-patógeno. Estas proteínas son codificadas por los genes mce, estos están organizados en operones que contienen 8 genes. Esta familia de genes se denomina *mce A* (*mce1A*, *mce2A*, *mce3A* y *mce4A*). Arriba del gen *mceA*, hay dos genes (*yrbEA* y *yrbEB*) que codifican para proteínas integrales de membrana, y corriente abajo de este hay 5 genes (*mceA* a *mceF*), aunque se ha demostrado la importancia de estos operones en la infección, sus funciones fisiológicas permanecen desconocidas. Arruda et al 1993, clona fragmentos de ADN de estos genes y le confieren a una *E. coli* no patogénica, la capacidad de invadir células Hela, incrementar su fagocitosis por macrófagos y sobrevivir al menos 24 horas dentro de macrófagos humanos. Recientemente se han propuesto nuevos candidatos a vacunas, como las mutantes mce de *M. tuberculosis*. (Panigada et al 2002; Gioffré, et al. 2005; Aguilar et al 2006; Casali and Riley, 2007; Senarathe et al 2008, Marjanovic et al 2010).



Representación esquemática de los operones *mce* de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* carece del operón *mce3*. Tomado y adaptado de: Casali and Riley *BMC Genomics* 2007 **8**:60 doi:10.1186/1471-2164-8-60

En un estudio previo, Gioffre, et al (2005) muestran que las cepas mutantes en *mce1*, *mce2* y *mce3* de *M. tuberculosis* fueron notablemente hipo virulentas en ratones Balb/c. Aguilar y colaboradores (2006), en el mismo modelo, sugieren que en las cepas mutantes en *mce* disminuye la virulencia e incrementa la inmunogenicidad, estas vacunas vivas inducen una baja pero progresiva producción de Interferón gamma ($IFN\gamma$) y Factor de Necrosis Tumoral ($TNF\alpha$), favoreciendo su habilidad de protección contra la tuberculosis. Se ha reportado la presencia de anticuerpos contra proteínas de los operones *mce*, particularmente contra la proteína Mce3A, durante la infección natural de *M. tuberculosis* en humanos (Ahmad et al 2004).

Los mecanismos de invasividad y supervivencia intracelular conferidos por la proteína Mce2A de *M. bovis*, así como sus niveles de expresión génica, hasta el momento son poco conocidos, pero se piensa que estos deben estar involucrados en la virulencia del microorganismo y la respuesta inmune generada en el hospedador hacia bacterias del complejo *M. tuberculosis*. La importancia de este gen y su proteína en los mecanismos de virulencia del microorganismo lo hace un blanco de interés para su estudio y desarrollo de nuevos inmunógenos contra la tuberculosis.

2.- JUSTIFICACIÓN

A pesar de que México cuenta con una Campaña Nacional para el control de la tuberculosis en bovinos basada en el diagnóstico mediante la tuberculina y el sacrificio de reactivos positivos, este programa ha tenido un elevado costo para el país y para los productores nacionales y ha sido imposible, hasta ahora, su erradicación. Aún con estas políticas la tuberculosis bovina en México sigue siendo un problema grave con prevalencias que van desde un 2 hasta un 25 % (Renteria et al 1996; Milián y Gallegos, 2001; Milián et al 2002; Gurria, 1994).

A pesar de que la vacunación con la cepa BCG ha sido utilizada extensamente a nivel mundial para prevenir la tuberculosis en humanos, su uso en el ganado bovino ha sido

mucho más limitado. La BCG tiene reconocidas limitaciones para generalizar su uso para el control de la tuberculosis en bovinos, como la variación en los niveles de protección y el no evitar la presentación pulmonar en adultos. Es necesario desarrollar urgentemente vacunas de nueva generación, como vacunas vivas que incluyan cepas recombinantes de BCG o cepas atenuadas de *M. bovis* ó *M. tuberculosis*, producidas por atenuación selectiva de genes de virulencia o formulación de subunidades de diferentes antígenos, capaces de inducir protección en poblaciones de ganado bovino contra cepas virulentas de *M. bovis*. Por otra parte, el desarrollo de vacunas donde *M. bovis* es endémico, esta no debe enmascarar e interferir con los programas de diagnóstico o un su caso se deben generar sistemas de diagnóstico capaces de diferenciar entre animales vacunados de infectados con cepas de campo.

Pocas vacunas para el control de la tuberculosis han sido probadas en ganado bovino, es necesario contar con un candidato potencial y probarse en esta especie para determinar su eficacia.

3.- HIPÓTESIS

El gen *mce2A* de *M. bovis* participa en forma activa en los procesos de infección y supervivencia intracelular, además de inducir una fuerte respuesta inmune.

La vacunación con la cepa mutante $\Delta mce2A$ de *M. bovis* es capaz de inducir protección contra cepas virulentas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

4.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el nivel de expresión del gen *mce2A* de *M. bovis* en diferentes condiciones y su detección en los tejidos de animales infectados como posible herramienta de diagnóstico posmortem, evaluar la expresión de genes de la respuesta inmune en macrófagos bovinos infectados con cepas de *M. bovis* y caracterizar la patogenicidad y la inmunogenicidad de la mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ en ratones BALB /c, y evaluar su potencial como vacuna contra el desafío con cepas virulentas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

4.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Cuantificar el grado de expresión del gen *mce2A* por PCR tiempo real cuantitativo (qPCR) en un crecimiento *in vitro* y en un cultivo celular infectado con *M. bovis*.
- 2.- Cuantificar el nivel de expresión por qPCR del gen *mce2A* de *M. tuberculosis* durante el desarrollo del proceso infeccioso en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

- 3.- Evaluar los niveles de expresión génica de genes selectos, relacionados a respuesta inmune, de macrófagos bovinos infectados con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia (*M. bovis* $\Delta mce2A$ comparado con *M. bovis* AN5).
- 4.- Evaluar la utilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A en tejidos de animales infectados, para el diagnóstico posmortem de la tuberculosis, por medio de inmunohistoquímica.
- 5.- Caracterizar la patogenicidad de la cepa mutante *M. bovis* $\Delta mce2$ en comparación con su cepa parental de *M. bovis* y la cepa vacunal BCG en ratones desnudos y BALB/c
- 6.- Comparación de la inmunogenicidad de la cepa mutante *M. bovis* $\Delta mce2$ contra la cepa BCG Phipps en ratones BALB/c.
- 7.- Determinar la protección conferida en ratones BALB/c vacunados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2$ y con BCG contra el desafío de cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* con diferentes grados de virulencia.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las siguientes cepas de laboratorio, obtenidas del cepario del Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ):

- 1.- *M. tuberculosis* H37 Rv ATCC 25618 (Rockville, MD, USA)
 - 2.- *M. tuberculosis* 09005186 LAM altamente virulenta en el modelo BALB/c, fue obtenida en un estudio epidemiológico desarrollado en el sur de México (Marquina-Castillo, et al 2009).
 - 3.- *M. bovis* AN5
 - 4.- *M. bovis* (BCG Phipps)
 - 5.- *M. bovis* 302 aislada de jabalí y altamente virulenta en el modelo BALB/c
 - 6.- *M. bovis* 534 aislada de bovino y de baja virulencia en el modelo BALB/c
 - 7.- *M. bovis* UK (NCTC 10772) aislado de bovino
- <http://www.straininfo2.ugent.be/culture/99859/catalog.jsessionid=C2B6AA33B1E3024D2889F173B08BDBF8>
- 8.- *M. bovis* mutante $\Delta mce2A$

Las cepas de *M. bovis* 04-302, 534, UK y $\Delta mce2A$ fueron donadas por el Dr. Ángel Cataldi del Instituto de Biotecnología INTA, Castelar de Argentina.

La cepa mutante $\Delta mce2$ fue obtenida de la cepa parental *M. bovis* UK en la cual se le insertó el plásmido pUC4K con cassette de kanamicina en un sitio interno del gen *mce2A* (Gioffre et al 2005, Blanco et al 2012).

La cepa BCG Phips fue utilizada en los experimentos de protección en el modelo murino, esta cepa fue la que mostró mayor protección, de 10 subcepas de BCG probadas en nuestro modelo BALB/c de tuberculosis pulmonar progresiva (Castillo-Rodal et al 2009).

Todas las cepas fueron cultivadas en agitación a 37°C por 20 días en medio Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI) enriquecido con glicerol (*M. tuberculosis*) o sin glicerol (*M. bovis*) y suplementado con albumina, catalasa y dextrosa (ADC) (Becton Dickinson. Cockysville, MD) y tween 20 al 0.05%. El cultivo fue monitoreado por espectrometría hasta alcanzar la fase logarítmica ($A_{600} = 0.6-1.0$)

Después del cultivo, las micobacterias fueron cosechadas, alícuotadas y se mantuvieron a -70° C hasta su uso. Antes de usar las alícuotas las bacterias se contaron y se determinó la viabilidad por la incorporación de diacetato de fluoreceína (DAF) o SYTO 9 (LIVE/DEAD® BacLight. Bacterial Viability Kits), el cultivo se ajustó a 2.5×10^5 /bacterias vivas en 100 μ l de solución salina fisiológica (SSF). Posteriormente el inóculo fue sembrado en agar 7H10 para comprobar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) administrado a los animales.

5.2.- Expresión del gen *mce2A* (mammalian cell-entry) del operon *mce2* de *M. bovis* en diferentes condiciones de cultivo in vitro e in vivo y localización de la invasina Mce2A en tejido infectado

Para evaluar el nivel de expresión a nivel de ARN del gen *mce2A* en diferentes condiciones, se realizaron cultivos bacterianos in vitro e infecciones de macrófagos con *M. bovis* y una cinética de enfermedad pulmonar progresiva en ratones BALB/c inoculados con *M. tuberculosis* H37Rv, donde también se observó la expresión y localización de la invasina Mce2A en los tejidos infectados por medio de inmunomicroscopía.

5.3.- Expresión del gen que codifica para la invasina Mce2A en un cultivo bacteriano de *M. bovis* in vitro

Con la finalidad de evaluar la expresión del gen de la invasina Mce2A en un cultivo bacteriano en diferentes etapas de la curva de crecimiento, se realizaron 2 experimentos independientes en donde la cepa de *M. bovis* UK se sembró en botellas de cultivo de 25 cm² con medio 7H9 + ADC+ piruvato y se incubó a 37°C con 5-10% de CO₂, la bacteria se recuperó en diferentes etapas de la curva:

Fase de adaptación: $A_{600}=0.2$

Fase logarítmica: $A_{600}=0.4$

Fase de meseta: $A_{600}=1.0$

- Los cultivos se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml, se pasó por jeringa de 25 mm por 3 ocasiones para eliminar conglomerados.
- El cultivo se centrifugó a 3500 rpm x 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el cultivo se resuspendió en 1 ml de Trizol® (Invitrogen).
- El cultivo se transfirió a un criotubo que contenía perlas de vidrio estériles.
- Para lisar a las micobacterias el tubo se colocó en un agitador para lisis (Fast Prep Thermo Scientific) y se corrieron 2 ciclos de 6500 x 20 segundos con 15 segundos de descanso.
- El tubo se centrifugó a 11000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico y se guardó a -70°C hasta su uso.

5.4.- Expresión del gen que codifica para la invasina Mce2A en un cultivo de macrófagos infectados con *M. bovis* in vitro

Con la finalidad de evaluar la expresión del gen de la invasina Mce2A de *M. bovis* dentro de los macrófagos a diferentes tiempos, se realizaron 2 experimentos independientes, se utilizó un cultivo de macrófagos murinos de la línea J774 que fueron infectados con la cepa de *M. bovis* UK con una MOI de 10:1, la expresión del gen *mce2A* se evaluó a las 24, 48 y 72 horas posinfección.

- Se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm^2 con macrófagos murinos J774 con una confluencia de 2×10^6 .
- Se utilizó un cultivo en fase logarítmica de *M. bovis* UK, el cultivo se transfirió a un tubo cónico de 50 ml, se centrifugó a 3500 rpm 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en RPMI.
- El inóculo bacteriano se agito y se pasó 5 veces por aguja de 25 mm para eliminar grumos y disgregar las bacterias.
- Se retiró el medio de cultivo de los macrófagos y se infectaron con 7 ml del inóculo bacteriano con una MOI 10:1, se incubaron por 4 horas, revisando cada hora que los macrófagos no se despegaran.
- Para retirar el excedente de bacterias, los cultivos de macrófagos se lavaron 4 veces con PBS, se adicionó 20 ml de RPMI + 5% de suero fetal bovino y se incubaron a 37°C con 5- 10 % de CO_2 .
- Los macrófagos se cosecharon a 3 tiempos: 24, 48 y 72 horas posinfección. Para cada tiempo se revisó que no se despegará la monocapa, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 7 ml de tiocianato de guanidina 4 M en agua DPEC, para lisar y despegar a los macrófagos y liberar las bacterias.

- El contenido de las botellas se transfirió a tubos cónicos de 50 ml, se pasó 5 veces por aguja de 25 mm para eliminar la consistencia viscosa y los grumos.
- Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm x 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el paquete bacteriano se resuspendió en 1 ml de Trizol® (Invitrogen).
- El cultivo se transfirió a un criotubo que contenía perlas de vidrio estériles
- Para lisar a las micobacterias el tubo se colocó en un agitador para lisis (Fast Prep Thermo Scientific) y se corrieron 2 ciclos de 6500 x 20 segundos con 15 segundos de descanso.
- El tubo se centrifugó a 11000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico y se guardó a -70°C hasta su uso.

5.5.- Extracción de RNA de *M. bovis*

Se realizó la extracción de RNA de los lisados de los cultivos bacterianos y de macrófagos que se mantenían a -70°C.

- A cada tubo de los lisados de *M. bovis* se adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm (15000 xg) x 15 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de 1.5 ml (a partir de este paso todo se realiza en frío).
- Se agregaron 100 µl de cloroformo y se centrifugó a 1000 rpm x 1-2 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo de 1.5 ml.
- Se precipitó el RNA con 600 µl de alcohol isoamílico y 60 µl de acetato e sodio 3M. se incubó a -70°C por 1 hora o toda la noche.
- Se centrifugó a 10000 rpm x 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante.
- Se lavó el RNA (pellet) con 1 ml de etanol al 70 % frío, se centrifugó a 10000 rpm x 5 minutos a 4°C.
- Se eliminó el sobrenadante con cuidado y se dejó secar el RNA. Se resuspendió con 20 µl de agua DPEC.
- Se midió la concentración y se observó la integridad del RNA.
- Se eliminó el DNA con tratamiento de DNAasa (Amp Grade, Invitrogen). En tubos de PCR, para cada muestra se hicieron 2 tubos:
 Tubo 1.- control positivo: 1 µl de RNA + 1 µl de 10X DNAasa I (0.1 U/µl) + 10 µl H₂O
 Tubo 2.- control negativo: 1 µl de 10X DNAasa I (0.1 U/µl) + 10 µl H₂O
- Se incubó a temperatura ambiente por 40 minutos.
- Se inactivó la enzima DNAasa con 1 µl de EDTA 25 mM (este evita la hidrólisis de RNA dependiente de magnesio). Se calentó a 65°C por 10 minutos en termobloque.
- Se cuantificó el RNA en el NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) utilizando como blanco agua DEPC.

Para la síntesis de cDNA y RT-PCR se utilizó el kit SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen), para el RT-PCR se utilizó el equipo LightCycler (Roche).

5.6.- Expresión del gen *mce2A* y localización de la invasina Mce2A de *M. tuberculosis* en tejido pulmonar en una cinética de infección en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

Puesto que no hay reportes de la expresión del gen *mce2A* y la localización de su proteína la invasina Mce2A de *Mycobacterium* en un proceso infeccioso, se realizó esta evaluación en una cinética de infección de tuberculosis pulmonar progresiva por medio de PCR tiempo real, Inmunohistoquímica e Inmunomicroscopía electrónica. Se procedió a infectar ratones BALB/c (6 por cada tiempo) a través de inoculación intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv con 2.5×10^5 bacilos vivos. Después de la infección progresiva inducida, se obtuvo el tejido pulmonar en diferentes días de la cinética, 3 pulmones se procesaron para inmunohistoquímica e inmunomicroscopía electrónica y los otros 3 para extracción de RNA y cuantificación del gen de la invasina Mce2A por qPCR.

5.7.- Extracción de RNA de *M. tuberculosis* H37Rv en tejidos pulmonares de ratones infectados (Shi et al 2003):

- Los pulmones de los días 1, 28 y 120 pos infección se perfundieron vía la tráquea con buffer de lisis (citrato de sodio 26 mM, tiocianato de guanidinio 4M, N-lauril sarcosina 0,5%, mercaptoetanol 0,125 M, pH 6,0) e inmediatamente se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido.
- Estos tejidos se guardaron a -70°C hasta su uso.
- Se hizo la ruptura de los tejidos con un Mini BeadBeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) en criotubos que contienen de 2 a 4 ml de buffer de lisis y perlas de zirconio – sílice de 710 – 1180 y 150 – 212 μm . Se utilizó la máxima velocidad por 15 segundos 7 veces.
- El homogenizado obtenido se dejó sedimentar y se tomaron 500 μl del mismo.
- El homogenizado se trató con 500 μl de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 y con 50 μl de acetato de sodio 3M pH 6,0. Esta mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar en hielo por 5 minutos.
- Los tubos se centrifugaron a 16000 X g por 5 minutos.
- Se recuperó la fase acuosa resultante en otro tubo, se agregaron 500 μl de cloroformo y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 16000 X g por 5 minutos.
- Se recuperó la fase acuosa, a ésta se le agregaron 50 μl de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 1,5 ml de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó a -20°C toda la noche.
- Primer lavado: Se centrifugó a 16000 X g por 25 minutos a 4°C , y se descartó el sobrenadante.
- Se agregaron 500 μl de etanol al 75% en agua DEPC, dicha mezcla también se centrifugó a 16000 X g por 5 minutos a 4°C .

- Se desechó el sobrenadante, al pellet obtenido, se le agregaron 100 μ l de agua tratada con DEPC, 750 μ l de Trizol® (Invitrogen) y 150 μ l de cloroformo, dicha mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- La mezcla obtenida se centrifugó a 16000 X g por 20 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa en otro tubo y se le agregaron 500 μ l de isopropanol. Esta última mezcla se incubó a -20°C toda la noche.
- Segundo y tercer lavado: se repitieron los pasos del primer lavado (para tres lavados en total), solo que en éstos se usó 50 μ l de agua DEPC.
- Lavado final: Se centrifugó una vez a 16000 X g y se obtuvo el pellet, éste se lavó con etanol al 75% y se dejó secar en Speed Vac (DNA110 Speed Vac) por 3 minutos a velocidad media.
- El RNA obtenido se disolvió en 30 - 50 μ l de agua DEPC y se almacenó a -70°C hasta su uso, la muestra se dividió en alícuotas de 5 μ l cada una.
- Se probó la pureza del RNA y ausencia de DNA.
- Se cuantificó el RNA en el NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) utilizando como blanco agua DEPC.
- Se sintetizó el cDNA para los posteriores análisis de transcripción (Super Script First Strand, Invitrogen).
- Se determinó la expresión del gen de la invasina *mce2A* utilizando *Sig A* como gen normalizador por medio de qPCR (LightCycler FastStart DNA master SYBR Green I, Roche), LightCycler 1.5 (Roche).

5.8.- Expresión y purificación de la invasina Mce2A recombinante de M. bovis

La proteína Mce2A recombinante de *M. bovis* fue expresada en *E. coli* y purificada. Se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformada con el plásmido pRSET-*mce2A*, se realizó una cinética de crecimiento para determinar el tiempo de inducción de la proteína con IPTG. Para comprobar la inducción de la proteína se realizó un inmunoblot con α -Histidina para evidenciar la proteína recombinante marcada con Histidina (His-tag-Mce2A/*M. bovis*). La pastilla bacteriana de los cultivos inducidos se colectó por centrifugación y fue sonicada para obtener los cuerpos de inclusión. Estos fueron lavados y disueltos en buffer para cromatografía de afinidad por metales pesados. La proteína recombinante se purificó de manera semiautomática por cromatografía (AKTA-FPLC) utilizando una columna de zinc. Después de identificar por SDS-PAGE las fracciones con la proteína recombinante Mce2A pura, se dializaron para reducir la concentración de urea y permitir el plegado de la proteína. Se realizó la cuantificación de la proteína por el método de Lowry. Los tubos con la proteína recombinante Mce2A se guardaron a -80°C hasta su uso.

Producción de anticuerpos policlonales en conejo contra la invasina Mce2A. Los conejos utilizados fueron probados que tuvieran reactividad negativa contra la proteína Mce2A. Se preparó antígeno particulado para inmunizar a los conejos. La proteína recombinante Mce2A fue purificada en una sola banda por electroforesis (SDS-PAGE) y fue transferida a una membrana de nitrocelulosa, la banda fue recortada y pulverizada con DMOSO - solución amortiguadora de carbonatos y fue utilizada como antígeno con adyuvante incompleto de Freud. Los conejos fueron inmunizados subcutáneamente en el cuello y múltiples sitios de ambos costados. Se realizaron dos inmunizaciones más con intervalo de 4 semanas. Antes de cada inmunización se realizaron sangrados para evaluar el título de anticuerpos α -Mce2A. Los conejos fueron sacrificados 2 semanas después del refuerzo final y el suero fue colectado y guardado en alícuotas a -80°C .

El suero policlonal α -Mce2A fue purificado por cromatografía de afinidad en columnas con proteína A y titulado por inmunoblot, utilizando la proteína recombinante Mce2A.

5.9.- Inmunohistoquímica e Inmunomicroscopía electrónica de tejido pulmonar de ratones infectados con M. tuberculosis H37Rv

5.10.- Tinción de inmunohistoquímica

Los pulmones de los ratones infectados de los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 120 pos infección fueron perfundidos con etanol al 100 %, vía intratraqueal e inmerso en el mismo fijador por 24 horas y embebidos en parafina para realizar cortes histológicos que fueron montados en laminillas cargadas.

Para la tinción de inmunohistoquímica se utilizó el Kit de DAKO K5204 de inmunocitoquímica, todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones especificadas en el kit (ver apéndice).

5.11.- Tinción de Inmunomicroscopía electrónica

Los pulmones de los ratones infectados de los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 120 pos infección fueron perfundidos con paraformaldehído al 4 % en buffer de Sørensen pH 7.3, 0.2M vía intratraqueal e inmerso en el mismo fijador, posteriormente el tejido fue incluido en resina acrílica hidrosoluble(LR-White) siguiendo el protocolo de trabajo de la técnica de inclusión para inmunomicroscopía electrónica (ver apéndice).

5.12.- Técnica de inmunomicroscopía electrónica para la localización de antígenos

El tejido pulmonar incluido en la resina acrílica fue preparado para realizar cortes y su posterior observación por microscopía electrónica mediante la técnica para la localización de antígenos descrita (ver apéndice).

5.13.- Utilidad del anticuerpo policlonal anti- Mce2A en el diagnóstico de la tuberculosis

Con la finalidad de determinar la capacidad del anticuerpo α -Mce2A de identificar a la invasina Mce2A de cepas del complejo *M. tuberculosis* en tejidos provenientes de muestras clínicas y utilizarlo con fines de diagnóstico de tuberculosis, se procedió a preparar cortes histológicos de muestras posmortem con diagnóstico de tuberculosis y otras micobacteriosis confirmados por aislamiento, histopatología y/o BAR, provenientes de diferentes especies: encéfalos de humano con diagnóstico de tuberculoma, linfonódulo de bovino con tuberculosis, pulmón de bovino, ave y ratón con tuberculosis e intestino de bovino con paratuberculosis. Los cortes se procesaron para Inmunohistoquímica, se utilizó el anticuerpo α -Mce2A a una dilución 1:1000.

5.14.- Ensayo de inmunogenicidad de la proteína Mce2A

Con el fin de conocer su participación en la respuesta Th1, se evaluó la producción de IFN γ en células provenientes de ratones infectados con *M. tuberculosis* y estimuladas con el antígeno Mce2Ar.

Se utilizaron 10 ratones BALB/c inoculados intratraquealmente con 2.5×10^5 bacterias *M. tuberculosis* H37Rv, 4 semanas posinfección se colectaron los pulmones y bazo por separado en 1 ml de medio RPMI. El ensayo de inmunogenicidad se realizó siguiendo el protocolo descrito (ver apéndice).

5.15.- Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano de M. tuberculosis utilizando el anticuerpo α -Mce2A

Con la finalidad de determinar si el anticuerpo α -Mce2A tiene un efecto inhibitorio en el desarrollo de *M. tuberculosis* en un cultivo bacteriano, se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento con número constante de bacterias contra diluciones dobles seriadas del anticuerpo α -Mce2A.

En 2 experimentos independiente se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pozos, se realizaron diluciones dobles seriadas del anticuerpo α -Mce2A (1:25 a 1:12800) por triplicado, el número de bacterias por pozo fue constante, cada pozo contenía 5000 bacilos vivos en medio 7H9+ OADC+glicerol 0.5%, se colocaron controles positivos sin anticuerpo y controles negativos sin bacterias.

Las placas se incubaron en agitación por 24 horas a 37°C con 5-10 % CO $_2$. Se determinó el número de UFC realizando diluciones decuples seriadas y sembrando por duplicado en medio 7H10+ OADC+glicerol 0.5% incubando a 37°C con 5-10 % CO $_2$ por 15 días.

5.16.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de *M. bovis* en cultivo de macrófagos bovinos

Recientemente se ha reportado que anticuerpos policlonales contra secuencias conservadas de la proteína Mce1A bloquea la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos humanos y decrece la cuenta viable de bacterias intracelulares (Sivagnanam et al 2011). Se realizó un experimento para determinar la capacidad del anticuerpo α -Mce2A de bloquear la infección por *M. bovis* en macrófagos bovinos.

Se utilizó una suspensión de macrófagos bovinos, obtenidos por gradiente de Percoll, de 13 días de maduración, en placa de Terasaki se agregaron 10000 macrófagos/pozo con una dilución del anticuerpo α -Mce2A 1:100 en 10 μ l de RPMI 10 % suero autólogo. Las placas se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos y se les agregó una gota de agua destilada en las esquinas para mantener la humedad, se incubaron a 37°C 5-10 % CO₂ en cámara húmeda por 2 horas. El experimento se realizó por triplicado

El cultivo de macrófagos se infectó con *M. bovis* AN5 con una multiplicidad de infección de 1:1. Se colocaron en otros 3 pozos 10 μ l de la suspensión bacteriana como control positivo, se retiró el agua de las esquinas y se centrifugó la placa a 1000 rpm por 10 minutos. Se incubó 4 horas a 37°C para permitir la infección.

Se prepararon 4 tubos para diluciones decuples, el primero con 170 μ l y los siguientes con 450 μ l.

Al final de la incubación los pozos se lavaron 5 veces utilizando 10 μ l de medio RPMI suplementado, para remover las bacterias extracelulares. Los pozos control de bacterias no se lavaron. Se adicionó 10 μ l de Tween 20 0.5% para lisar las células y liberar las bacterias, se dejó incubar 10 minutos. El contenido de cada pozo más dos lavados adicionales con agua estéril se transfirió al primer tubo de dilución. El contenido de los pozos control de bacterias más dos lavados fueron transferidos al primer tubo de dilución, se hicieron diluciones decuples y se sembraron 10 μ l en gota en medio 7H10 + OADC, por triplicado. Los cultivos se incubaron 15 días a 37°C con 5-10 % de CO₂ y se determinó el número de UFC.

5.17.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de *M. tuberculosis* en ratones BALB/c en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva

5.18.- Modelo Experimental de Tuberculosis Pulmonar Progresiva en ratones BALB/c

Todos los procedimientos se desarrollaron en gabinete de flujo laminar nivel III y el trabajo con animales de laboratorio se realizó de acuerdo a las normas del Comité de Ética Institucional y a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Se utilizaron 90 ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad, divididos en 2 grupos experimentales, 2 horas antes de la infección los ratones fueron anestesiados con sevofluorano y se colocaron en posición vertical para inocularlos intratraquealmente. El primer grupo recibió 100 µl de una suspensión de anticuerpo α -Mce2A a una dilución de 1:250, el grupo 2 recibió 100 µl de SSF. Posteriormente los animales recibieron por vía intratraqueal un tratamiento cada tercer día por 2 semanas, al grupo 1 se le aplicaron 100 µl de una suspensión del anticuerpo α -Mce2A a una dilución de 1:500, al grupo 2 se le aplicaron 100 µl de SSF.

Para inducir una tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c. Los ratones fueron anestesiados con sevofluorano y se colocaron en posición vertical para inocularlos intratraquealmente con una suspensión de 100 µl de SSF con 2.5×10^5 bacterias viables de *M. tuberculosis* LAM 09995186. Se mantuvieron en posición vertical hasta que pasó el efecto del anestésico (Hernández-Pando, et al 1996). Los animales se mantuvieron en microaisladores en unidades de aislamiento con agua y alimento comercial sin restricción. El experimento se realizó por duplicado

A) Sobrevida

10 ratones de cada grupo se mantuvieron sin tocar. La sobrevida se registró a lo largo de los 60 días del experimento para cada uno de los grupos y se expresó en porcentaje.

B) Evolución de la infección

Grupos de 8 ratones en dos diferentes experimentos fueron sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días después de la infección intratraqueal.

Para cada día de muestreo, 4 pulmones fueron removidos y se realizó la cuantificación bacteriana por UFC, por diluciones seriadas, en medio 7H10-OADC+glicierol 0.05 % cultivando a 37°C por 21 días. Los valores fueron expresados como la media +/- SD de UFC. Los pulmones de los otros 4 animales fueron perfundidos con etanol al 100 %, vía intratraqueal e inmerso en el mismo fijador por 24 horas, y embebidos en parafina para realizar cortes histológicos y teñirlos con HyE. Estos fueron utilizados para el seguimiento de la evolución de la enfermedad. El porcentaje de la superficie afectada por la neumonía fue determinada utilizando un analizador de imágenes automatizado (QWin Leica 500 W equipment from Leica Imaging Systems, Cambridge UK) (Hernández-Pando, et al 1996).

5.19.- Ensayo microbicida y expresión de genes selectos de macrófagos bovinos derivados de animales con fenotipo natural de Resistencia o Susceptibilidad a patógenos intracelulares e infectados con la cepa atenuada de *M. bovis* $\Delta mce2$ o con la cepa virulenta de *M. bovis* AN5.

Se ha demostrado que existen individuos genéticamente resistentes o susceptibles a diferentes parásitos intracelulares y que esto está relacionado, entre otras cosas con la capacidad que tiene los macrófagos de controlar el crecimiento del patógeno. Pero también es conocido que el nivel de virulencia de las cepas es un factor significativo (Qureshi, et al 1995, Lopez, et al 2003, 1998, Aguilar, et al 2009, Marquina-Castillo, et al 2009).

Se determinaron las diferencias en cuanto al nivel de fagocitosis y supervivencia intracelular de cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia, y se comparó la respuesta inmune medida por la expresión de genes de citocinas y Receptores de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, inducida en monocitos derivados de sangre periférica de bovino, ante un desafío con cepas de *M. bovis* $\Delta mce2$ (atenuada) y *M. bovis* AN5 (virulenta) y el papel que tiene el fondo genético del bovino de resistencia o susceptibilidad a patógenos intracelulares.

5.20.- Ensayo microbicida

Como una medida del grado de virulencia de las cepas utilizadas se determinó el porcentaje de fagocitosis y supervivencia intracelular de *M. bovis* $\Delta mce2A$ y *M. bovis* AN5, se realizaron ensayos microbicidas de acuerdo a la técnica descrita por Gutiérrez Pabello y Adams (2003).

Se utilizó una suspensión de macrófagos bovinos, obtenidos por gradiente de Percoll, de 13 días de maduración, a una concentración de 1×10^6 /ml se agregaron 10 μ l (10000 macrófagos/pozo) en 3 pozos de una placa de Terasaki. Para evaluar 2 diferentes tiempos de supervivencia intracelular T0 y T24, se utilizaron 2 placas.

Las placas se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos y se les agregó una gota de agua destilada en las esquinas para mantener la humedad, se incubaron las células por 12-18 horas a 37°C, previo al ensayo.

El día del ensayo se aspiró el medio de cada pozo y se sustituyó por una suspensión de 10 μ l de las cepas a probar: *M. bovis* $\Delta mce2A$ y *M. bovis* AN5 a una multiplicad de infección (MOI) de 2:1. Se colocaron en otros 3 pozos 10 μ l de la suspensión bacteriana como control positivo, se retiró el agua de las esquinas y centrifugó la placa a 1000 rpm por 10 minutos. Se Incubó 4 horas a 37°C para permitir la fagocitosis, a los pozos control de bacterias se agregó 10 μ l de medio de cultivo para evitar que se secan.

Se prepararon 4 tubos para diluciones decuples, el primero tendrá 170 μ l y los siguientes 450 μ l.

Al final de la incubación se lavaron los pozos 5 veces, utilizando 10 μ l de medio RPMI suplementado, para remover las bacterias extracelulares. No se lavan los pozos control de bacterias. En la placa T0 se adicionó 10 μ l de tritón 0.01% para lisar las células y liberar las bacterias, se dejó incubar 10 minutos. El contenido de cada pozo más dos lavados adicionales con agua estéril fueron transferido al primer tubo de dilución. El contenido de los pozos control de bacterias más dos lavados fueron transferidos al primer tubo de dilución, se hicieron diluciones decuples y se sembró 100 μ l con varilla de vidrio en medio 7H10+ OADC+glicerol 0.05%, por triplicado. Se incubaron 15 días a 37°C con 5-10 % de CO₂ y se leyeron las UFC de cada dilución.

Para la placa que evalúa el segundo tiempo, se lavaron los pozos para eliminar bacterias extracelulares y se adicionó 10 μ l de medio de cultivo RPMI suplementado y se incubó por 24 horas para permitir la replicación de la micobacteria. Al final de la incubación el contenido de cada pozo se transfirió al primer tubo de dilución que contenía 160 μ l y se reemplazó con 10 μ l de tritón al 0.01 % se incubó 10 minutos. El contenido más dos lavados se transfirieron al primer tubo de dilución, se hicieron diluciones decuples y se sembraron 100 μ l en medio 7H10+OADC+glicerol 0.05% por triplicado. Se incubó 15 días a 37°C con 5-10 % de CO₂ y se leyeron las UFC de cada dilución para evaluar la sobrevivencia intracelular.

5.21.- Cuantificación de ARNm de genes selectos de macrófagos bovinos infectados con M. bovis por PCR Tiempo Real

Para evaluar la expresión de genes selectos en macrófagos bovinos derivados de sangre periférica se infectaron con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia, la cepa de *M. bovis* Δ mce2A que mostró estar atenuada y la cepa *M. bovis* AN5 que es altamente virulenta en ratones y cultivo de macrófagos, La expresión de los genes se cuantificó en ensayos de qPCR tiempo real.

En botellas de cultivo de 25 cm², se realizó una infección en cultivo primario de macrófagos bovinos de 13 días, purificados a partir de vacas previamente identificadas con los fenotipos de resistencia o susceptibilidad a la tuberculosis, con una multiplicidad (MOI) de 10:1 con las cepas: *M. bovis* AN5 (hipervirulenta) o *M. bovis* Δ mce-2 (atenuada), se incubaron a 37°C, 5-10 % CO₂ por 4 horas. Se decantó el medio de cultivo y se adicionó 3 ml de TriPure (Roche Applied Science), se mezcló y dividió en alícuotas de 1 ml en tubos cónicos de 1.5 ml. Se Congeló a -20°C hasta su uso.

Se realizó la extracción de ARN según Chomezynsky 1993, y posteriormente se purificó con DNAasa Free (Ambion), se cuantificó y se verificó la calidad. Las muestras se conservaron a -80°C en alícuotas de 1 a 2 µg hasta su uso.

A partir del ARN purificado se sintetizó ADN complementario (ADNc), por medio de un PCR de transcriptasa reversa. La síntesis se realizó usando 4 U de enzima transcriptasa reversa Omniscript (QIAGEN Valencia, Ca. USA), buffer RT (1x), mezcla de dNTP's (0.5 µM de cada uno, Oligo dT (1µM), templete de ARN (1µg) y agua libre de nucleasas cbp 20 µl. La mezcla se incubó a 37°C por 60 minutos y la enzima se inactivó a 95°C por 5 minutos. El volumen final se ajustó a 400 µl con agua libre de nucleasas y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Para la cuantificación de ARNm de genes seleccionados de macrófagos bovinos infectados con cepas de *M. bovis*, se utilizaron iniciadores diseñados en el Laboratorio de Tuberculosis FMVZ-UNAM en el programa IDT's PrimerQuestSM desarrollado por Whitehead Institute for Biomedical Research:

Sentido.	Antisentido.
G3PDH 5'-CAT GTT TGT GAT GGG CGT GAA CCA-3'	3'-TAA GTC CCT CCA CGA TGC CAA AGT-5'
Arginasa II 5'-ATG CAT TTG ACC CTA CAC TGG-3'	3'-AGG TCA GTC CCC CTA CAA CA-5',
Interleucina-1β: 5'-CTA GCC CAT GTG TGC TGA AG-3'	3'-CCA CTT CTC GGT TCA TTT CC-5'
Interleucina-6: 5'-GCC TGA GAG CTA TTC GGA TG-3'	3'-TGC CCA GGA ACT ACC ACA AT-5'
Interleucina 10: 5'-ACT CTG TTG CCT GGT CTT CC-3'	3'-GAC AGG GTG CTC GCA TCT-5'
Interleucina 12p40: 5'-TTG CTC TCA GCA GAG AAG GTC-3'	3'-CTG CCC TCC TGA CAC TCC-5'
Interleucina-18: 5'-CAC GTT TCC TCT CCT AAG AAG C-3'	3'-TAC TTG TTC TGC AGC CAT CTT T-5'
Óxido Nítrico Sintasa Inducible: 5'-CCA TGG AAC ATC CCA GGT A-3'	3'-GCA GGG CGT ACC ACT TGA-5'
Proteína Quimiotáctica de Macrófago-1: 5'-CCA GAT GCA ATT AAC TCC CAA G-3'	3'-GCA TGG AGA TCT TCT TAC TGT TGA-5'
Proteína Quimiotáctica de Macrófago-2:	

5'-AAG CAG AAG TGG GTC CAG ACT-3'	3'-CTT CGG TGT TCG GGA CTT T-5'
Proteína inflamatoria de Macrófago-1:	
5'- ACC ATT TGG CGC TGA CAC-3'	3'-CGA TTT TGC GAG AAA GCT G-5'
Proteína inflamatoria de Macrófago-3:	
5'- GCA AGT CAG AAG CAA GCA ACT-3'	3'-TGG GGT GAA GTA TTC GTT CTG-5'
Factor Transformante de crecimiento-β:	
5'- CCG AAC CTG TGT TGC TCT CT-3'	3'-CGT GCT GCT CCA CTT TTA ACT-5'
Factor de Necrosis Tumoral-α:	
5'- GTG TGA AGC TGG AAG ACA ACC-3'	3'-CCC TGA AGA GGA CCT GTG AG-5'
Molécula señalizadora y activadora de linfocitos	
5'-AGG GGA CCA CGT GAC TTA CA-3'	3'-AGC TAT TGG TGG GAC TCA GC-5'
Receptor de manosa del macrófago	
5'-GCT CAT GTC AAC TGC ATT CAA-3'	3'- GGT AAC AAG TCT TTG GAA TCT CCT-5'
Receptor scavenger 1 del macrófago	
5'-TCT GTG AAG TTC GAT GCT CGC TCA-3'	3'- TTT CAG GAG CTG AGC TGC CAC TAT-5'
Receptor tipo Toll-2	
5'- TCC ACG GAC TGT GGT ACA TGA AGA-3'	3'-GCT TAA AGG GAG GGT TGA AGT GCT-5'
Receptor tipo Toll-4	
5'- TCA GAG TTT CCT GCA GTG GGT CAA-3'	3'-ACT AAG CAC TGG CAT GTC CTC CAT-5'

El PCR en tiempo real se realizó en un equipo LyghtCycler 480 de ROCHE, usando SYBR® Green I (10,000x Cambrex Bio Science Rockland Inc USA) como sistema de detección. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl los cuales contenían SYBR® Green I (0.165x), Buffer PCR 1x (20 mM Tris-HCL pH 8.4 y 50 mM KCl), MgCl₂ (4 mM), dNTPs (200 µM cada uno), iniciadores (0.5 µM de cada uno), Platinum® Taq ADN polimerasa (1.25 U) (Invitrogen™ São Paulo, SP Brasil) y 5 µl del ADNc diluido. La mezcla se colocó en placas ópticas de 96 pozos. Después de una activación de la enzima a 95°C por 10 minutos, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 95°C por 45 s , alineación 62°C por 15 s y extensión a 72°C por 40 s; al final de los 35 ciclos se dio una extensión de 5 minutos a 72°C. Finalizado el PCR, la temperatura se incrementó de 60°C a 95°C para construir una curva de disociación. Se colocó una reacción control sin template de ADNc (NTC) en cada placa y cada muestra se realizó por triplicado.

La cuantificación de ARNm se realizó por el método de cuantificación relativa que consiste en comparar el CT de la muestra desconocida con una muestra calibradora que sirve como

referencia fisiológica (muestras provenientes de células no infectadas no estimuladas). Todas las cuantificaciones, también fueron normalizadas con un control endógeno en este caso *G3PDH* para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de ARN y la eficiencia de reacción en la transcripción reversa. Este método fue seleccionado debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido.

Primero, el CT de la muestra (CT) y del control interno *G3PDH* (CT *G3PDH*) son determinados para cada muestra. La diferencia que resulta de CT de la muestra y CT *G3PDH* es llamada ΔCT ; y se calcula para normalizar las diferencias en la extracción de ARN y en la eficiencia de la reacción de síntesis de ADNc. El ΔCT de cada muestra es restado del ΔCT del calibrador. Esta diferencia es llamada $\Delta\Delta CT$. Por último, la expresión de la proteína en cuestión es normalizada con el control interno (*G3PDH*) y relativa al calibrador, se calcula por $2^{-\Delta\Delta CT}$. Así, la diferencia en la expresión de la muestra se expresa como n-veces relativa al calibrador (Applied Biosystems).

Las ecuaciones para calcular $\Delta\Delta CT$ para el método de cuantificación relativa son:

CT de la muestra - CT *G3PDH* = ΔCT .

ΔCT de la muestra - ΔCT del calibrador = $\Delta\Delta CT$.

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

5.22.- Análisis Estadístico

Para determinar la significancia estadística se obtendrá la media y la desviación estándar para cada gen (triplicado) y la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey con $P < 0.05$ para ver la diferencia entre cepas.

5.23.- Evaluación de la cepa mutante $\Delta mce2A$ de *M. bovis* como candidato a ser utilizado como vacuna contra la tuberculosis en un modelo murino.

5.24.- Modelo Experimental de Tuberculosis Pulmonar Progresiva en ratones BALB/c

Todos los procedimientos se desarrollaron en gabinete de flujo laminar nivel III y el trabajo con animales de laboratorio se realizó de acuerdo a las normas del Comité de Ética Institucional y a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Para inducir una tuberculosis pulmonar en ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad. Los ratones fueron anestesiados con sevoflurano y se colocaron en posición vertical para

inocularlos intratraquealmente con una suspensión de 100 μ l de SSF con 2.5×10^5 bacterias viables de la mutante *M. bovis* $\Delta mce2$ o *M. bovis* UK. Se mantuvieron en posición vertical hasta que pasó el efecto del anestésico (Hernández-Pando, et al 1996).

Los animales se mantuvieron en microaisladores en unidades de aislamiento con agua y alimento comercial sin restricción por 60 días. El experimento se realizó por duplicado.

A) Sobrevida

La sobrevida se registró a lo largo de los 60 días del experimento para cada uno de los grupos y se expresó en porcentaje.

B) Evolución de la infección

Grupos de 8 ratones en dos diferentes experimentos fueron sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 días después de la infección intratraqueal.

Para cada día de muestreo, 4 pulmones y bazos fueron removidos y se realizó la cuantificación bacteriana por unidades formadoras de colonia (UFC), por diluciones seriadas, en medio 7H10-OADC cultivando a 37°C por 28 días. Los valores fueron expresados como la media \pm SD de UFC. Los pulmones de los otros 4 animales fueron perfundidos con etanol al 100 %, vía intratraqueal e inmerso en el mismo fijador por 24 horas, y embebidos en parafina para realizar cortes histológicos y teñirlos con HyE. Estos fueron utilizados para el seguimiento de la evolución de la enfermedad. El área ocupada por granulomas y el porcentaje de la superficie afectada por la neumonía fue determinada utilizando un analizador de imágenes automatizado (QWin Leica 500 W equipment from Leica Imaging Systems, Cambridge UK) (Hernández-Pando, et al 1996).

C) Atenuación de la virulencia

Para determinar la atenuación de la virulencia de la cepa mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ en comparación con su cepa parental *M. bovis* UK y la cepa vacunal BCG, se utilizaron 20 ratones inmunodeficientes (desnudos) para cada uno de los grupos experimentales, 10 de ellos fueron inoculados por vía intratraqueal con la dosis de reto de 2.5×10^5 /bacterias y los otros 10 por vía subcutánea en la base de la cola con la dosis vacunal de 5×10^3 /bacterias. Los animales se mantuvieron en microaisladores y se registró la sobrevida.

D) Comparación de la diseminación e inmunogenicidad de BCG y la mutante de *M. bovis* $\Delta mce2$ en ratones vacunados antes del desafío

Para estudiar la diseminación de los bacilos y la producción de IFN γ por células estimuladas con antígenos bacterianos como indicador de atenuación e inmunogenicidad respectivamente, dos experimentos independientes fueron desarrollados usando 40 ratones BALB/c por cada grupo experimental. Tres diferentes dosis (2500, 5000 y 8000 bacilos vivos) de la mutante $\Delta mce2A$ fueron comparadas vacunando ratones subcutáneamente en la base de la cola, y la dosis que indujo la mayor producción de IFN γ fue utilizada para el experimento de protección. Se presenta el resultado obtenido con la

dosis seleccionada para la vacunación: 5000 bacterias vivas para la mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ y 8000 para BCG.

Para el experimento de diseminación de las micobacterias, grupos de 4 ratones fueron sacrificados a los 15, 30 y 60 días pos vacunación. Los linfonodos inguinales, bazo y pulmón y tejido subcutáneo del sitio de la inoculación (base de la cola), fueron inmediatamente diseccionados y homogenizados con un Politrón (Kinematica, Luzern, Switzerland) en tubos de 3 ml conteniendo 1 ml de PBS estéril, se realizaron diluciones decuples seriadas que fueron sembradas por duplicado en cajas de agar Middlebrook 7H10 (Difco Lab code 0627-17-4, Difco Labs, Detroit, MI) enriquecido con OADC. El tiempo de incubación y cuenta de colonias fue de 21 días.

E) Inmunogenicidad

Para determinar la inmunogenicidad, por la comparación de la producción de $IFN\gamma$ por las células de pulmón, linfonodos regionales y bazo después de la estimulación con antígenos de filtrado de cultivo de micobacterias (CFA) y los antígenos recombinantes inmunodominantes de *M. tuberculosis* ESAT6 y Ag85, grupos de 4 ratones Balb/c fueron sacrificados a los 15, 30 y 60 días pos vacunación. Se colectaron inmediatamente pulmón, bazo y linfonodos inguinales y se colocaron en 2 ml de medio RPMI conteniendo 0.5 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Worthington, NJ USA) y se incubaron 1 hora a 37°C., después se pasaron con el émbolo de una jeringa por un tamiz celular de 70 μm y se lavaron con el medio. Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm/5 min, el sobrenadante fue removido y las eritrocitos eliminados con solución amortiguadora de lisis. Después las células fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado con 2 mM de l-glutamina (Sigma), 100 UI de penicilina/ml (Sigma), 1 μg de estreptomina (Sigma) y 10 % de suero fetal bovino. Se realizaron cultivos para la producción de citocinas en placas de 96 pozos de fondo plano (10^6 células/ml en medio de cultivo) sensibilizadas con y sin antígenos bacterianos 5 $\mu g/ml$: Filtrado de cultivo (CFA), ESAT-6 y antígeno 85 (Ag 85). Después de 3 días de estimulación con el antígeno, las placas fueron centrifugadas y el sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de $IFN\gamma$ por medio de una ELISA comercial (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Los resultados se expresaron en concentración de $IFN\gamma$ (pg/ml).

5.25.- Protección contra las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* LAM 09995186 y contra cepas las de *M. bovis* AN5, 534 y 04-302 en ratones BALB/c vacunados con la mutante *M. bovis* $\Delta mce-2$ o con *M. bovis* BCG Phips.

Para dos experimentos diferentes, se utilizaron 40 ratones BALB/c para cada uno de los 5 grupos experimentales.

Los ratones fueron inmunizados por vía subcutánea en la base de la cola con una suspensión de 5000 bacilos vivos de la mutante *M. bovis* $\Delta mce-2$ o 8000 bacilos vivos de BCG Phips y un grupo control sin vacunar fue inyectado con SSF. A los 60 días pos

vacunación, 20 ratones de cada grupo fueron desafiados por vía intratraqueal con 2.5×10^5 UFC de:

- a) *M. tuberculosis* H37Rv
- b) *M. tuberculosis* LAM 09995186.
- c) *M. bovis* AN5
- d) *M. bovis* 302.
- e) *M. bovis* 534

Se seleccionaron estas cepas porque tienen diferentes niveles de virulencia en este modelo animal (Aguilar, et al 2009, Marquina-Castillo, et al 2009).

El nivel de protección fue determinado a los 60 días pos desafío por la cuantificación de las UFC en los homogenizados de los pulmones, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y por los análisis automatizados de la morfometría pulmonar (QWin Leica 500 W equipment from Leica Imaging Systems, Cambridge UK), midiendo el área del pulmón afectada por neumonía, entendiéndose por esta como el espacio alveolar ocupado por células y exudados proteicos. La superficie ocupada por la neumonía fue cuantificada y el porcentaje del área afectada del pulmón fue determinada.

Para construir las curvas de supervivencia, 10 ratones de cada grupo se separaron en microaisladores y se utilizaron para registrar las muertes.

Para determinar el efecto de memoria inmunológica conferida por la vacunación, se desafiaron ratones después de 6 meses de haberse vacunado. Tres grupos de 20 ratones BALB/c fueron utilizados. El primer grupo fue vacunado con 5000 bacilos vivos de la mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ en la base de la cola, el segundo grupo recibió 8000 bacilos vivos de BCG por la misma ruta y el grupo control fue inyectado con SSF. Los animales fueron desafiados 6 meses después de la vacunación con 2.5×10^5 bacilos viables de *M. bovis* AN5. Al día 60 posdesafío, los niveles de protección fueron determinados por la cuantificación de UFC en los homogenizados de los pulmones y midiendo la superficie afectada del pulmón. Otro grupo de 10 animales se separaron en microaisladores registrando la mortalidad para construir las curvas de supervivencia.

5.26.- Análisis estadístico

Para obtener las curvas de supervivencia se utilizó la prueba de Kaplan-Meir. Para determinar la significancia estadística de las UFC, la histopatología, la expresión de $IFN\gamma$, se utilizó la prueba de T de Students, se considerará una significancia de $p < 0.05$.

6.- RESULTADOS

6.1.- Expresión del gen de la invasina Mce2A en un cultivo bacteriano de *M. bovis* *in vitro*

Con el fin de conocer el nivel de expresión del gen *mce2A* de *M. bovis*, se evaluaron diferentes condiciones de crecimiento del microorganismo *in vitro* e *in vivo*.

El gen *mce2A* de *M. bovis* durante su desarrollo en un cultivo *in vitro* incrementa su nivel de expresión a lo largo de la curva de crecimiento. En la fase estacionaria ($A_{600}= 1.0$) se observa su nivel máximo de expresión con una sobre regulación de 7.73 veces más en comparación con la condición de referencia, que es la fase de adaptación lag ($A_{600}= 0.2$) del cultivo bacteriano y 6.27 veces más en comparación con la fase logarítmica del cultivo ($A=0.4$). En la fase logarítmica el gen *mce2A* se expresa 1.43 veces más en comparación con la fase de crecimiento de adaptación ó lag del cultivo. (Figura 1).

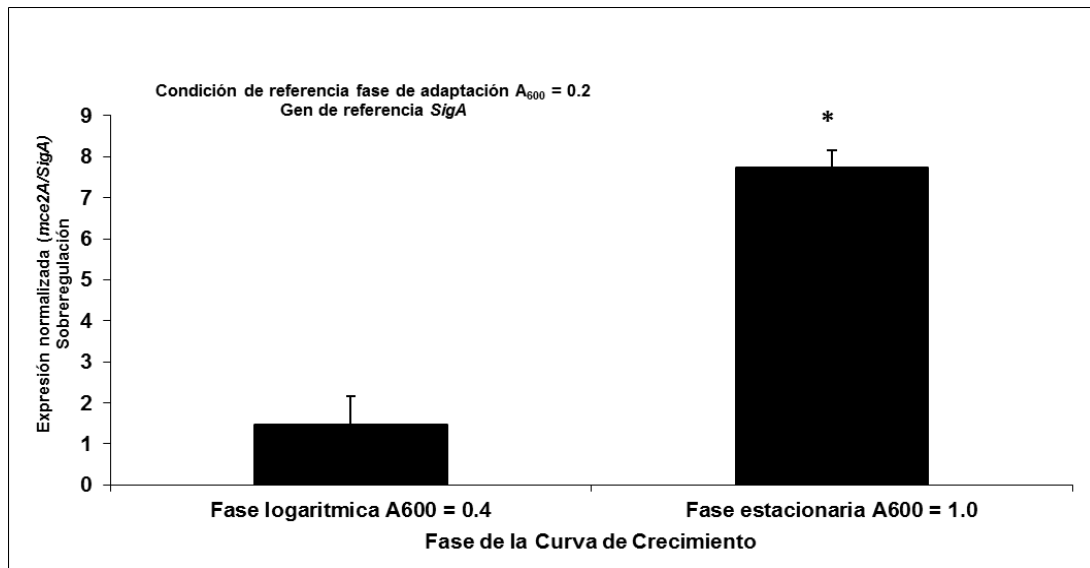


FIGURA 1.- Expresión del gen *mce2A* de *M. bovis* *in vitro*. Cultivo de *M. bovis* en Middelbrook 7H9, la expresión del gen *mce2A* fue cuantificado por qPCR en diferentes etapas de la curva de crecimiento. La gráfica representa el número de veces que esta sobre expresado el gen en relación con la fase de adaptación. El asterisco representa significancia estadística ($p < 0.05$). Gen de referencia *SigA*.

La expresión del gen *mce2A* de *M. bovis* al infectar macrófagos es significativa después de 48 y 72 horas pos infección con una sobre regulación de 2.51 y 1.93 veces mayor en relación con la condición de referencia de 24 horas pos infección, no se observa diferencia entre los tiempos de 48 y 72 horas pos infección. (Figura 2).

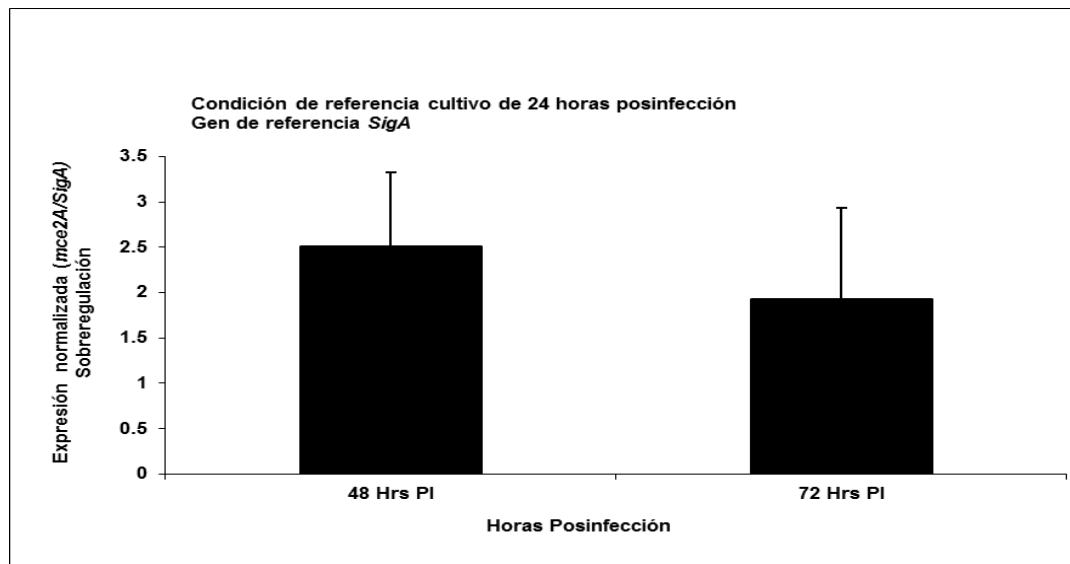


Figura 2.- Expresión del gen *mce2A* de *M. bovis* dentro de macrófagos murinos de la línea celular J774. Cultivo de células J774 infectadas con *M. bovis* (MOI 10:1). La expresión del gen *mce2A* fue cuantificado por qPCR a las 24, 48 y 72 horas pos infección. La grafica representa la sobre expresión del gen en relación a las 24 horas pos infección, gen de referencia *sigA*.

6.2.- Expresión del gen *mce2A* y localización de la invasina *Mce2A* de *M. tuberculosis* en tejido pulmonar en una cinética de infección en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

La expresión del gen de la invasina *Mce2A* en el modelo murino de enfermedad progresiva muestra un incremento importante durante la primera etapa de la infección, alcanzando su máximo nivel de expresión al final de la etapa protectora e inicio de la etapa progresiva (día 28) mostrando una diferencia significativa con el primer día de infección y con el final de la etapa progresiva de la infección (día 120). (Figura 3).

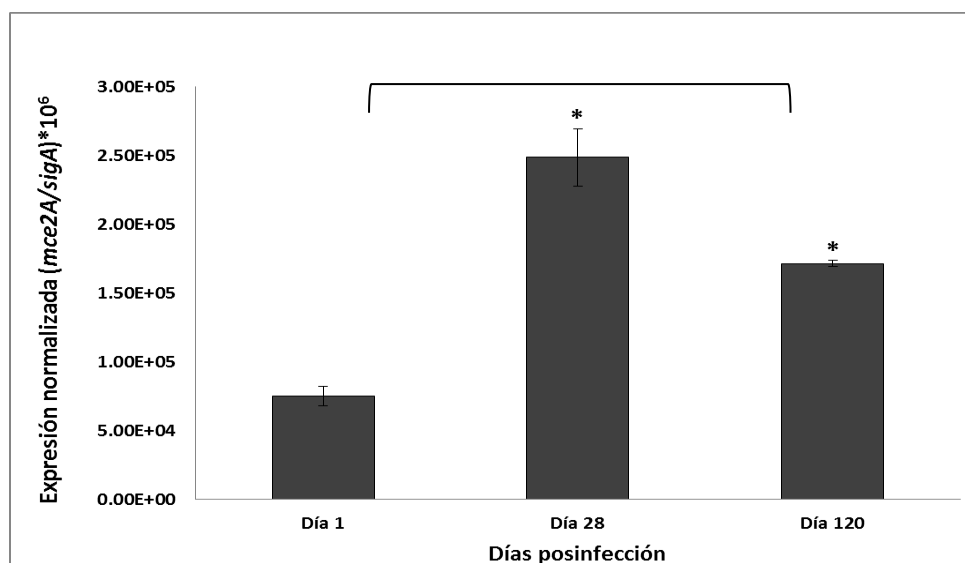


Figura 3.- Expresión del gen *mce2A* de *M. tuberculosis* en el modelo murino de Enfermedad Pulmonar Progresiva. Los ratones fueron sacrificados en los días indicados y la expresión del gen *mce2A* de *M. tuberculosis* fue cuantificado por qPCR. La gráfica representa el número de copias que esta sobre expresado el gen. El asterisco representa significancia estadística ($p < 0.05$). Gen de referencia *SigA*.

6.3.- Expresión y purificación de la invasina Mce2A recombinante de *M. bovis*

6.4.- La clonación y expresión del gen *mce2A* de *M. bovis*

Para la obtención de la proteína recombinante Mce2A de *M. bovis* se utilizó un plásmido que fue clonado en *E. coli*. Se realizó una cinética de crecimiento para determinar el tiempo óptimo de inducción de la proteína recombinante. De acuerdo a la gráfica la inducción con IPTG se realizó a las 7 horas del cultivo (Figura 4a). La inducción se comprobó con un inmunoblot con α -Histidina, la banda de 31 KDa representa el reconocimiento a la cola de histidina de la proteína Mce2Ar (Figura 4b). La proteína se purificó por cromatografía de afinidad a metales pesados-Ni (Figura 4c). El anticuerpo policlonal α -Mce2 se produjo en conejos utilizando la proteína Mce2Ar purificada. Las bandas en el inmunoblot muestran el reconocimiento del anticuerpo policlonal α -Mce2A contra la proteína Mce2A en los diferentes refuerzos aplicados a los conejos (Figura 4d).

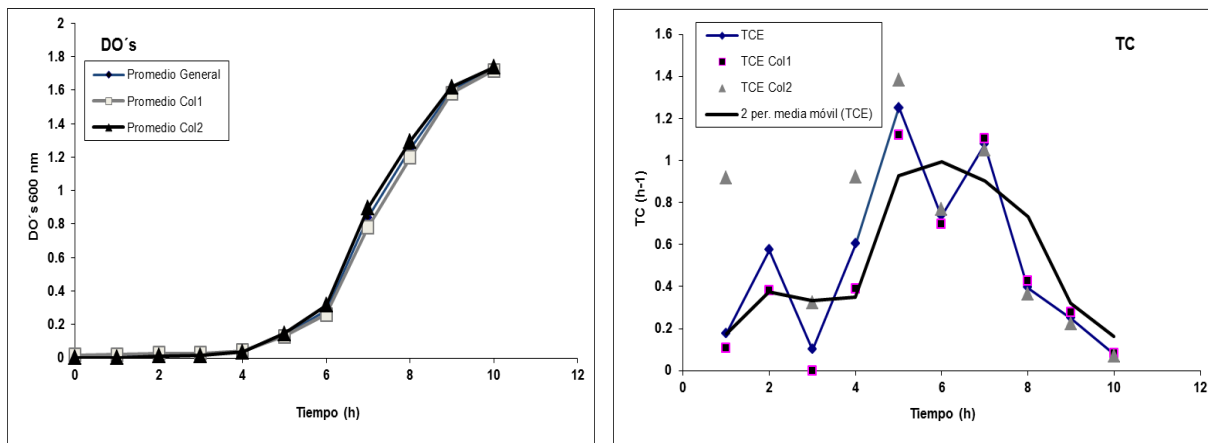


Figura 4a.- Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 clonada con pRSET::*mce2A* y curva de Taza de Crecimiento Específico (tasa de duplicación vs velocidad de crecimiento). Las gráficas de crecimiento determinan el mejor punto de inducción del gen clonado, que fue a las 6 horas después de iniciado el cultivo.

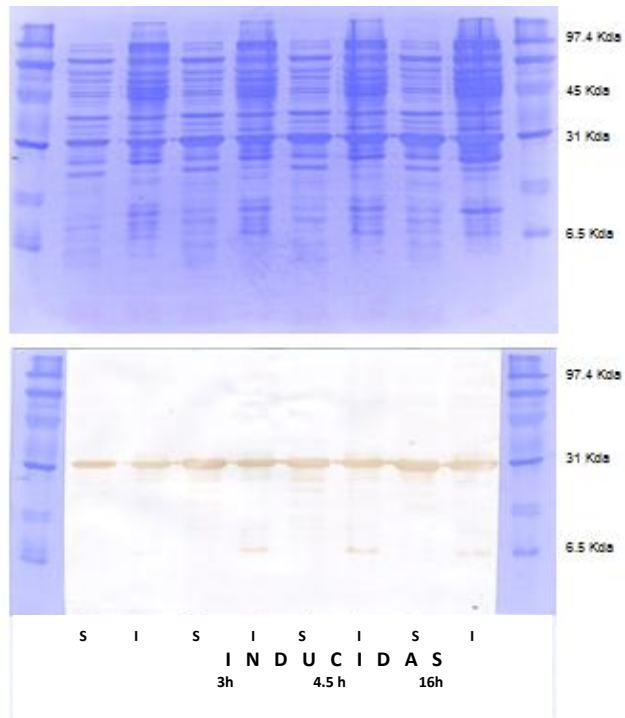


Figura 4b.- Inducción de la expresión de la proteína Mce2Ar con 250 mM de IPTG e inmunoblot α -Histidina. La expresión del gen *mce2A* clonado en *E. coli*, fue inducido con IPTG a diferentes horas de cultivo. Después de la lisis de las bacterias se realizó la electroforesis de los sobrenadantes. La proteína Mce2Ar (31 Kd) se observó en SDS page y la presencia de la proteína recombinante con tallo de histidina fue comprobada por inmunoblot utilizando un antisuero α -histidina.

Purificación de la Proteína MCE-2A de *M. bovis*

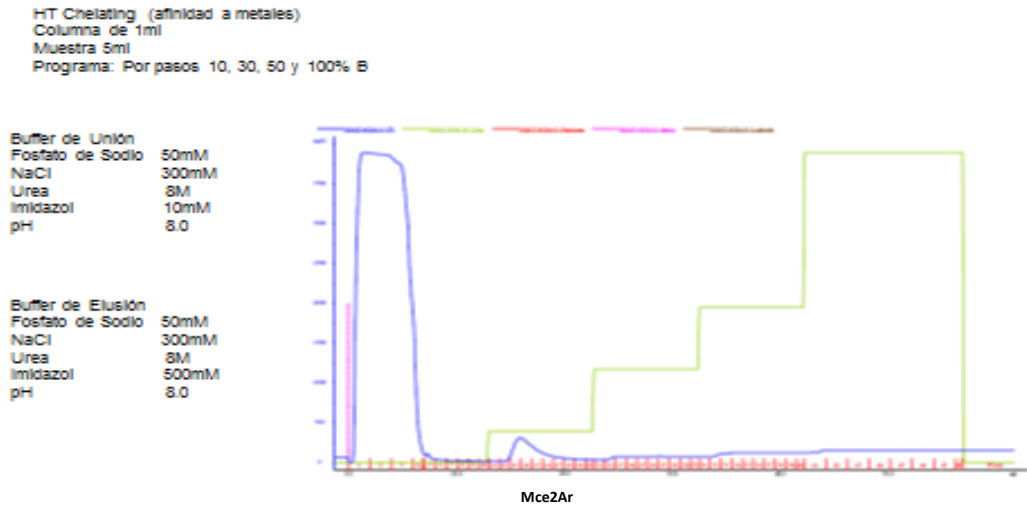


Figura 4c.- Purificación de la proteína recombinante Mce2A por cromatografía de afinidad a metales. La purificación de la proteína Mce2Ar se realizó de forma semiautomática en un programa por pasos por cromatografía de afinidad a metales. La concentración de la proteína de las fracciones fue cuantificada por Lowry.

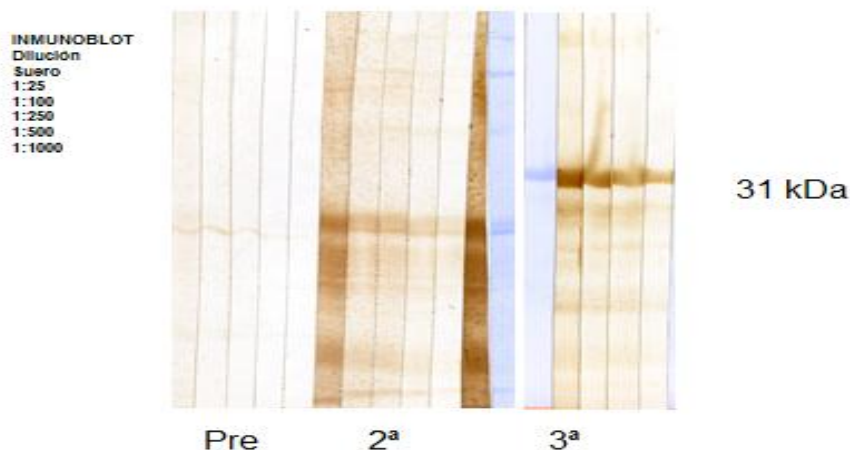


Figura 4d.- Inmunoblot de los sueros hiperinmunes α -Mce2A, elaborados en conejo, contra la proteína recombinante Mce2A. La proteína Mce2A purificada se separó por electroforesis en SDS-PAGE y transferida por inmunoblot a una membrana de nitrocelulosa, el antígeno particulado se utilizó para inmunizar conejos. La titulación y la afinidad del antisuero policlonal producido en los conejos (α -Mce2) se comprobó por inmunoblot, utilizando la proteína recombinante de 31 kDa y los sueros de los diferentes días de sangrado.

6.5.- Localización de la invasina Mce2A en tejido pulmonar de ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv por Inmunohistoquímica e Inmunomicroscopía electrónica

Con el fin de determinar el grado de expresión y localización de la invasina Mce2A en el tejido pulmonar, en una cinética de infección con *M. tuberculosis* en ratones BALB/c, se realizaron cortes histológicos en diferentes días de la infección y la invasina Mce2A se localizó por medio de inmunomicroscopía, utilizando el anticuerpo α -Mce2A producido.

Al día 1 se observa una cantidad importante de marcaje dentro de los macrófagos alveolares, los bacilos se encuentran en su mayoría dentro del citoplasma de los macrófagos y ligeras zonas de marcaje en los espacios alveolares y células epiteliales. De manera interesante del día 3 al 14, que en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, corresponde a la fase protectora y del control del microorganismo, caracterizada por un balance Th1, el número de microorganismos disminuye considerablemente, observándose un menor reconocimiento de la invasina Mce2A que solo se localiza dentro de macrófagos y en el interior de granulomas a partir del día 7 (Figuras 5a, 5b). Del día 21, donde termina la fase protectora y comienza la fase progresiva de la enfermedad, al día 60 pos infección, el número de granulomas se incrementa y dentro de ellos el número de bacilos. En el día 60 se observan macrófagos vacuolados que están fusionados y contienen una gran cantidad de micobacterias dentro de ellos, esto hace que se observe una fuerte tinción de la invasina Mce2A (Figura 5c).

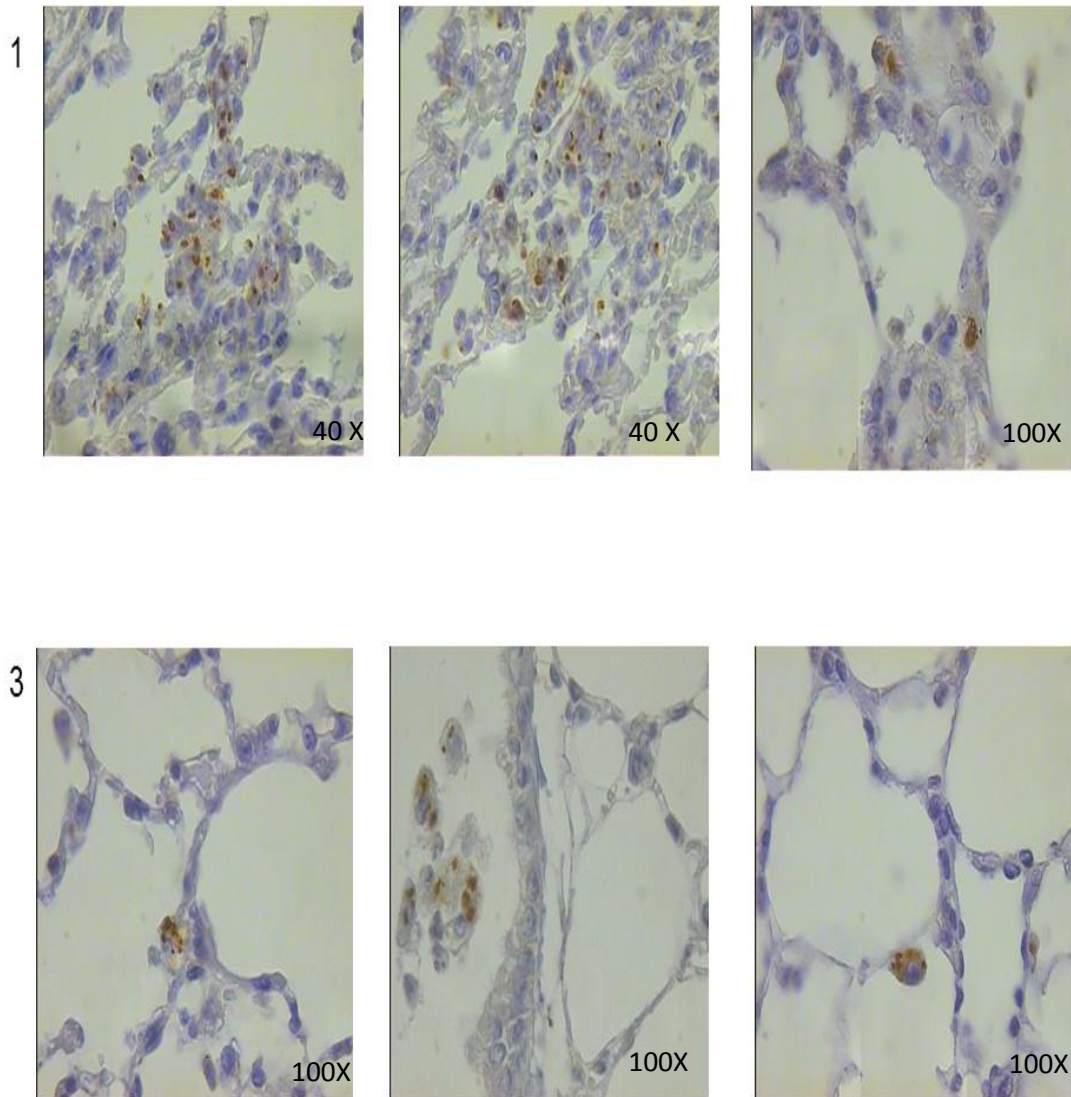


Figura 5a.- Expresión y localización de la invasina Mce2A en una cinética de infección con *M. tuberculosis* H37Rv en el modelo murino de Tuberculosis Pulmonar Progresiva por medio de inmunohistoquímica (IHQ α - Mce2A) Día 1 y 3. Los ratones fueron sacrificados en los días indicados después de la infección, los pulmones fueron inmediatamente removidos, fijados y preparados para inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo α -mce2A para la localización y determinación cualitativa de las micobacterias en el tejido.

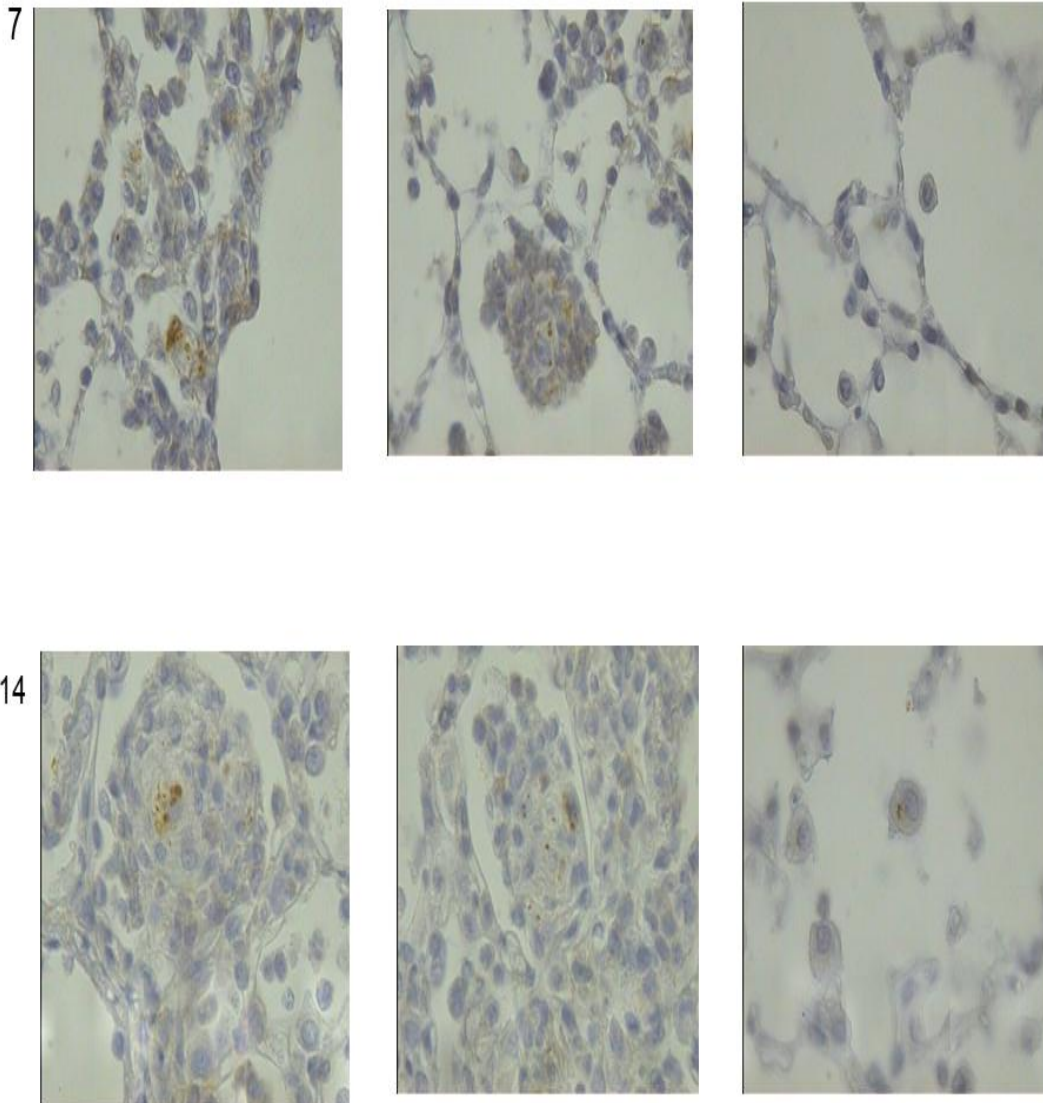


Figura 5b.- Expresión y localización de la invasina Mce2A en una cinética de infección con *M. tuberculosis* H37Rv en el modelo murino de Tuberculosis Pulmonar Progresiva por medio de inmunohistoquímica (IHQ α - Mce2A) Día 7 y 14 (100X). Los ratones fueron sacrificados en los días indicados después de la infección, los pulmones fueron inmediatamente removidos, fijados y preparados para inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo α -mce2A para la localización y determinación cualitativa de las micobacterias en el tejido.

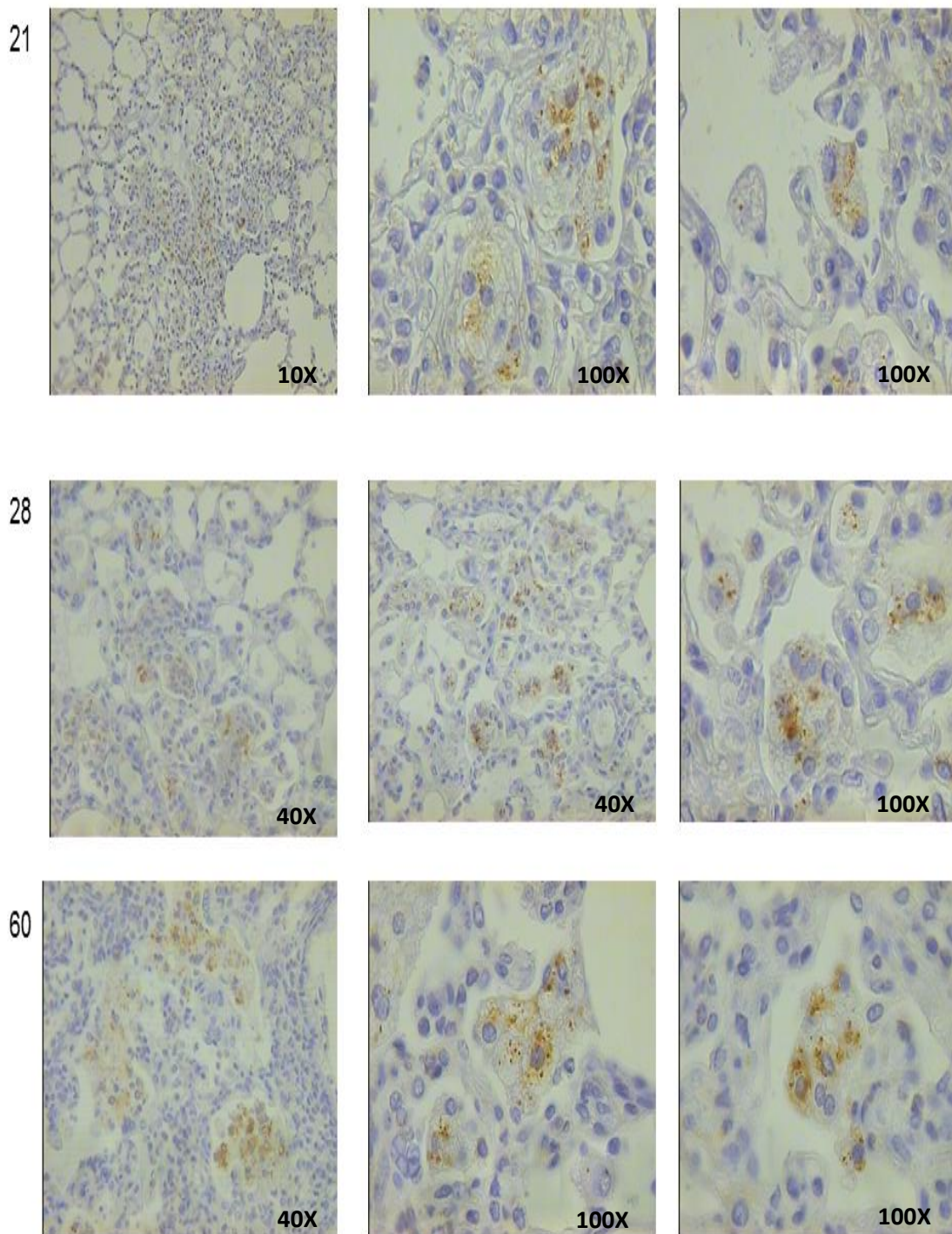


Figura 5c.- Expresión y localización de la invasina Mce2A en una cinética de infección con *M. tuberculosis* H37Rv en el modelo murino de Tuberculosis Pulmonar Progresiva por medio de inmunohistoquímica (IHQ α - Mce2A) Día 21, 28 y 60. Los ratones fueron sacrificados en los días indicados después de la infección, los pulmones fueron inmediatamente removidos, fijados y preparados para inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo α -Mce2A para la localización y determinación cualitativa de las micobacterias en el tejido.

La alta afinidad que muestra al anticuerpo α -Mce2A contra la invasina, permitió observar en preparaciones para microscopía electrónica de transmisión, la localización de los bacilos dentro de los macrófagos y en ellos se ve claramente la localización de la invasina en la superficie de la bacteria. Además se observa inmunodetección de la proteína Mce2A en diferentes sitios del citoplasma, posiblemente restos de micobacterias y es claro ver esta proteína, también dentro del núcleo del macrófago (Figura 5d).

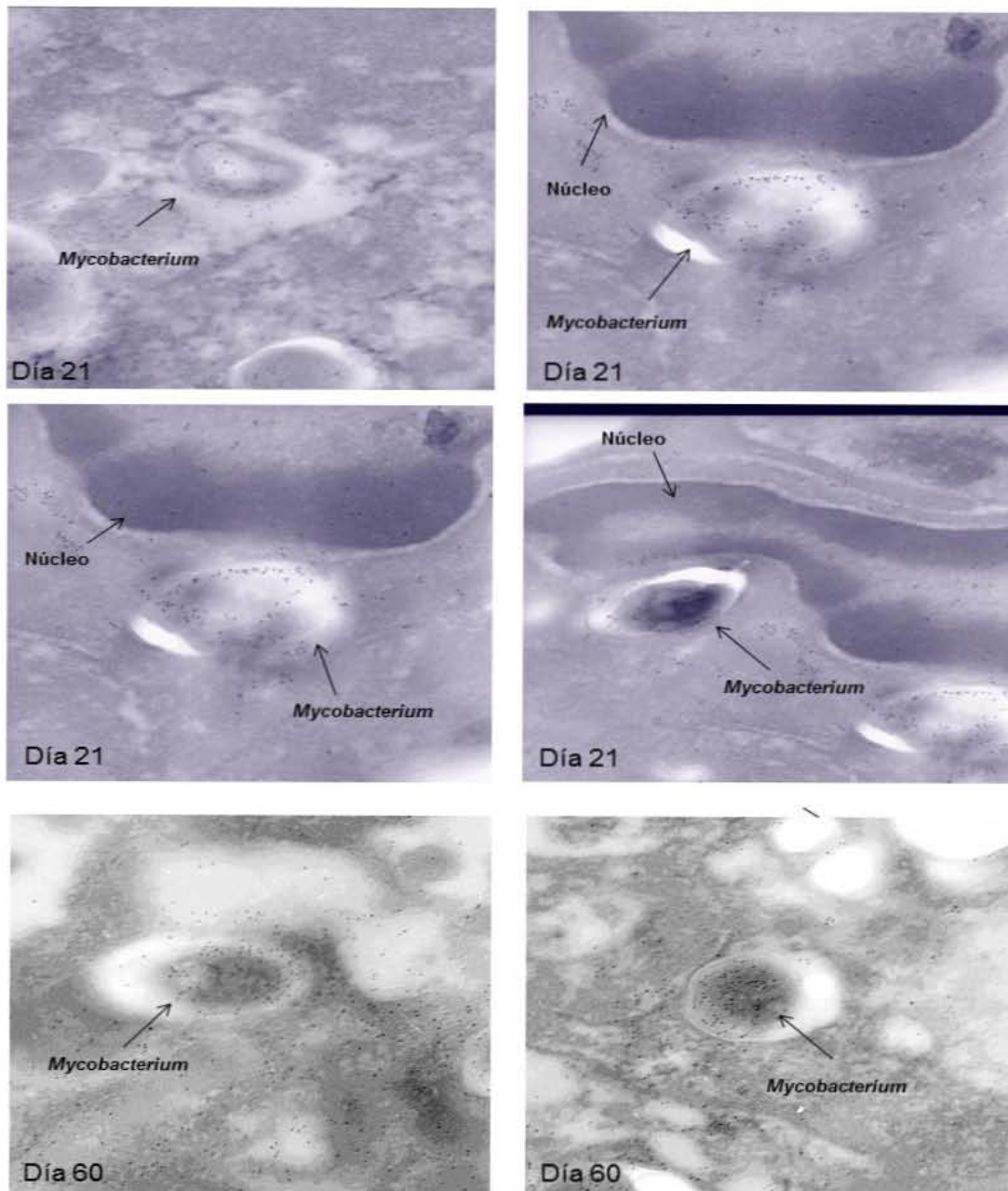


Figura 5d.- Expresión y localización de la invasina Mce2A en una cinética de infección con *M. tuberculosis* H37Rv en el modelo murino de Tuberculosis Pulmonar Progresiva por medio de Inmuno microscopía Electrónica (α -Mce2A) Día 21 y 60. El tejido pulmonar fue incluido en resina acrílica hidrosoluble (LR-White), se realizaron cortes de 70 nm, el anticuerpo de detección fue α -Mce2A y el secundario α -IgG de conejo conjugado a oro. Se muestran macrófagos conteniendo micobacterias 63000X. Cada marca corresponde a 5nm.

6.6.- El anticuerpo policlonal α -Mce2A es útil en el diagnóstico de la tuberculosis por inmunohistoquímica

El anticuerpo α -Mce2A demostró tener una alta afinidad por la invasina Mce2A de bacterias del complejo *M. tuberculosis*, Por lo que se procedió a evaluar su utilidad para el diagnóstico posmortem de la tuberculosis en diferentes muestras provenientes de animales y humanos. Los cortes histológicos de linfonódulo de bovino, pulmón de bovino, ave y ratón en los cuales se confirmó la presencia de *M. bovis*, mostraron una fuerte positividad a la invasina Mce2A de *M. bovis* por inmunohistoquímica, de igual manera, los cortes de encéfalo de humanos con diagnóstico de tuberculosis por *M. tuberculosis*, también mostraron una fuerte inmunotinción. Los cortes de intestino de bovino con diagnóstico de paratuberculosis producida por *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, mostraron una reacción menos intensa, pero de igual forma positiva. (Figura 5e).

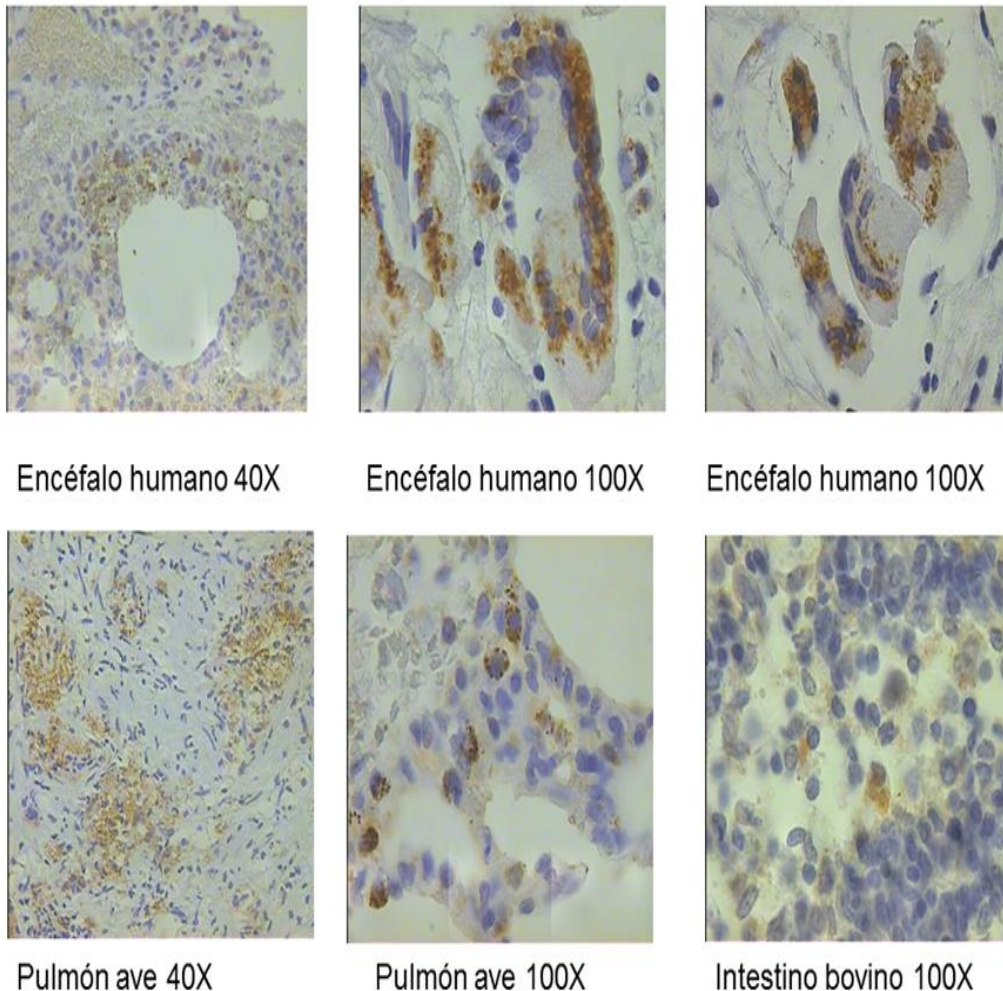


Figura 5e.- Expresión y localización de la invasina Mce2A en tejido infectados con diferentes especies de *Mycobacterium* por inmunohistoquímica (IHQ α - Mce2A). Tejidos naturalmente infectados con diferentes especies del genero *Mycobacterium* (encéfalo humano: *M. tuberculosis*, pulmón de ave: *M. bovis* y intestino de bovino: *M. avium* sbsp *paratuberculosis*) fueron probados por inmunohistoquímica con α -Mce2A para evaluar su utilidad en el diagnóstico.

6.7.- Ensayo de inmunogenicidad de la proteína Mce2A

Con el objetivo de determinar el grado de inmunogenicidad de la invasina Mce2A se determinó su capacidad de activación de la inmunidad celular por la producción de $\text{IFN}\gamma$ en suspensiones celulares de pulmón y bazo de ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Las células fueron estimuladas con antígenos micobacterianos incluyendo la proteína Mce2A en dos concentraciones diferentes. La concentración de $\text{IFN}\gamma$ en sobrenadantes fue cuantificada por ELISA. La figura 6 muestra que la proteína Mce2A (5 μg) es casi tan eficiente en la inducción de la producción de $\text{IFN}\gamma$ como Ag85 en pulmón y ligeramente mayor en bazo. En comparación con ESAT6 es menos inmunogénica en tejido pulmonar pero similar en bazo.

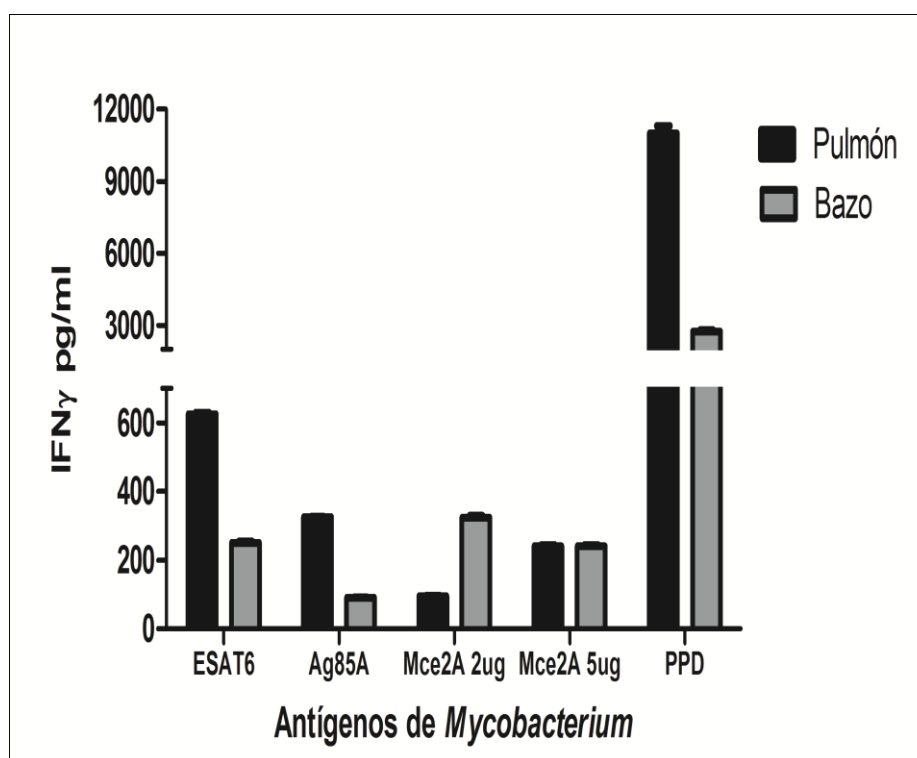


Figura 6.- Producción de $\text{IFN}\gamma$ por células de pulmón y bazo, de ratones infectados con *M. tuberculosis*, estimuladas con diferentes antígenos micobacterianos. Órganos de ratones infectados con *M. tuberculosis* fueron usados para obtener suspensiones celulares, las cuales fueron estimuladas con antígeno ESAT6, 85A, PPD bovino o mce2A. El $\text{IFN}\gamma$ fue cuantificado por ELISA en los sobrenadantes.

6.8.- Ensayo de Inhibición del crecimiento bacteriano de un cultivo in vitro de *M. tuberculosis* utilizando el anticuerpo policlonal α -Mce2A

Se ha descrito la capacidad de las inmunoglobulinas de tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de *M. tuberculosis* particularmente cuando se utilizan sueros de pacientes infectados con tuberculosis o antisueros dirigidos contra antígenos de *M. tuberculosis*. Con la finalidad de determinar si el anticuerpo α -Mce2A tiene un efecto inhibitorio en el

desarrollo de *M. tuberculosis* en un cultivo bacteriano, se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento con número constante de bacterias contra diluciones dobles seriadas del anticuerpo α -Mce2A. A las 24 horas de incubación de la bacteria con el anticuerpo α -Mce2A, se observa una disminución del número de bacterias en comparación con el control y en varias diluciones, siendo significativo en la dilución 1:400. (Figura 7).

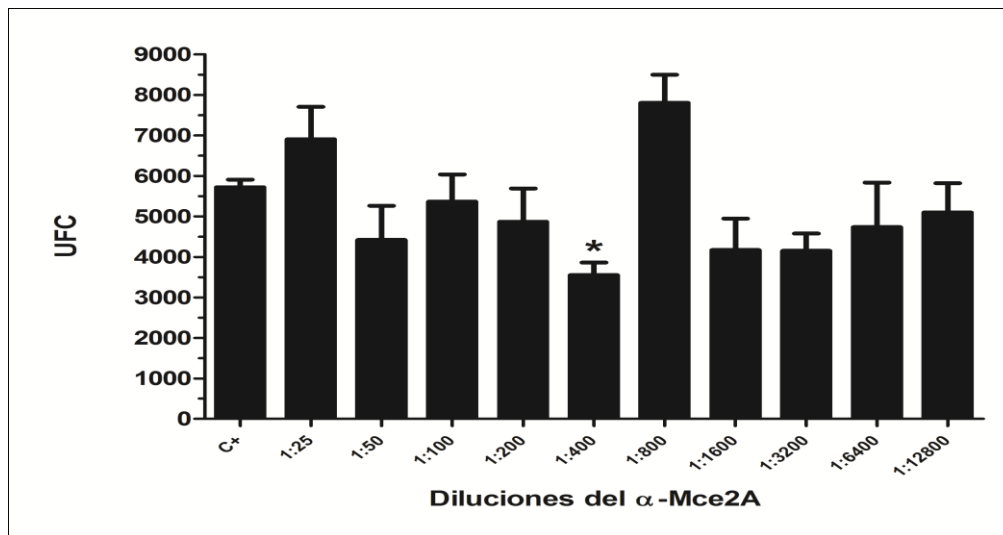


Figura 7.- Efecto del anticuerpo α -Mce2A sobre un cultivo de *M. tuberculosis* LAM 09005186 con concentración constante (5000 bacterias) contra diluciones del anticuerpo policlonal α -Mce2A. Inhibición de crecimiento de *M. tuberculosis* en un cultivo por efecto de la presencia del anticuerpo α -Mce2A. Las barras representan la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. El asterisco indica diferencia estadística ($P < 0.05$) de la dilución 1:400 con todas las diluciones del anticuerpo probadas, excepto 1:50 y 1:1600.

6.9.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de *M. bovis* en cultivo de macrófagos bovinos

Recientemente se ha reportado que anticuerpos policlonales contra secuencias conservadas de la proteína Mce1A bloquea la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos humanos y decrece la cuenta viable de bacterias intracelulares (Sivagnanam et al 2011). Para determinar la habilidad del anticuerpo α -Mce2A de bloquear la infección de *M. bovis* en macrófagos se realizó un ensayo de fagocitosis. Después de 4 horas posinfección con *M. bovis* AN5 de un cultivo de macrófagos bovinos que previamente a ser infectados fueron incubados con el anticuerpo α -Mce2A. Se observa una disminución de la fagocitosis cercana al 50 % en los macrófagos que contenían el anticuerpo α -Mce2A en comparación con los macrófagos sin el anticuerpo. Aún con esta diferencia en el promedio de los grupos, los resultados no muestran una diferencia estadística. Pero si nos puede sugerir que existe un el bloqueo de las invasinas Mce2 y que disminuye el número de bacterias que infectan a las macrófagos en el grupo tratado con el anticuerpo dirigido contra la invasina Mce2A. (Figura 8).

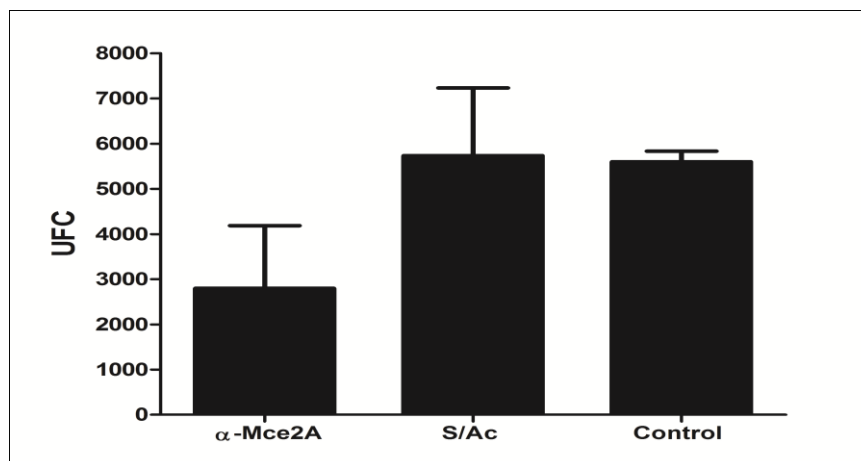


Figura 8.- Efecto del anticuerpo α -Mce2A sobre la fagocitosis de *M. bovis* AN5 por macrófagos bovinos. Cultivo de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de bovino con o sin tratamiento previo con el anticuerpo α -Mce2A 2 horas antes de la infección con *M. bovis* AN5 (MOI 1:1). Las barras representan la media y desviación estándar (triplicado) de las bacterias recuperadas dentro de los macrófagos 2 horas después de la infección.

6.10.- Ensayo para determinar la habilidad del anticuerpo policlonal α -Mce2A de inhibir la infección de *M. tuberculosis* en ratones BALB/c en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva

Una vez demostrado el efecto que tiene el anticuerpo policlonal elaborado en conejo dirigido contra la invasina Mce2A de *M. bovis* en el crecimiento de los bacilos y el bloqueo de la infección de macrófagos, se procedió a realizar un experimento de inhibición de la infección en ratones BALB/c. En este experimento se observa en el grupo de ratones, que no recibieron el anticuerpo antes y después de la infección, que el total de ellos murieron a los 28 días posinfección, en contraste los ratones que se les administró el anticuerpo α -Mce2A mostraron una sobrevivencia del 30 % al día 28 y del 20 % hasta el final del experimento. (Figura 9a). En relación a los bacilos recuperados del pulmón, el grupo al que se le administró el anticuerpo α -Mce2A, mantiene niveles ligeramente menores en comparación con el grupo que no se le administró α -Mce2A, pero no se observa diferencia de UFC en los primeros días de la cinética de la infección (día 1 a 14). En el día 21 se observa una diferencia significativa de las UFC recuperadas de pulmón entre los dos grupos, siendo menor en los ratones que recibieron el anticuerpo α -Mce2A, estos datos relacionan con la sobrevivencia mostrada en el día 28 posinfección. (Figura 9b). En concordancia con estos datos el porcentaje de área de pulmón afectada por neumonía es mayor en el grupo control que no recibió el anticuerpo α -Mce2A mostrando diferencia a partir del día 14 pos infección, en el día 28 todos los ratones habían muerto, por lo que no se pudo evaluar el daño pulmonar, en contraste el grupo que recibió el anticuerpo la neumonía disminuyó (Figura 9c).

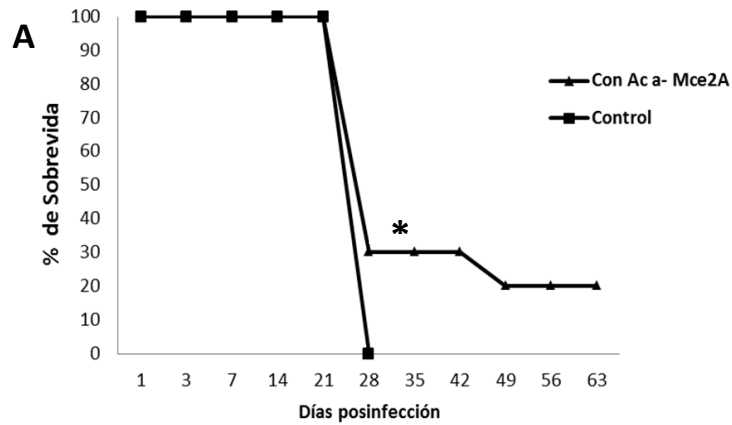


Figura 9a.- Sobrevida de ratones tratados por vía intratraqueal con el anticuerpo α -Mce2A, antes y después de la infección con la cepa hipervirulenta *M. tuberculosis* LAM 09005186. Ratones BALB/c se les administró por vía intratraqueal α -Mce2A antes y después de la infección, se registró la sobrevida y se comparó con el grupo control sin tratamiento.

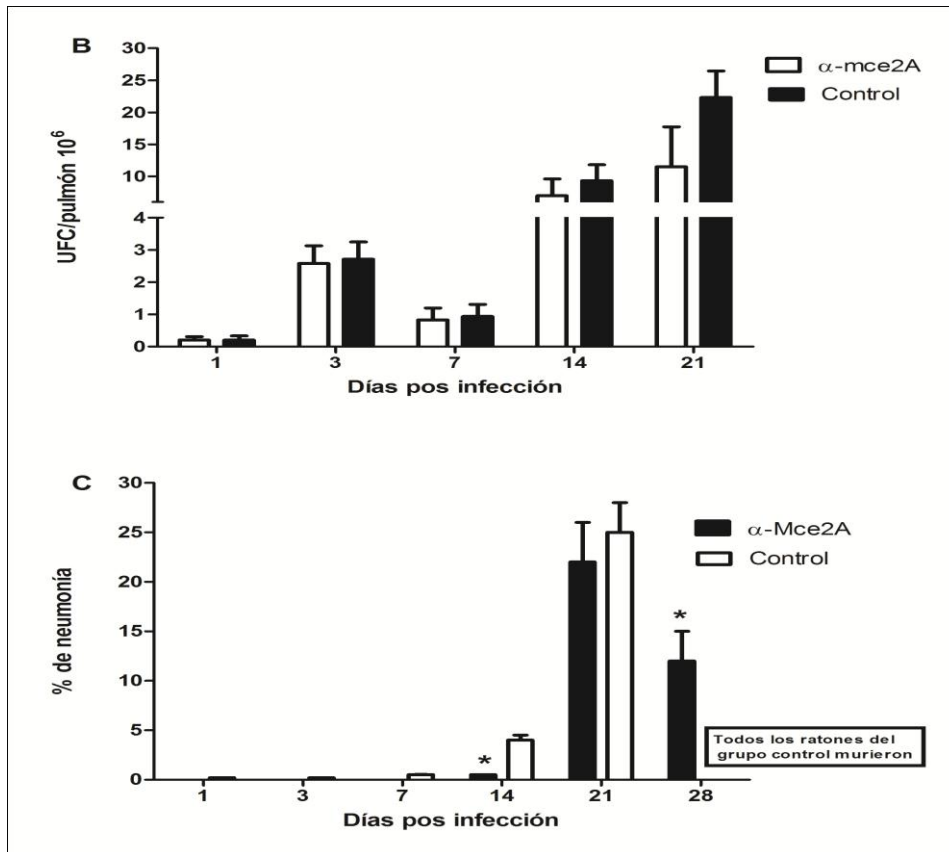


Figura 9.- Cargas bacilares e histometría en ratones con o sin tratamiento con el anticuerpo α -Mce2A antes y después del desafío intratraqueal con *M. tuberculosis* LAM 09005186. Ratones BALB/c fueron tratados con el anticuerpo α -Mce2A antes y después del desafío y se comparó con el grupo sin tratamiento. (B) Cargas bacilares en pulmones en los días indicados. (C) Porcentaje de neumonía determinada por morfometría automatizada. Asterisco representa significancia estadística ($P < 0.05$).

6.11.- Ensayo microbicida y expresión de genes selectos de macrófagos derivados de bovinos con fenotipo natural de Resistencia o Susceptibilidad a patógenos intracelulares e infectados con la cepa mutante de *M. bovis* $\Delta mce2A$ (atenuada) o con la cepa de *M. bovis* AN5 (virulenta).

El ensayo microbicida muestra que no existe una diferencia significativa en el porcentaje de fagocitosis entre la cepa mutante $\Delta mce2A$ (atenuada) y la cepa de *M. bovis* AN5 (virulenta), este porcentaje es de 61 % y 65 % respectivamente, sin embargo la capacidad de supervivencia de la cepa virulenta *M. bovis* AN5 (106 %) es significativamente mayor a la de la cepa atenuada *M. bovis* $\Delta mce2A$ (70 %) 24 horas después de la fagocitosis. (Figura 10).

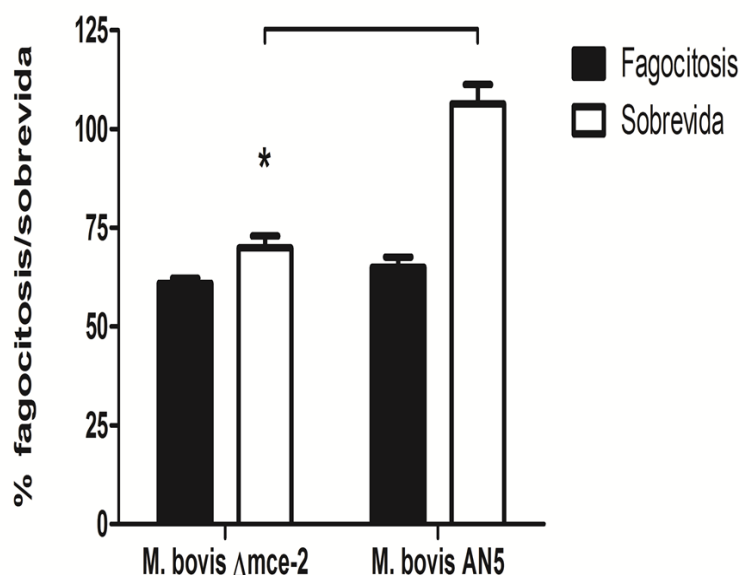


Figura 10.- Porcentaje de fagocitosis y supervivencia intracelular de *M. bovis* $\Delta mce2A$ y *M. bovis* AN5 en cultivo de macrófagos bovinos. Cultivo de 13 días de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de bovino, infectados con una MOI 2:1. Las barras representan la media y desviación estándar (triplicado) del porcentaje de bacterias fagocitadas 4 horas después de la infección y las bacterias recuperadas dentro de los macrófagos 24 horas después de la infección.

6.12.- Las cepas de *M. bovis* $\Delta mce2A$ y *M. bovis* AN5 promueven la transcripción de genes de receptores de superficie de macrófagos bovinos

Los resultados de la expresión de genes de receptores contra patrones moleculares asociados a patógenos de la superficie de los macrófagos, se determinaron en macrófagos de bovino con fondo genético de Resistencia o Susceptibilidad a patógenos intracelulares

mediante PCR Tiempo Real y se expresaron como un incremento en el número de veces en comparación con la expresión en macrófagos sin infectar. Se determinó la concentración de RNAm para el Receptor de Manosa (MMR), el Receptor Scavenger (MSR), el Receptor Tipo Toll-2 (TLR-2) y el Receptor Tipo Toll-4 (TLR-4). Todos los receptores están sobre expresados en los macrófagos de los 2 fenotipos cuando estos están en contacto con cualquiera de las 2 cepas de *M. bovis* utilizadas.

El MMR se incrementó en macrófagos de bovinos resistentes 95 y 68 veces más con $\Delta mce2$ o AN5, respectivamente, mientras que en los macrófagos de bovinos susceptibles la expresión se incrementó 130 y 50 veces con $\Delta mce2A$ y AN5 respectivamente. Se observa que la mutante $\Delta mce2A$ induce en una mayor expresión de este receptor. (Figura 11a).

El MSR se ve sobre expresado significativamente en los macrófagos de bovinos susceptibles que fueron infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ y muestra diferencia significativa con los otros grupos. (Figura 11b).

TLR-2 aumenta su expresión sin mostrar diferencia entre grupos, observándose un incremento de 113 y 58 veces más en células susceptibles con $\Delta mce2A$ y células resistentes con AN5, respectivamente. (Figura 11c).

TLR-4 tiene un incremento de 79 veces en los macrófagos de los bovinos susceptibles que fueron infectados con *M. bovis* $\Delta mce2A$ y muestra una diferencia significativa con el incremento en la expresión de este receptor en los macrófagos resistentes infectados con $\Delta mce2A$ y macrófagos susceptibles con AN5 que fue de 19 y 10 veces, respectivamente. (Figura 11d).

En todos los casos, los macrófagos de bovino genéticamente susceptible y que fueron infectados con la cepa mutante de *M. bovis* $\Delta mce2A$ muestran el mayor incremento de expresión de receptores de superficie.

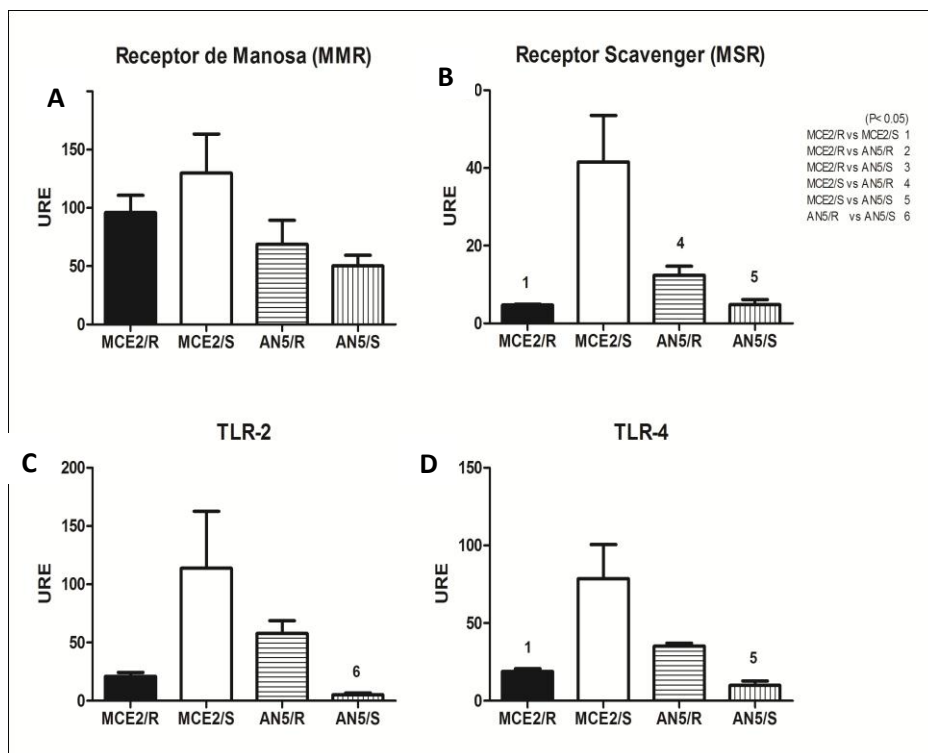


Figura 11.- Expresión de genes de receptores de superficie de macrófagos bovinos (resistencia o susceptibilidad) infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ o *M. bovis* AN5. Cultivos primarios de macrófagos bovinos derivados de monocitos de sangre periférica, con fenotipo de resistencia o susceptibilidad contra parásitos intracelulares, infectados con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia. Los números indican diferencia estadística significativa entre los grupos indicados (P < 0.05).

6.13.- Las enzimas óxido nítrico sintasa inducible y arginasa II aumentan su expresión en macrófagos de bovinos susceptibles infectados con *M. bovis* $\Delta mce2A$

Un indicador de la activación de los macrófagos es la producción de óxido nítrico por medio de la enzima iNOS y el sustrato L-arginina. En macrófagos con fenotipo de susceptible se observa un incremento con una diferencia significativa en la expresión de los genes de arginasa II e iNOS, cuando estos son infectados con la cepa atenuada *M. bovis* $\Delta mce2A$, lo cual podría llevar a una competencia por el mismo sustrato. De manera interesante los macrófagos con fenotipo resistente muestran niveles bajos de expresión de la enzima iNOS cuando son estimulados con las cepas atenuada y virulenta de *M. bovis*. (Figura 12).

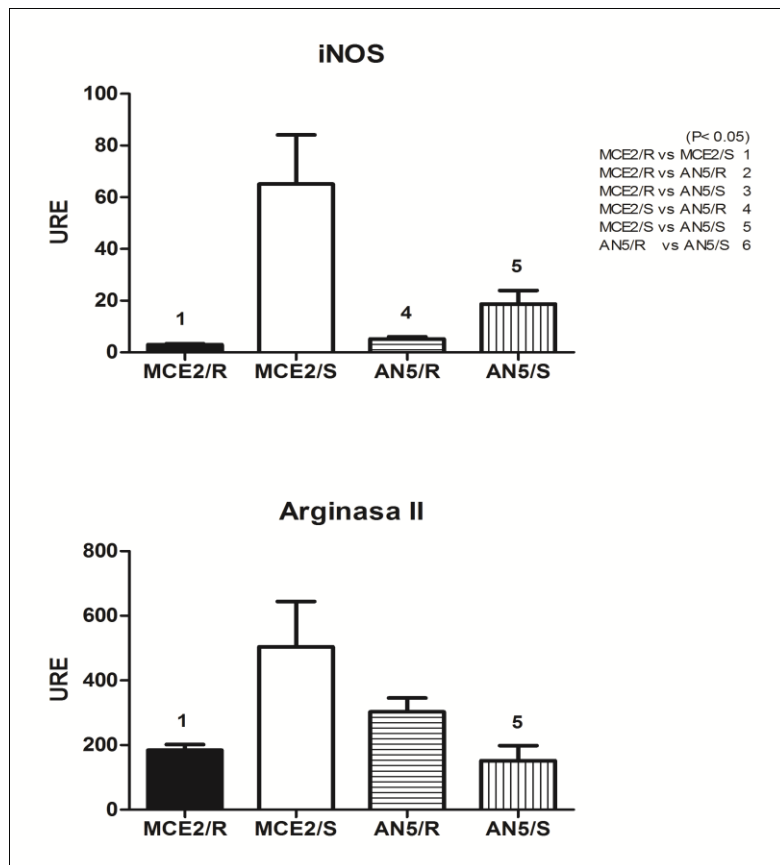


Figura 12.-Expresión de genes INOS y Arginasa II de macrófagos bovinos (resistencia o susceptibilidad) infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ o *M. bovis* AN5. Cultivos primarios de macrófagos bovinos derivados de monocitos de sangre periférica, con fenotipo de resistencia o susceptibilidad contra parásitos intracelulares, infectados con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia. Los números indican diferencia estadística significativa entre los grupos indicados (P < 0.05).

6.14.- Los macrófagos con fenotipo de susceptibilidad infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2$ inducen una mayor expresión de IL-10

Los macrófagos de los diferentes grupos no muestran diferencia significativa en el incremento de IL-6, sin embargo la expresión del gen de IL-10 es mayor y estadísticamente significativo en el grupo de macrófagos de bovinos susceptibles infectados con la cepa atenuada $\Delta mce2A$ en comparación con los demás grupos. (Figura 13).

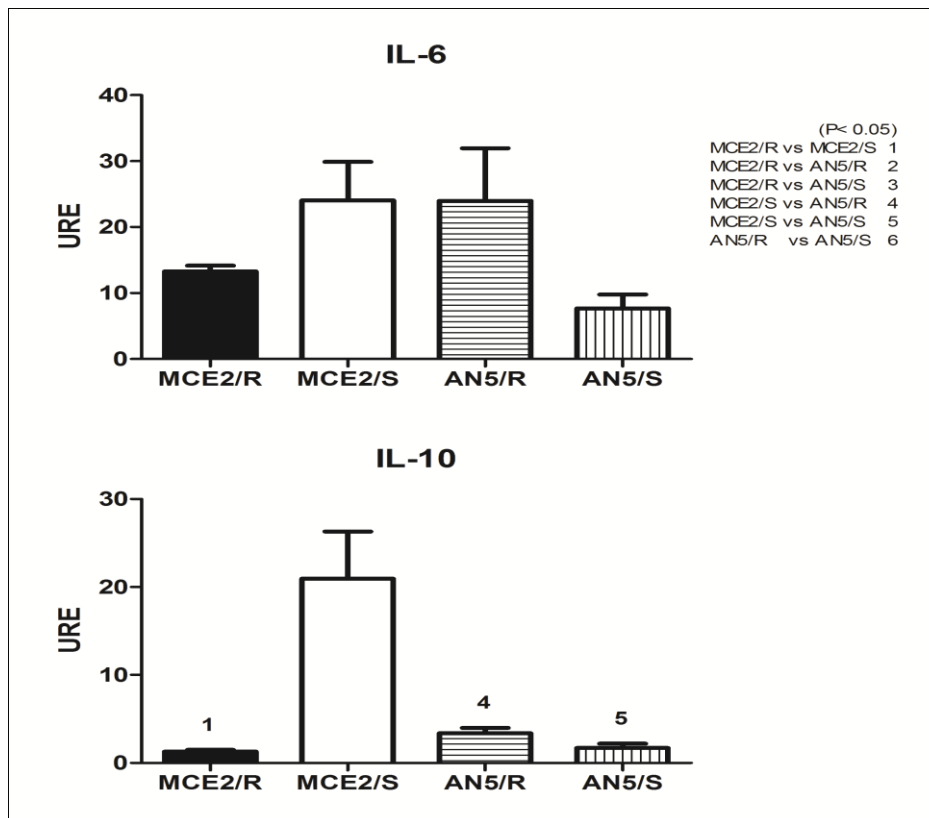


Figura 13.- Expresión de genes IL-6 y IL-10 de macrófagos bovinos (resistencia o susceptibilidad) infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ o *M. bovis* AN5. Cultivos primarios de macrófagos bovinos derivados de monocitos de sangre periférica, con fenotipo de resistencia o susceptibilidad contra parásitos intracelulares, infectados con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia. Los números indican diferencia estadística significativa entre los grupos indicados (P < 0.05).

6.15.- *M. bovis* $\Delta mce2$ induce sobre expresión de interleucinas y citocinas pro-inflamatorias en macrófagos de bovinos susceptibles particularmente IL-1 β

Las interleucinas pro inflamatorias se sobre expresan en los macrófagos: resistente y susceptible por efecto de las cepas de *M. bovis*, siendo mayor en IL-1 β del fenotipo de Susceptibilidad. El gen de IL-1 β aumenta su expresión casi 2000 veces en macrófagos de bovinos susceptibles infectados con *M. bovis* $\Delta mce2A$, mostrando una diferencia significativa con macrófagos resistentes con $\Delta mce2A$ (187 veces) o AN5 (617 veces) y macrófagos susceptibles con AN5 (Figura 14a). IL-12 muestra una diferencia significativa en su sobre expresión en los macrófagos de fenotipo susceptible (1.4 veces más) en comparación con los de fenotipo resistente (0.06 veces) cuando se infectan con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ (Figura 14b). Para IL-18 el mayor incremento lo presenta el fenotipo resistente infectado con *M. bovis* AN5 mostrando una diferencia significativa con el fenotipo susceptible infectado con la misma cepa con un aumento de 26 y 4 veces más respectivamente.(Figura 14c).

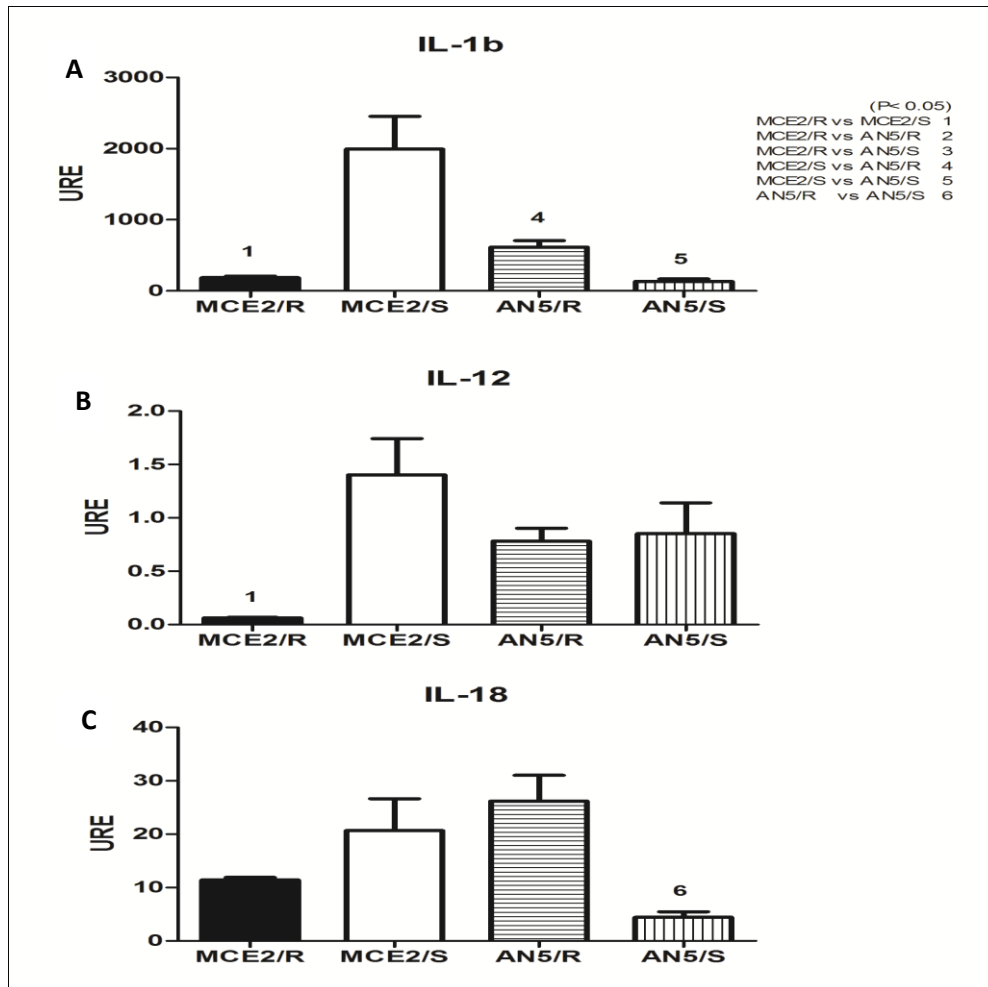


Figura 14.- Expresión de genes IL-1b, IL-12 y IL-18 de macrófagos bovinos (resistencia o susceptibilidad) infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ o *M. bovis* AN5. Cultivos primarios de macrófagos bovinos derivados de monocitos de sangre periférica, con fenotipo de resistencia o susceptibilidad contra parásitos intracelulares, infectados con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia. Los números indican diferencia estadística significativa entre los grupos indicados (P < 0.05).

De manera interesante TNF- α y TGF- β aumentan su nivel de expresión en el fenotipo de susceptibilidad infectado con la mutante $\Delta mce2A$, 112 y 111 veces, respectivamente y el fenotipo resistente infectado con AN5, 38 y 98 veces, respectivamente. Y de manera inversa, fenotipo resistente con $\Delta mce2A$ y susceptible con AN5 los niveles de expresión fueron menores. (Figura 15a y 15b).

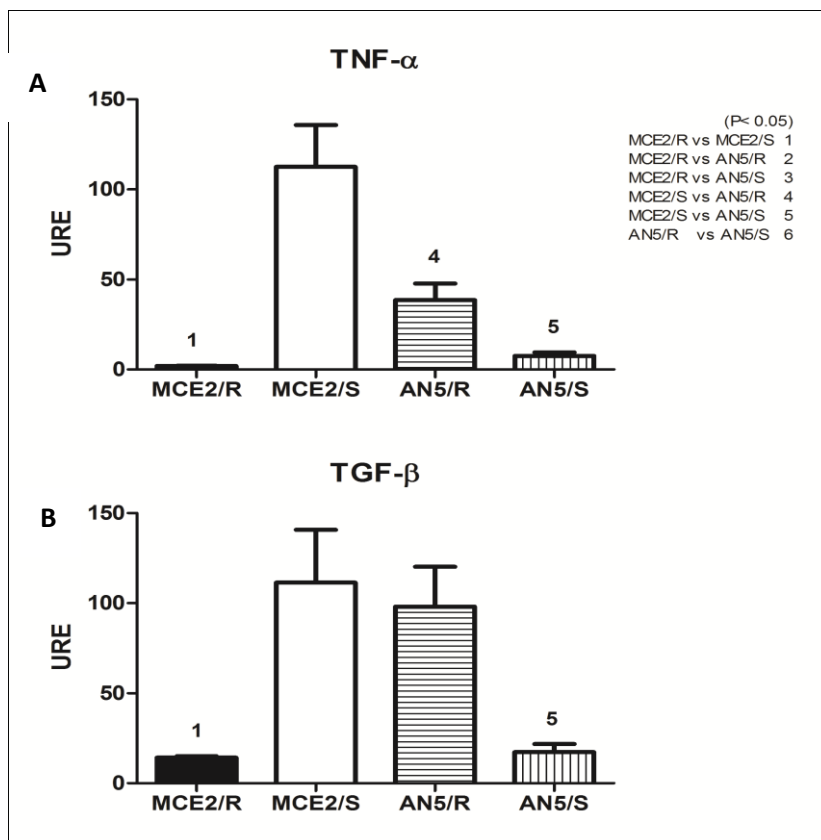


Figura 15.- Expresión de genes TNF- α y TGF- β de macrófagos bovinos (resistencia o susceptibilidad) infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ o *M. bovis* AN5. Cultivos primarios de macrófagos bovinos derivados de monocitos de sangre periférica, con fenotipo de resistencia o susceptibilidad contra parásitos intracelulares, infectados con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia. Los números indican diferencia estadística significativa entre los grupos indicados (P < 0.05).

6.16.- Los macrófagos de bovinos con fenotipo de susceptibilidad expresan menos MCP-1 en comparación con el fenotipo de resistencia y mayor expresión de MCP-2 y MIP-1 cuando son infectados con la cepa atenuada de *M. bovis* $\Delta mce2A$.

Las quimiocinas con efecto pro inflamatorio se ven expresadas en los dos fenotipos de bovinos, siendo más evidente la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1) que esta sobre expresada más de 10000 y 5000 veces en los macrófagos de bovinos con fenotipo de susceptibilidad que fueron infectados con la cepa de *M. bovis* $\Delta mce2A$ y AN5, respectivamente. Los macrófagos con fenotipo de resistencia e infectados con la cepa virulenta AN5 presenta sobreexpresión de este gen, pero en menor proporción y con una diferencia significativa. Para la proteína quimiotáctica de macrófagos-1 (MCP-1) el fenotipo susceptible expresa menos este gen, en comparación con el resistente y se observa diferencia significativa cuando estos están infectados con la cepa de *M. bovis* AN5. Por último, la proteína quimiotáctica de macrófagos-2 (MCP-2), también se encuentra sobre expresada en todos los casos, siendo mayor en los macrófagos de bovinos susceptibles infectados con la cepa $\Delta mce2A$. (Figura 16).

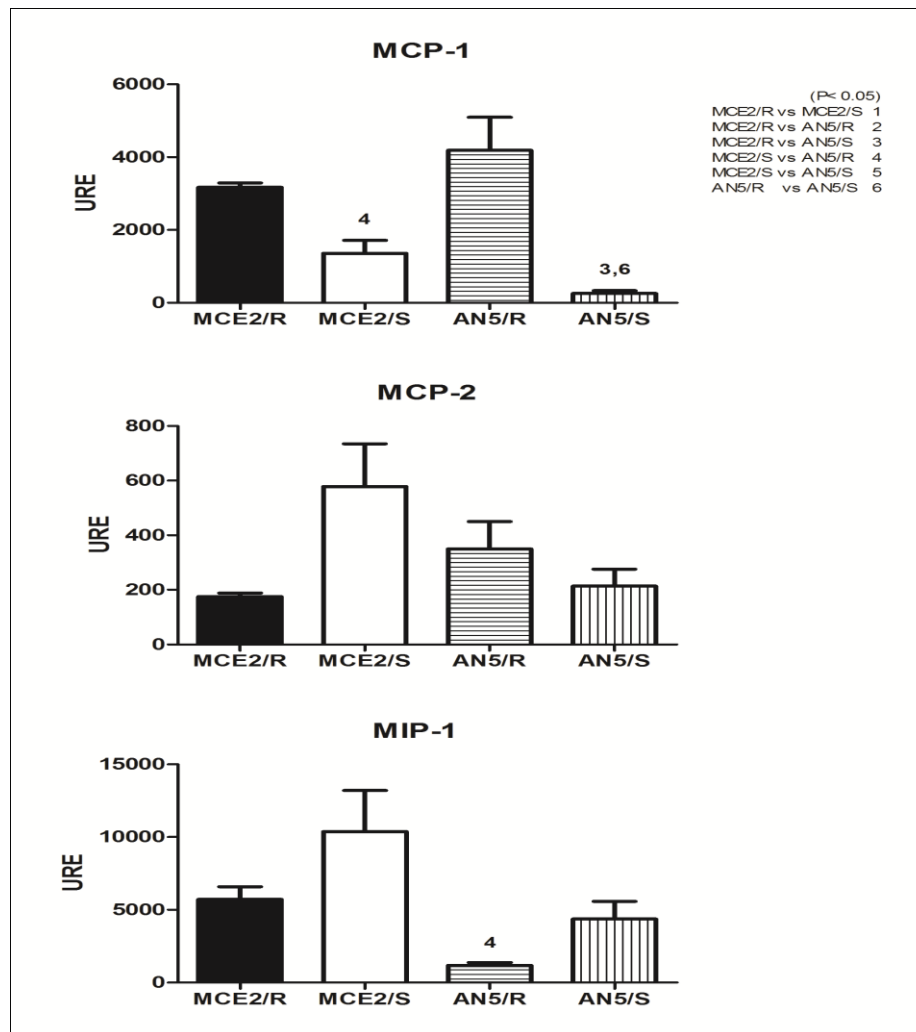


Figura 16.- Expresión de genes de Quimiocinas MCP-1, MCP-2 y MIP-1 de macrófagos bovinos (resistencia o susceptibilidad) infectados con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2A$ o *M. bovis* AN5. Cultivos primarios de macrófagos bovinos derivados de monocitos de sangre periférica, con fenotipo de resistencia o susceptibilidad contra parásitos intracelulares, infectados con cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia. Los números indican diferencia estadística significativa entre los grupos indicados (P < 0.05).

6.17.- Evaluación de la cepa mutante $\Delta mce2A$ de *M. bovis* como candidato a ser utilizado como vacuna contra la tuberculosis en un modelo murino.

6.18.- Atenuación de la virulencia en ratones inmunocomprometidos (desnudos)

Para determinar el nivel de atenuación de la virulencia de la cepa mutante en comparación con su cepa parental y con BCG, se utilizaron grupos de ratones desnudos (nude) que fueron infectados por ruta intratraqueal con una dosis alta (2.5×10^5 bacilos vivos) o por vía subcutáneamente con la dosis de vacunación (1×10^3) de la cepa de mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$, *M. bovis* UK o BCG. La dosis utilizada para la infección intratraqueal induce una tuberculosis pulmonar progresiva en el modelo murino, con esta dosis la mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ mostró estar más atenuada en comparación con su cepa parental *M. bovis* UK, en

la semana 5 se observó una sobrevida de 100 % y 0 % respectivamente, y ligeramente más atenuada que BCG (Figura 17a). Utilizando la dosis de vacunación por vía subcutánea la mutante $\Delta mce2A$ mostró estar más atenuada que su cepa parental y el mismo grado de atenuación que BCG (Figura 17b).

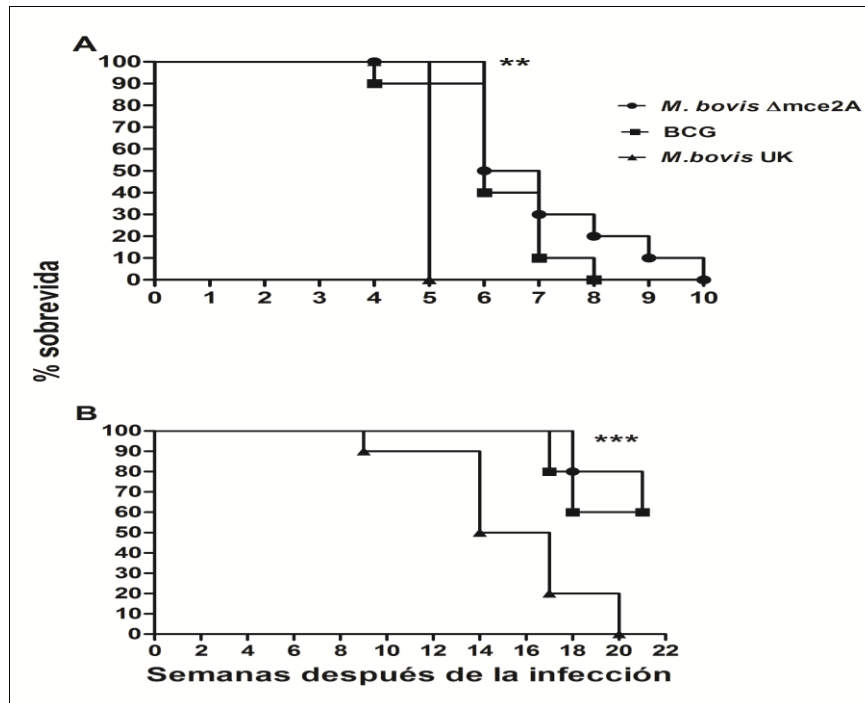


Figura 17.- Sobrevida de ratones desnudos después de la inoculación intratraqueal o subcutánea de la mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ o su cepa parental. (A) Ratones desnudos fueron inoculados por vía intratraqueal con una dosis alta (2.5×10^5 bacilos vivos) de *M. bovis* BCG, $\Delta mce2A$ o UK y se registró su sobrevida. (B) Ratones desnudos fueron inoculados por vía subcutánea con la dosis de vacunación, para la cepa mutante $\Delta mce2A$ y *M. bovis* UK (5000 bacilos vivos) o BCG (8000 bacilos vivos), se registró su sobrevida. El asterisco representa significancia estadística ($p < 0,05$).

6.19.- Comparación de la patología pulmonar y la carga bacilar en ratones BALB/c infectados por ruta intratraqueal con la mutante de *M. bovis* $\Delta mce2A$ ó su cepa parental

Como un indicador de atenuación, ratones BALB/c fueron infectados por ruta intratraqueal con una dosis alta de la cepa de *M. bovis* UK o su mutante $\Delta mce2A$ (2.5×10^5 bacilos vivos). Esta dosis induce tuberculosis pulmonar progresiva. Los animales infectados con cualquiera de las cepas, la mutante *mce2* o su parental, muestran similar carga bacilar durante la primera semana de infección. Después, una menor cantidad de bacterias fue determinada en los animales infectados con la cepa mutante, siendo significativa al día 60 con dos veces la carga de bacilos en los pulmones de los ratones infectados con la cepa parental. Estos resultados correlacionan con los daños en el tejido pulmonar, el cual es menor en ratones infectados con la cepa mutante (Figura 18).

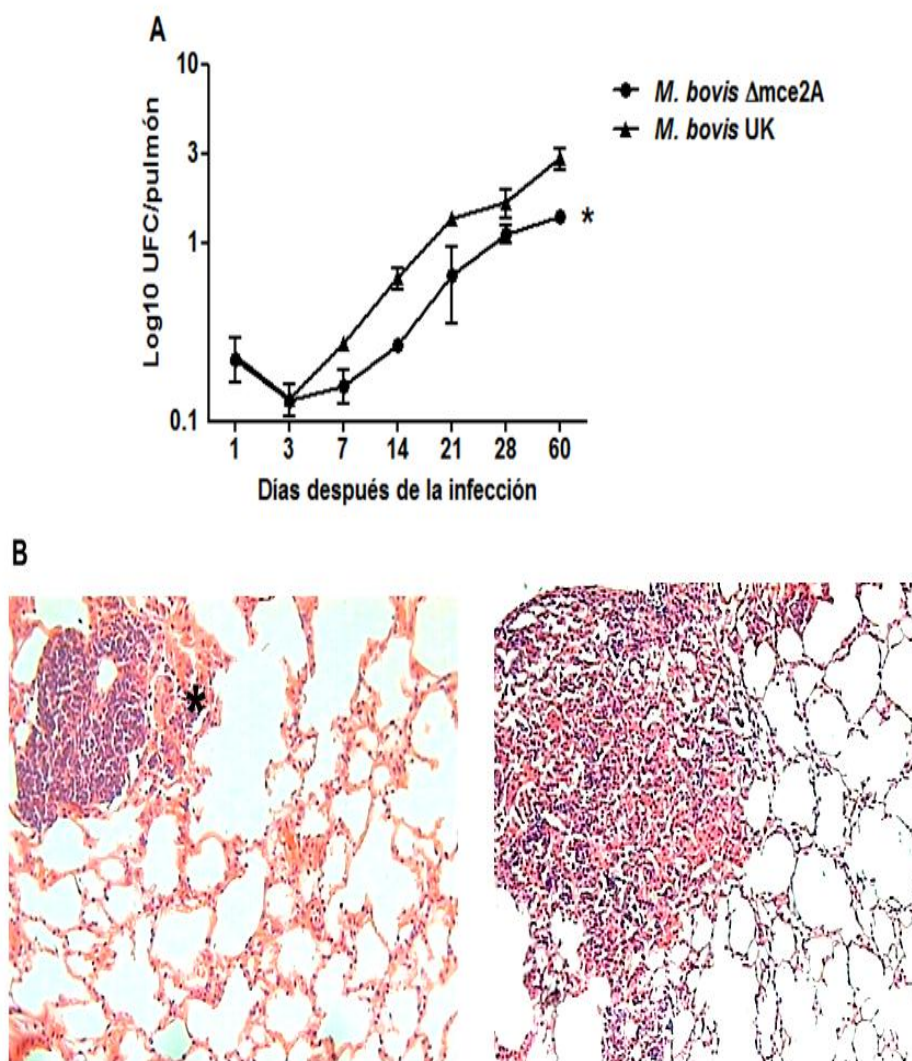


Figura 18.- Cargas bacilares e histopatología representativa en los pulmones de ratones BALB/c después de la inoculación intratraqueal de una alta dosis de la mutante *M. bovis* Δ mce2A o su cepa parental. (A) Los ratones fueron sacrificados en el día indicado después de la infección y sus pulmones se utilizaron para determinar las unidades formadoras de colonias. Los animales infectados con la cepa mutante mostraron menor carga de bacilos. El asterisco representa significancia estadística ($p < 0,05$). (B) La figura de la izquierda muestra un área más pequeña de neumonía (asterisco) en un ratón infectado después de 60 días con la cepa mutante, en comparación con el pulmón de ratón infectado con la cepa parental en el mismo punto de tiempo (derecha). (Tinción HE, 200X)

6.20.- Comparación de la diseminación e inmunogenicidad en ratones vacunados con la cepa mutante *M. bovis* Δ mce2A o BCG

Como indicador del nivel de atenuación se determinó la diseminación de los bacilos después de la vacunación, cuantificando la carga bacteriana en diferentes órganos. Se presentan solo los resultados obtenidos con las dosis seleccionadas para la vacunación:

5000 bacterias vivas para la mutante $\Delta mce2A$ y 8000 para BCG. Dos semanas después de la vacunación ambas cepas muestran similar carga bacteriana en el sitio de inoculación (tejido subcutáneo de la base de la cola), con una tendencia similar de disminución progresiva hasta el día 60. En los pulmones al día 15, los ratones vacunados con BCG muestran una mayor carga de bacilos pero no significativa en comparación con los ratones vacunados con la cepa mutante. El bazo de los ratones vacunados con BCG tiene una significativa carga bacteriana mayor en comparación con el mismo órgano de ratones vacunados con la cepa mutante $\Delta mce2A$, mientras que los linfonodos cercanos al sitio de inoculación de los animales vacunados con $\Delta mce2A$ muestran una mayor y significativa carga bacteriana a los días 15 y 30 pos vacunación (Figura 19).

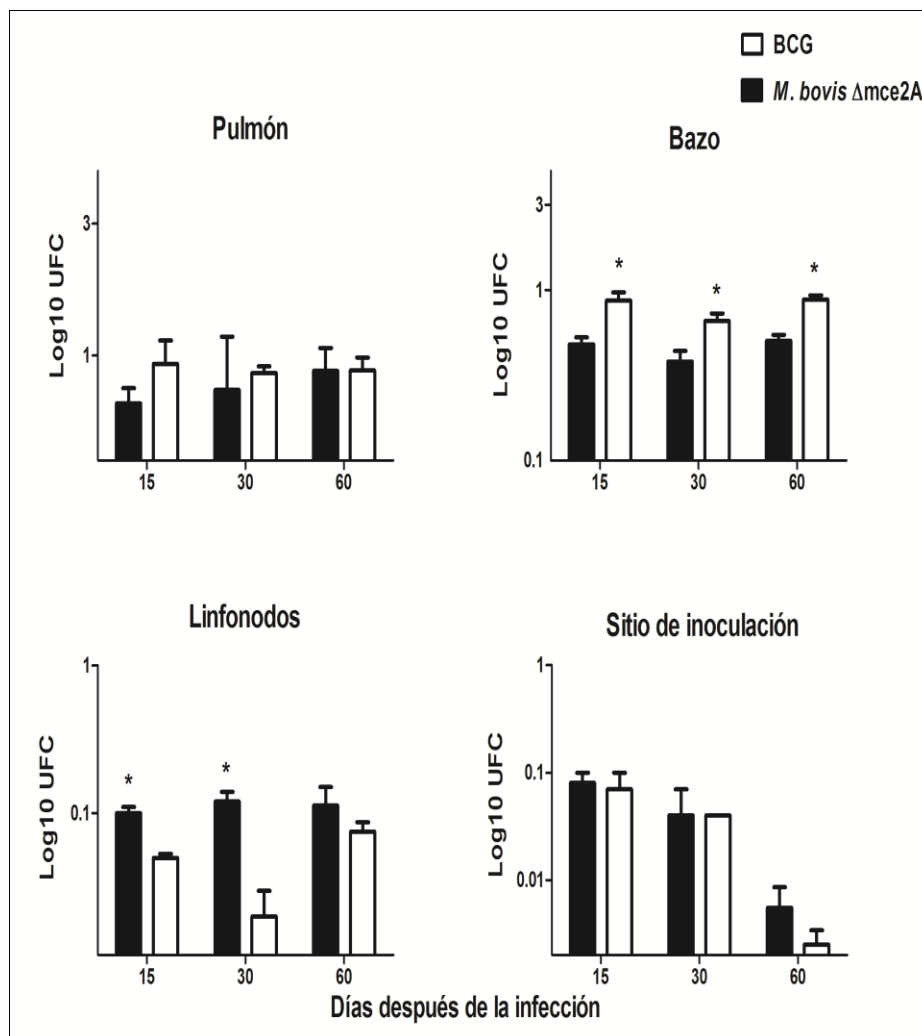


Figura 19.- Cargas bacilares en diferentes tejidos colectados de ratones BALB/c vacunados antes del desafío. En los puntos de tiempo indicados después de la vacunación con BCG (barras blancas) o la mutante $\Delta mce2A$ (barras negras) y antes de la exposición, los animales se sacrificaron y los órganos indicados se retiraron inmediatamente, se homogeneizó y se sembraron para la cuantificación de UFC. Las barras representan las medias y las desviaciones estándar para cuatro animales diferentes en cada punto de tiempo en dos experimentos separados. Los asteriscos representan una significancia estadística (P < 0,05).

Para comparar la eficiencia de la activación de la inmunidad celular inducida por la vacunación de la mutante de *M. bovis* $\Delta mce2A$ y BCG antes del desafío, suspensiones celulares de pulmón, bazo, y linfonódulos inguinales, fueron estimulados con antígenos micobacterianos a diferentes días después de la vacunación y la concentración de IFN γ en los sobrenadantes fue cuantificada por ELISA. La figura 20 muestra que ambas cepas inducen similar producción de IFN γ , solo en la suspensión de células de bazo al día 30 y en pulmón y linfonódulos al día 60 de los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ producen una mayor y significativa cantidad de IFN γ en comparación con BCG. Se utilizó la dosis de 8000 bacilos de BCG porque en estudios previos esta dosis indujo una mayor producción de IFN γ siguiendo el mismo protocolo (Castillo Rodal et al, 2006). Debido a que BCG carece de el gen de ESAT-6, los animales vacunados con BCG secretan insignificantes cantidades de IFN γ después de ser estimulados con ESAT-6, mientras que los vacunados con la mutante de *M. bovis* $\Delta mce2A$ inducen una alta producción de IFN γ después de la estimulación con el mismo antígeno. Por lo tanto, después de vacunar con una dosis más baja, la mutante $\Delta mce2A$ es más eficiente en la inducción de la producción de IFN γ en comparación con BCG en bazo al día 30 y pulmón y linfonódulos regionales al día 60 pos vacunación.

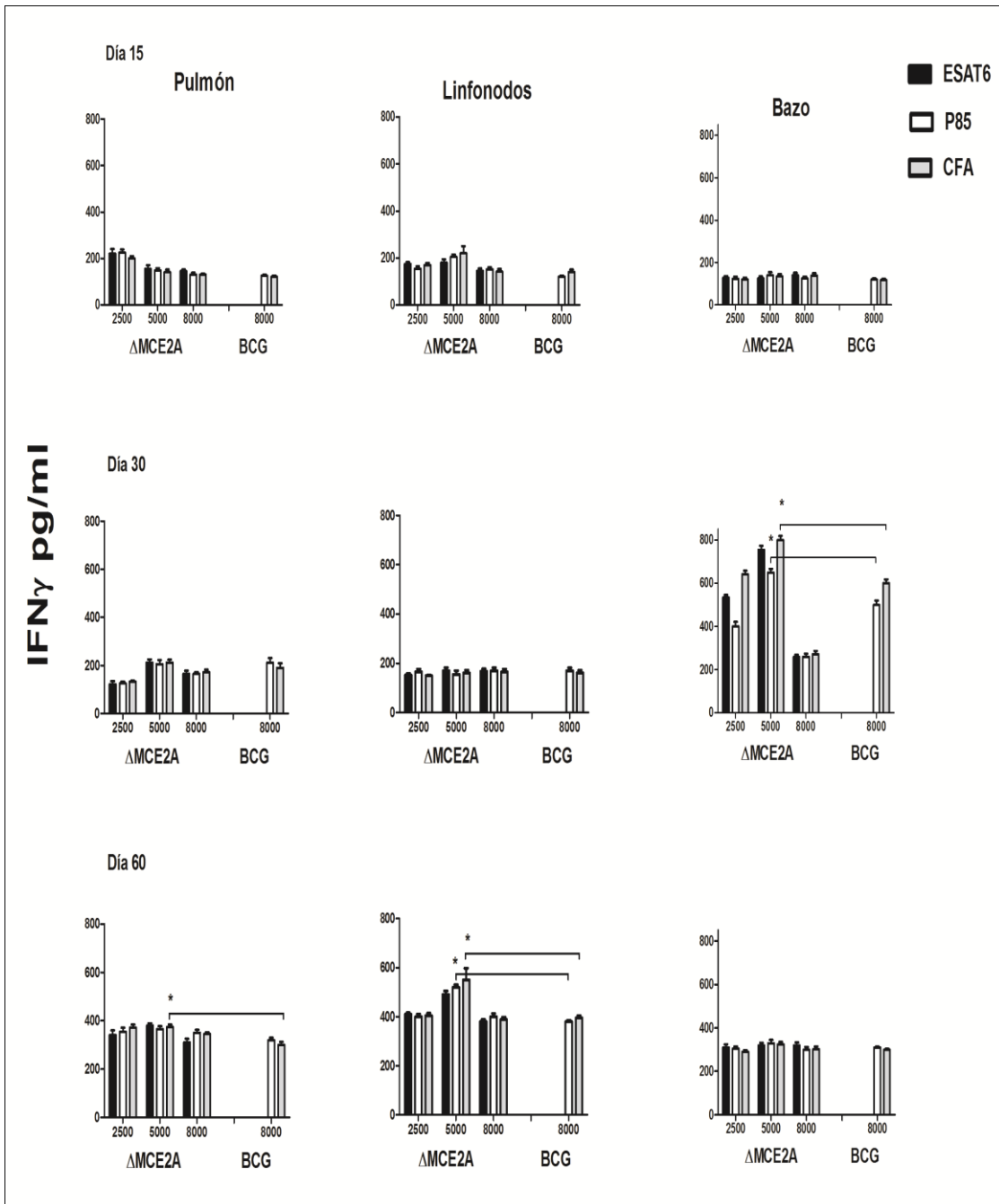


Figura 20.- Producción de IFN- γ por suspensiones de células de diferentes órganos estimuladas con diferentes antígenos de micobacterias después de la vacunación y antes de la exposición. Los ratones fueron vacunados con diferentes dosis (2500, 5000, 8000 bacilos vivos) de la mutante $\Delta mce2A$ o BCG (8000 bacilos), después de 15, 30 y 60 días los órganos indicados se utilizaron para obtener suspensiones de células que fueron estimuladas con los antígenos de filtrado (CFA) o los antígenos inmunodominantes ESAT-6 o Ag85, el IFN se cuantificó por ELISA en los sobrenadantes. Las barras representan las medias y desviaciones estándar de cuatro animales diferentes en cada punto de tiempo. Los asteriscos representan una significancia estadística ($P < 0,05$) en comparación con el grupo de vacunados con BCG.

6.21.- Comparación de la protección contra diferentes cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en ratones BALB/c vacunados con la mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$ o BCG

Puesto que se ha demostrado que el nivel de virulencia de las cepas utilizadas para un desafío es un factor significativo que determina el nivel de protección, los animales vacunados fueron desafiados con diversas cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* que han mostrado diferentes grados de virulencia en el modelo de ratones Balb/c (Lopez, et al 2003, 1998, Aguilar, et al 2009, Marquina-Castillo, et al 2009).

Se realizaron dos experimentos separados utilizando 20 ratones para cada uno de los 5 grupos experimentales, usando una dosis de vacunación de 5000 bacterias de *M. bovis* $\Delta mce2A$ y 8000 para BCG subcepa Phips, estas fueron las dosis que indujeron la mayor producción de IFN γ . Al día 60 pos vacunación todos los ratones fueron desafiados intratraquealmente con 2.5×10^5 UFC de *M. tuberculosis* H37RV (grupo 1), *M. tuberculosis* 09995186 cepa hipervirulenta (grupo 2), cepas hipervirulentas de *M. bovis* AN5 (grupo 3), *M. bovis* 302 (grupo 4) y *M. bovis* 534 cepa de baja virulencia (grupo 5). Al día 60 pos desafío 10 ratones fueron sacrificados. Los niveles de protección fueron determinados por las curvas de sobrevida, cuantificación de UFC de pulmones y la extensión del tejido pulmonar dañado, evaluando el porcentaje del área afectada por neumonía.

Después de 4 meses pos desafío con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, todos los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ sobrevivieron, mientras que los ratones vacunados con BCG y los controles no vacunados mostraron 90 % y 70% de sobrevida respectivamente. Los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ mostraron una sobrevida significativa comparado con el grupo control no vacunado, mientras que BCG no se observa (Figura 21).

Los ratones vacunados con BCG y retados con la cepa hipervirulenta de *M. tuberculosis* mostraron una sobrevida total, mientras que el 90 % de los vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ y 50 % de los controles no vacunados sobrevivieron al final del experimento (Figura 21). Estos resultados correlacionan con la carga bacilar de los pulmones y la histopatología, mostrando una cantidad de UFC significativamente más baja y menor neumonía en los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ o BCG que los animales controles no vacunados (Figura 21).

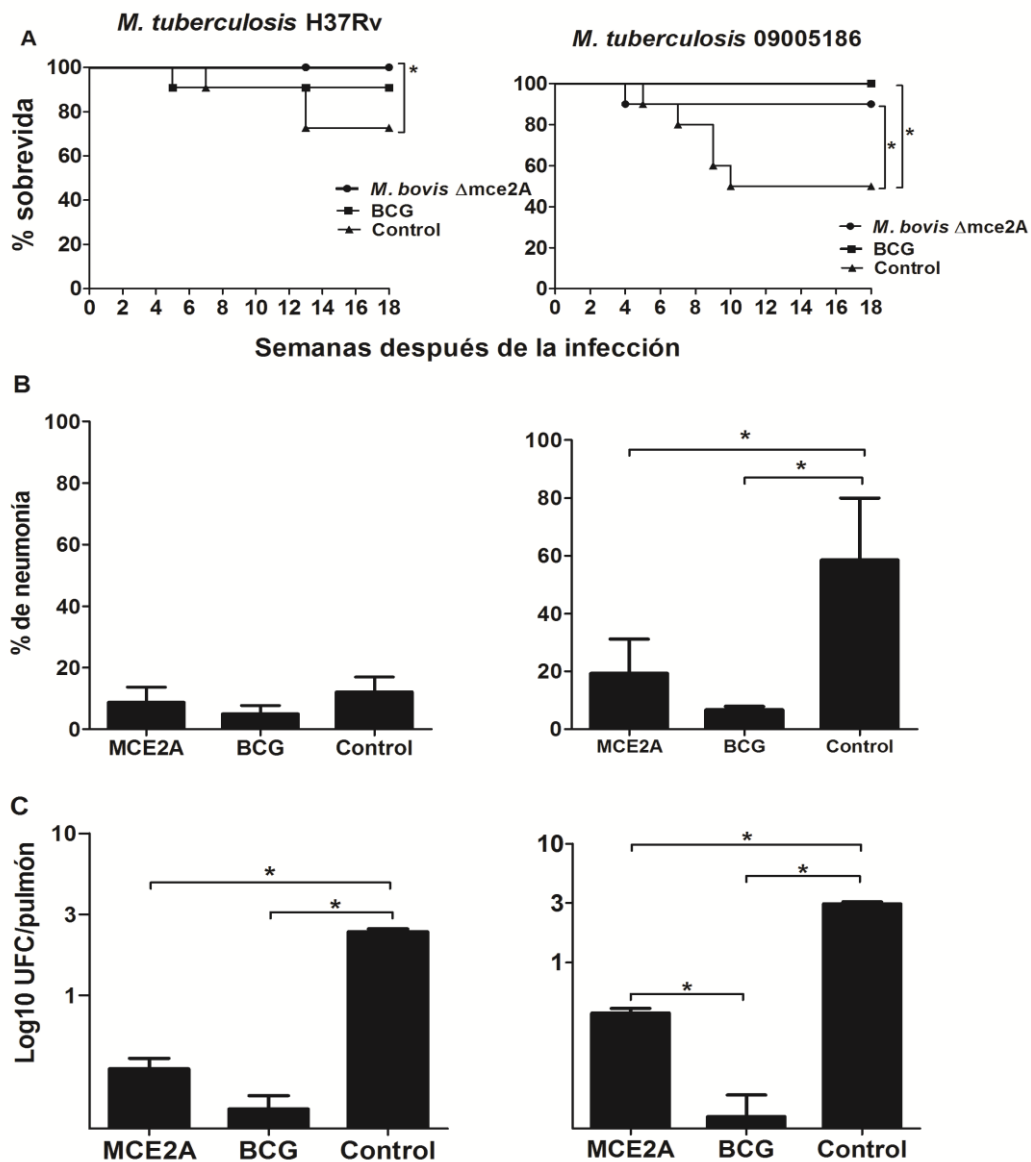


Figura 21.- Supervivencia, histomorfometría y cargas bacilares en pulmón después del desafío intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv o *M. tuberculosis* cepa 09005186 hipervirulenta. Ratones BALB/c se vacunaron con la mutante $\Delta mce2A$ o BCG y se compararon con los animales control no vacunados. (A) Supervivencia de ratones BALB/c (20 ratones por cepa). (B) Porcentaje de la superficie del pulmón afectado por la neumonía determinado por morfometría automatizada y (C) carga bacilar pulmonar, determinaciones después de 60 días de desafío. Los asteriscos representan una significancia estadística ($P < 0,05$).

En cuanto a los animales vacunados y desafiados con cepas de *M. bovis*, todos los ratones del grupo control no vacunados e infectados con *M. bovis* AN5 murieron después de 5 semanas. En contraste, los ratones vacunados con $\Delta mce2A$ y BCG empezaron a morir después de 5 semanas pos infección y todos ellos habían muerto hasta la semana 14 y 16, respectivamente. De manera interesante, los animales vacunados mostraban una extensa neumonía similar a la observada en los ratones control no vacunados, pero con un

significante número menor de UFC en los pulmones de los animales vacunados, siendo menor en los ratones vacunados con BCG (Figura 22 y 23). Por lo tanto, la vacunación con una cepa atenuada de *M. bovis* y el desafío con cepas de *M. bovis* de alta o media virulencia inducen un buen control del crecimiento bacteriano pero una excesiva respuesta inflamatoria.

Los animales control no vacunados infectados con el aislado clínico de *M. bovis* 302 comenzaron a morir después de 4 semanas del desafío intratraqueal y después de 7 semanas el 80 % de ellos había muerto (Figura 22). En contraste, después de la cuarta semana del desafío, los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ y BCG mostraron un significativo 100 % y 90 % de sobrevida respectivamente (figura 22). Estos resultados de sobrevida estuvieron en concordancia con las determinaciones de UFC en pulmones. Los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2$ y BCG mostraron una significativa cantidad menor de UFC en comparación con los ratones control no vacunados al día 60 después del desafío intratraqueal. En contraste con estos datos, los animales vacunados y no vacunados muestran un alto porcentaje del área del pulmón afectada por neumonía al día 60 después del desafío (Figura 23).

Considerando que los animales vacunados con una cepa atenuada de *M. bovis* y desafiados con *M. bovis* induce una buena protección en términos de sobrevida y control del crecimiento del microorganismo pero con excesiva inflamación, otro grupo de animales fue vacunado y desafiado con una cepa atenuada de *M. bovis*. Todos los animales vacunados y no vacunados retados con *M. bovis* 534 sobrevivieron, mostrando bajas cargas bacterianas en pulmón y limitada consolidación pulmonar después de 4 meses de infección (Figura 22). Por lo tanto, cuando la infección es con una cepa de *M. bovis* atenuada, los ratones vacunados con BCG o con la cepa mutante de *M. bovis* $\Delta mce2A$ controlan eficientemente el crecimiento bacteriano sin una respuesta inflamatoria excesiva.

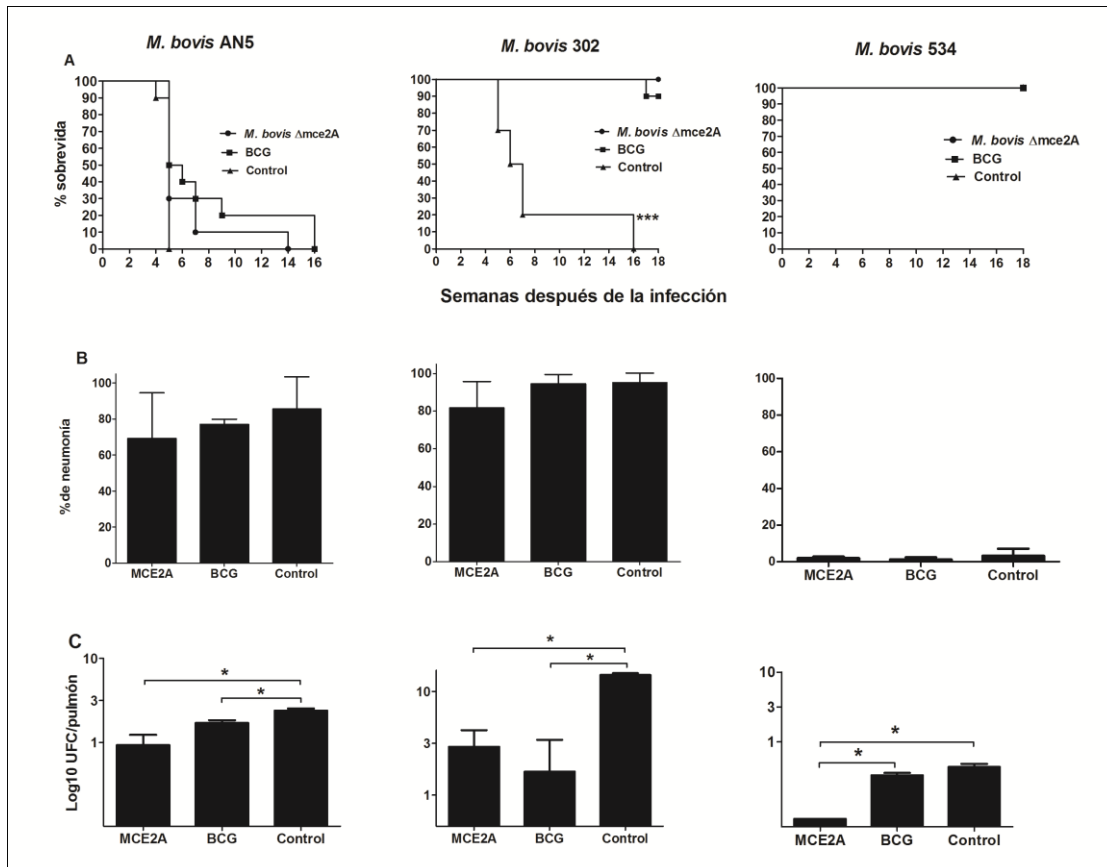


Figura 22.- Supervivencia, histomorfometría y cargas bacilares pulmonares después del desafío intratraqueal con *M. bovis*. (A) cepas AN5 y 302 (cepas hipervirulentas) y 534 (baja virulencia) se usaron para desafiar a ratones BALB/c vacunados con la mutante $\Delta mce2A$, BCG o animales no vacunados (control), su supervivencia se registró durante cuatro meses (20 ratones por cepa). (B) Porcentaje de la superficie del pulmón afectada por neumonía determinado por morfometría automatizada. (C) Cargas bacilares de pulmón, ambas determinaciones se realizaron después de 60 días después del desafío. Los asteriscos representan una significancia estadística ($P < 0,05$).

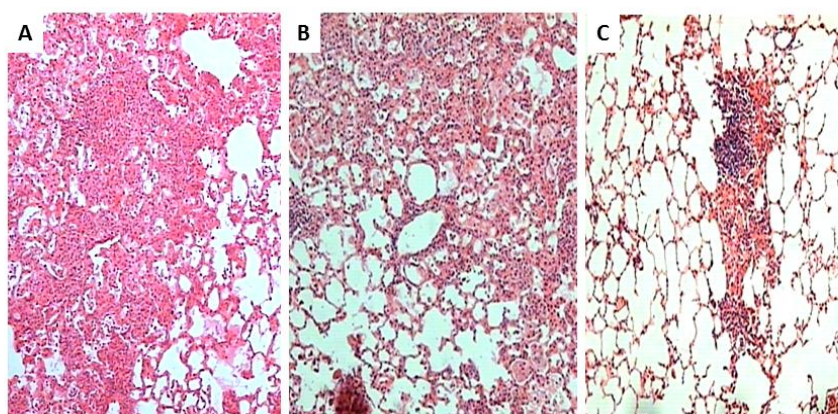


Figura 23.- Histopatología de pulmón en ratones no vacunados y vacunados a los 60 días después del desafío con cepas de *M. tuberculosis* o *M. bovis*. A) Extensas áreas de espacios alveolares ocupadas por células inflamatorias que corresponden a neumonía en los animales no vacunados e infectados por vía intratraqueal con *M. bovis* AN5. B) La consolidación pulmonar extensa también se observa en los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ y desafiados con *M. bovis* AN5. C) En contraste, el tamaño promedio de neumonía en los ratones vacunados con la mutante $\Delta mce2A$ y desafiados con *M. tuberculosis* H37Rv. (100x, tinción con hematoxilina/eosina).

Para determinar y comparar a largo plazo la protección por la vacunación, otro grupo de ratones fue vacunado con la mutante $\Delta mce2A$ o BCG y 6 meses después fue desafiado con *M. bovis* AN5. Todos los ratones controles no vacunados murieron después de 11 semanas, mientras que los ratones vacunados con BCG y la mutante $\Delta mce2A$ sobrevivieron 50% y 40% respectivamente, con baja y similar carga bacteriana en los pulmones, pero con una alta respuesta inflamatoria similar exhibiendo similar consolidación presentada en los animales control no vacunados a los 60 días pos infección (Figura 24).

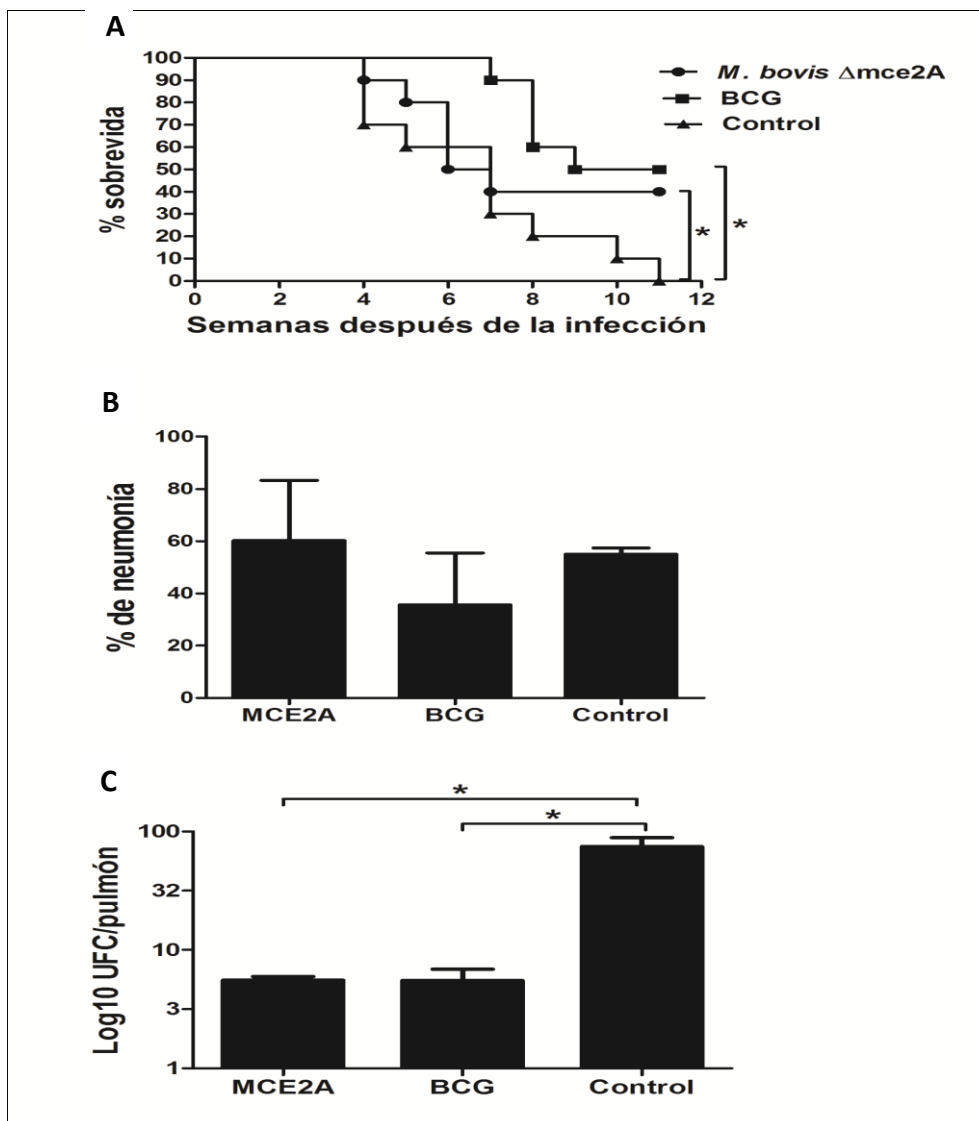


Figura 24.- Supervivencia, histomorfometría y cargas bacilares de pulmón posteriores a la vacunación a largo plazo. La cepa *M. bovis* AN5 se utilizó para desafiar ratones a los seis meses después de la vacunación con BCG o la mutante $\Delta mce2A$. (A) Supervivencia comparada con animales control no vacunados (20 ratones por cepa). (B) Porcentaje de la superficie del pulmón afectado por la neumonía, determinado por morfometría automatizada y carga bacilar pulmonar (C), ambas determinaciones después de 60 días del desafío. Los asteriscos representan una significancia estadística ($P < 0,05$).

7.- DISCUSIÓN

La entrada y supervivencia de bacterias del complejo *M. tuberculosis* en macrófagos de diferentes especies de mamíferos como el humano o el bovino, es el elemento central de la patogénesis de la tuberculosis. La presencia de operones homólogos en el genoma de estas micobacterias que codifican para proteínas Mce consideradas invasinas y que están localizadas en la superficie de las bacterias sugiere que estas proteínas juegan un importante papel en las interacciones del patógeno-hospedador (Arruda et al 1993, Shimono et al 2003). Aunque es generalmente aceptado que el macrófago alveolar es la principal célula que entra en contacto con *M.tuberculosis*, este microorganismo tiene la habilidad de penetrar a una variedad de células tanto *in vitro* como *in vivo* que no son consideradas fagocitos profesionales, recientemente se reportó la presencia de DNA de *M. tuberculosis* en diferentes sitios extrapulmonares durante infección latente esto puede constituir sitios de reservorios de micobacterias que pueden reactivar la infección sin involucrar lesiones pulmonares (Chitale, et al 2001, Barrios-Payan, et al 2012), no es claro si esta habilidad de *M. tuberculosis* tiene una significancia fisiológica o patológica, pero sugiere que la patogenicidad de las micobacterias está relacionada con la habilidad de entrar a células de mamífero. Existen diversos reportes donde se menciona la importancia de los operones *mce* en *M. tuberculosis*, estos genes se están expresando de manera constante durante las diversas fases del crecimiento microbiano y se ha demostrado la presencia de proteínas Mce en pacientes infectados con *M. tuberculosis*, por medio de la detección de anticuerpos específicos (Ahmad et al 2004), también se ha indagado sobre la participación de operones *mce* en la patogenicidad de *M. tuberculosis* y su posible uso como inmunógenos. En este estudio se aporta valiosa información sobre el operón *mce2* de *M. bovis* y específicamente sobre el gen *mce2A* que codifica para la invasina Mce2A. Se reporta la detección y cuantificación de los transcritos de RNAm para *mce2A* por qPCR durante el crecimiento microbiano de *M. bovis* en medios de cultivo, durante un proceso de infección de macrófagos bovinos *in vitro* y en tejido pulmonar de ratones infectados con una cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Además se determina su localización y nivel de expresión de la invasina Mce2A por medio de inmunomicroscopía en tejidos infectados. Se revisa la posibilidad de generar nuevos candidatos para ser utilizados como inmunógenos contra la tuberculosis, esto es, utilizando anticuerpos contra la invasina Mce2A de *M. bovis* para bloquear la infección o evaluando una cepa mutante de *M. bovis* con el gen *mce2A* deletado, para determinar su capacidad de inducir protección al ser utilizada como vacuna contra cepas virulentas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

En este estudio se demostró la transcripción del gen *mce2A* de *M. bovis* cuando la bacteria está en crecimiento en medios de cultivo. De igual forma se cuantificó la expresión del gen *mce2A* a nivel de RNAm por qPCR con el uso de iniciadores específicos, observándose que este gen se expresa desde el inicio de la curva de crecimiento, pero esta expresión es mayor al final de la fase de crecimiento exponencial y durante la fase de meseta. La expresión de algunos genes de los operones *mce* han sido demostrados previamente por PCR y análisis de microarreglos, donde se indica la expresión de estos durante el

crecimiento (Haile et al 2002, Kumar et al 2003, Ahmad et al 2004), posiblemente, durante el crecimiento de *M. tuberculosis* en un medio de cultivo artificial el microorganismo carece de ciertos estímulos o señales ambientales que regulan la expresión genética y al no requerir la presencia de sus invasinas Mce, estas se ven modificadas en su expresión. Kumar (2003) reporta la expresión de los operones *mce* de *M. tuberculosis* en diferentes fases del crecimiento y encuentra que el operon *mce1* está fuertemente expresado en la fase exponencial, pero no *mce2*, *mce3* ni *mce4* y en la fase estacionaria solo fue detectada la expresión de *mce4*. El presente estudio, demuestra la expresión del gen *mce2A* del operon *mce2* de *M. bovis* desde el inicio de la curva de crecimiento, teniendo su mayor nivel de expresión en la fase estacionaria del cultivo. Recientemente se describió que los genes del operón *mce2* en una cepa silvestre de *M. tuberculosis* incrementan progresivamente su expresión de la fase logarítmica a la estacionaria en un cultivo in vitro y esto está relacionado al movimiento de lípidos a través de la pared, se observó que las cepas mutantes en el operon *mce2* acumulan cantidades importantes de sulfolípidos en pared comparadas con la cepa silvestre, por lo que proporcionalmente al incremento de la expresión de los genes del operon *mce2* se disminuye la proporción de lípidos en pared (Marjanovic, et al 2011). En este estudio también se muestra el nivel de expresión del gen *mce2A* a las 24, 48 y 72 horas pos infección, en un modelo de macrófagos murinos que fueron infectados con *M. bovis*. El gen de la invasina Mce2A es transcrito desde el día 1 pos infección, y su expresión incrementa en los días posteriores, siendo esta significativa en comparación con el día inicial, pero no entre los días 2 y 3 pos infección. La expresión de los genes del operon *mce2* provoca cambios en los contenidos de sulfolípidos (SL-1 y SL1278) en la pared (Marjanovic, et al 2011), estos cambios durante el curso de una infección natural puede servir como una importante estrategia adaptativa de *M. tuberculosis* y *M. bovis* para mantenerse y persistir en el hospedador. Se ha reportado la ausencia de expresión de genes de los operones *mce* tanto in vitro como in vivo y esto se puede deber a los diferentes microambientes y condiciones en que se encuentra creciendo el microorganismo. Giofree (2005) reporta la no expresión del operon *mce3* de *M. tuberculosis* en un crecimiento in vitro, mientras que Ahmad (2005) menciona lo contrario, encontrando RNAm del gen *mce3* en los cultivos. De igual forma Kumar (2003) no observa la expresión del operon *mce2* ni en cultivos bacterianos ni en tejido de animales infectados. En el presente trabajo se encontró la expresión del gen *mce2A* tanto en cultivo, como en micobacterias infectando macrófagos en un cultivo celular. Además reportamos, la presencia de la invasina Mce2A de *M. bovis* y *M. tuberculosis* y su nivel de expresión dentro de los macrófagos por medio de inmunomicroscopía en tejido de animales infectados con estos microorganismos.

En el modelo murino de enfermedad progresiva, la cuantificación de transcritos de ARNm del gen *mce2A* se observa desde el primer día de la infección y esto pone de manifiesto la importancia de esta invasina en las primeras etapas del proceso infeccioso y que además se mantiene a todo lo largo de la enfermedad progresiva, siendo más evidente al día 28, que particularmente en este modelo, es donde termina la fase protectora, caracterizada por una baja cuenta bacilar y comienza la fase progresiva o no protectora, que es donde aumenta el número de bacterias en el pulmón (Hernández-Pando, et al 1996).

Algunos estudios han demostrado que los anticuerpos presentes en los sueros de paciente con tuberculosis reconocen proteínas Mce, un 93 % de ellos reconocen proteínas codificadas en el operon *mce3* (Ahmad et al 2004). Los datos mostrados en la literatura y los que aquí se presentan indican que estas proteínas son expresadas durante el crecimiento in vivo en especies del complejo *M. tuberculosis* y que estas son altamente inmunogénicas, evocando respuesta de anticuerpos en la mayoría de los pacientes con TB y aún más, también son reconocidas por suero de los convivientes y de personas sanas. Las proteínas codificadas en los operones *mce* son homologas con un porcentaje de similitud entre ellas, aunque todas ellas se originan probablemente de una proteína ancestral, por lo que el reconocimiento por los anticuerpos de los pacientes con TB puede ser específica a una proteína en particular o a reacciones cruzadas con anticuerpos dirigidos a otras proteínas codificadas en los operones *mce* (Ahmad et al 1999; Harboe et al 2002). La purificación y producción de recombinantes de la invasina Mce2A, en este trabajo, mostró ser de utilidad para la identificación posmortem en tejidos de individuos infectados con cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, además de otras especies del genero *Mycobacterium* como *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, debido a los porcentajes de homología que presentan estas proteínas, recordando que algunas de estas especies carecen de forma natural de ciertos operones, como el *mce3* en *M. bovis* (Zumarraga et al 1999, Kumar et al 2003, Kumar et al 2005).

Este estudio describe la clonación y expresión del gen *mce2A* de *M. bovis* expresado en *E. coli* como una proteína con tallo de Histidina en el extremo C-terminal, esta proteína fue purificada por cromatografía de afinidad y utilizada para la elaboración de antisuero policlonal en conejo contra la invasina Mce2A. La clonación y expresión de genes de los operones *mce* de *M. tuberculosis*, así como también la elaboración de antisueros contra proteínas Mce son descritas en la bibliografía (Ahmad et al 1999; Ahmad et al 2004). El antisuero α -Mce2A producido en este estudio, fue utilizado para la detección de la invasina Me2A por inmunomicroscopia, realizando una evaluación de su localización y cuantificación cualitativa en cortes de tejido pulmonar de ratones infectados en una cinética de enfermedad progresiva. Por inmunohistoquímica se realizó una evaluación de la presencia de esta invasina, principalmente dentro de los macrófagos alveolares en diferentes días pos infección, demostrando que esta invasina se está expresando en las micobacterias desde el día 1 de la infección y se observa al microorganismo dentro de los macrófagos a lo largo de los 60 días del experimento, siendo más evidente en el primer día de la infección, lo cual sugiere que es necesaria para el ingreso al interior de las células. Para los días 3, 7 y 14 esta invasina está presente, pero en menor proporción, estos datos concuerdan con lo descrito en el modelo murino y corresponden a la fase protectora, donde existe un control del microorganismo y una baja cuenta bacilar (Hernández-Pando, et al 1996). Para el día 21 y 28 pos infección el marcaje que se detecta por inmunohistoquímica de la invasina Mce2A es más intenso y se encuentra en mayor proporción, lo que indica un mayor número de micobacterias dentro de los macrófagos, esto demuestra que en la fase progresiva o no protectora de la enfermedad se incrementa el número de bacterias (Hernández-Pando, et al 1996). Los datos anteriores, de la presencia de la invasina Mce2A en los tejidos infectados, apoyan los resultados obtenidos por qPCR de la expresión y

cuantificación del gen *mce2A* en el modelo murino de enfermedad progresiva, además de lo reportado por otros autores donde se menciona la expresión de genes de los operones *mce* de *M. tuberculosis* en pacientes con infección natural (Ahmad et al 1999; Harboe et al 2002).

En la detección de la invasina Mce2A, por medio de inmunomicroscopía electrónica, en tejido pulmonar de ratones infectados con *M. tuberculosis* se logran observar a los bacilos dentro de los macrófagos con un marcaje intenso en la periferia de las bacterias, esto corresponde al anticuerpo unido a la invasina Mce2A presente en su pared. Estos datos corroboran la información de que esta invasina Mce2A es una proteína presente en la pared del microorganismo y ampliamente distribuida alrededor de esta (Arruda et al 1993, Shimono et al 2003). También se observa detección de esta proteína en el citoplasma y dentro del núcleo del macrófago, se puede inferir que este marcaje corresponde a restos de la pared de las micobacterias donde está presente la invasina Mce2A. Además, esta proteína tiene la capacidad de internalizarse a través de membranas y es posible visualizarla en el núcleo de los macrófagos, lo anterior también fue descrito por Casali, et al (2002) donde demuestran la capacidad invasiva de un péptido de Mce1 presentado en la superficie de *E. coli*. También se ha reportado que la proteína recombinante Mce1A de *M. tuberculosis* fusionada a esferas de látex tienen la capacidad de penetrar al interior de las células (Chitale, et al 2001).

En el presente estudio se revisó el efecto que tiene el anticuerpo policlonal α -Mce2A sobre el crecimiento de las micobacterias y se observó que el número de UFC puede disminuir o incrementarse por la presencia del anticuerpo y que esto puede depender de las diferentes diluciones utilizadas en un cultivo bacteriano. En general el número de bacterias se mantiene constante y sin diferencias significativas cuando se aplica el anticuerpo α -Mce2A a diferentes diluciones en el medio de cultivo, sin embargo, una dilución de 1:800 puede incrementar de manera significativa la cuenta de los microorganismos, por el contrario, la dilución de 1:400 disminuye significativamente las UFC en comparación con el grupo control sin anticuerpos. Se sugiere que la presencia de los anticuerpos puede tener un efecto a favor o en contra del crecimiento bacteriano. Se ha reportado que el suero hiperinmune tiene un efecto bactericida contra BCG y que la eficacia de la lisis mediada por anticuerpos en *M. tuberculosis* está relacionada con el título que presenta el suero, también se observó que el suero de diferentes pacientes con TB puede mostrar diferentes efectos sobre el crecimiento de los microorganismos (Glatman-Freedman and Casadevall 1998).

Los anticuerpos contra la invasina Mce2A son capaces de bloquear la infección por micobacterias patógenas en macrófagos en un cultivo celular, en la revisión presentada por Glatman-Freedman y Casadevall (1998) se presentan diversos estudios donde se muestra el efecto que tienen los anticuerpos en el bloqueo de la infección por *M. tuberculosis*.

Los anticuerpos dirigidos contra moléculas de la superficie bacteriana que están asociadas a invasión de células del huésped pueden disminuir el número de bacilos que ingresan a la célula o coadyuvar en la generación de una respuesta que elimine a la bacteria. Esto es, bloqueando mecanismos de invasión o unión a estas adhesinas, la opsonización del

microorganismo puede favorecer el reconocimiento de los patógenos y un procesamiento y eliminación más eficaz de los mismos. Se sabe que dependiendo de los receptores o mecanismos que utilice la micobacteria para ingresar al macrófago va a generar una respuesta en donde el bacilo va o no a sobrevivir en su interior. El macrófago responde de acuerdo a la interacción Receptor-*Mycobacterium*, si la interacción es con el receptor FC el macrófago incrementa la producción de intermediarios de oxígeno y permite la fusión del fagosoma con los lisosomas, por el contrario si la interacción es con el receptor CR3 se previene el estallido respiratorio y bloquea la maduración del fagosoma y por lo tanto la unión de los lisosomas (Hernández-Pando, et al 2007).

Una vez evaluado el anticuerpo α -Mce2A y demostrado su efecto microbicida y su capacidad de bloquear la infección de macrófagos expuestos a *M. bovis*, se utilizó como propedéutico y terapéutico en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, en el cual se observó que el anticuerpo dirigido contra la invasina Mce2A es capaz de mantener una sobrevida significativa en los ratones que fueron tratados con el α -Mce2A antes y una semana después de la infección con una cepa altamente virulenta de *M. tuberculosis*, en comparación con el grupo sin tratamiento. Además de mostrar una diferencia significativa en la UFC recuperadas de pulmón. El uso del anticuerpo α -Mce2A no fue capaz de bloquear la infección de los ratones, pero si mantener una sobrevida de al menos 30 % en los animales que recibieron el tratamiento, una disminución de las UFC recuperadas del pulmón y una disminución en el grado de lesión pulmonar, estadísticamente significativa entre los dos grupos. Lo cual demuestra un posible uso tanto propedéutico como terapéutico contra la tuberculosis. Estudios que apoyan su uso con estos fines se presentan en la revisión presentada por Glatman-Freedman y Casadevall (1998) y Roy, et al (2005). Estos estudios demuestran que los anticuerpos dirigidos a epitopes asociados a la superficie de la bacteria son capaces de bloquear la infección y mediar un efecto benéfico en supervivencia en animales infectados con micobacterias patógenas así como disminuir el grado de lesión y número de microorganismos en los pulmones.

7.1.- Expresión de genes selectos de macrófagos derivados de bovinos con fenotipo natural de Resistencia o Susceptibilidad a patógenos intracelulares e infectados con la cepa mutante *M. bovis* Δ mce2A (atenuada) o con la cepa de *M. bovis* AN5 (virulenta)

Los bovinos al igual que los humanos presentan de manera similar una amplia gama de respuestas a la infección por bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Si la infección inicial no es contenida por el animal, esto puede dar lugar a la enfermedad pulmonar progresiva. En el ganado tuberculoso, un espectro de respuestas inmunes se puede desarrollar, pero no se sabe cuál de las respuestas están claramente asociadas con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Una comparación de las respuestas inmunes inducidas por cepas virulentas y atenuadas contribuiría a una mejor comprensión

de la patogénesis de la tuberculosis y podría ser de gran ayuda el desarrollo racional y prueba de nuevas vacunas. También es interesante conocer la respuesta a estas cepas asociada con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad a parásitos intracelulares que presente el hospedador.

Los genes de virulencia se definen generalmente como genes que son necesarios para la supervivencia del patógeno en un huésped y están involucrados en la patogenicidad, pero no son necesarios para el crecimiento en medio de cultivo (Dubnau, et al 2002). Varios genes de virulencia de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se han identificado mediante la comparación de la patogenicidad de cepas con mutaciones en los genes a probar con cepas que transportan los alelos de tipo salvaje. En este trabajo se utilizó la cepa de *M. bovis* $\Delta mce2A$, la cual tiene deletado el gen que codifica para la invasina Mce2A, esta mutación en *M. tuberculosis*, provocó la atenuación de esta cepa en modelos murinos y en cultivo de células (Gioffre, et al 2005, Marjanovic, et al 2010) y se comparó con la cepa de *M. bovis* AN5 que tiene el gen *mce2A* y que ha comprobado ser virulenta en ratón y en cultivo celular (Aguilar, et al 2009). Estas cepas se utilizaron para la infección de macrófagos bovinos derivados de monocitos de sangre periférica. Estos macrófagos provienen de bovinos previamente clasificados como resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares (Gutierrez-Pabello y Adams, 2003, Vallecillo 2003), y se comparó la respuesta inmune medida por la cuantificación de la expresión de algunos genes selectos relacionados a inmunidad.

El macrófago es la célula principal con respecto a la infección por *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Los macrófagos alveolares han demostrado que desempeñan un papel esencial en la eliminación de los microorganismos que entran a través de la vía respiratoria, y desde hace mucho tiempo se ha considerado la primera población celular para interactuar con el bacilo de la tuberculosis, más macrófagos son reclutados del torrente sanguíneo y están a cargo del mantenimiento de la infección en el huésped (Chitale, et al 2001, Hernández-Pando, et al 2007).

Después de la inhalación de aerosoles con bacilos, estos son absorbidos por el macrófago alveolar, dentro, las micobacterias sobreviven al detener la maduración del fagosoma y evitar la fusión con los lisosomas. La vacuola con micobacterias se caracteriza por una acidificación incompleta debido a la limitada acumulación de las ATPasas vacuolares y la falta de adquisición la Rab7 GTPasa lisosómica e hidrolasas lisosomales maduras (Russell, 2001). A pesar de la detención de la maduración del fagosoma, este implica un nicho hostil. Además, este entorno es cambiante, porque la activación de los macrófagos anula la detención de la maduración del fagosoma y presenta un medio cada vez más inhóspito para los bacilos. En la interacción *Mycobacterium*-Macrófago, los receptores juegan un papel importante, una vez interiorizados, las micobacterias se exponen a defensas antimicrobianas tales como intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), productos intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI), y ácidos grasos libres. La inducción de genes implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos y de isocitrato liasa durante las infecciones persistentes, sugieren que los fagosomas imponen limitaciones nutricionales que forzan un cambio metabólico hacia una utilización de ácidos grasos. El nivel de iones

individuales dentro de la vacuola también puede desencadenar la expresión diferencial de genes (Wagner et al., 2005). Incluso la acidificación incompleta de la vacuola con micobacterias podría influir en el crecimiento bacteriano y la expresión génica dentro de los macrófagos.

Las interacciones iniciales de los bacilos con el macrófago se llevan a cabo a través de receptores celulares, como los receptores para Fc, complemento, manosa, proteína surfactante, CD14 y CD43 (Schlesinger 1993, Randhawa 2005). Aunque se desconoce si las bacterias interactúan con uno o más de estos receptores durante la infección in vivo, los resultados de experimentos in vitro sugieren que la respuesta de macrófagos depende del tipo de receptor con el que las bacterias interactúan. Su interacción con receptores Fc aumenta la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y permite la fusión de fagosomas que contiene bacterias con los lisosomas. Por otra parte, la interacción de las bacterias con el receptor del complemento 3 (CR3) evita el estallido respiratorio (Armstrong 1975, LeCabec 2000) y bloquea la maduración de fagosomas que albergan las bacterias, evitando así la fusión con lisosomas. Las interacciones de micobacterias con los miembros de la familia de receptores Toll-like se han estudiado desde hace algunos años. TLR-2 y TLR-4 son activados por varios componentes de *M. tuberculosis*. Entre otros, la lipoproteína de 19 kDa y el lipoarabinomano (LAM) activan los macrófagos a través de TLR-2, favorecen la producción de IL-12 y de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Independientemente del receptor con la que interactúan las bacterias, se ha observado que la presencia de colesterol en la membrana celular de macrófagos es un elemento esencial para la internalización de las bacterias. Se cree que el colesterol celular funciona como un punto de anclaje directo a la bacteria y estabiliza su interacción con la membrana del macrófago. Después, la bacteria es eficientemente internalizada (Hernández-Pando, et al 2007).

En este estudio al comparar el efecto de la virulencia de la cepa contra el fenotipo del animal se observa que el fenotipo de susceptibilidad expuesto a la cepa de baja virulencia presentan una mayor expresión de sus receptores de membrana, sin embargo esto mismo fenotipo cuando se expone a una cepa virulenta disminuye notablemente la expresión de estos receptores. Como se puede observar las cepas virulentas modulan y evitan el ingreso al macrófago por estos receptores, favoreciendo su supervivencia. El fenotipo de resistencia, sus macrófagos incrementan la expresión de sus receptores de superficie, particularmente MMR, TLR-2 y TLR-4 cuando se exponen a la cepa virulenta, posiblemente para utilizarlos como un mecanismo de control del microorganismo. Diversos estudios reportan una subregulación en genes involucrados en respuesta inmune de macrófagos de bovinos infectados con *M. bovis*, estos genes incluyen receptores como MMR, TLR-2 y TLR-4, esta baja regulación sugiere que *M. bovis* virulenta inhibe vías de señalamiento involucradas con mecanismos de defensa antibacterial (Meade, et al 2006, Meade, et al 2007, Blanco, et al 2012). Es interesante observar que la respuesta inmune que involucra los receptores de superficie no solamente está determinada por el grado de virulencia de la cepa, también involucra la respuesta natural del individuo.

Dependiendo de la vía de activación del macrófago es la respuesta que este realiza contra el patógeno, los macrófagos que se activan por la vía clásica en respuesta a diferentes citocinas, principalmente $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ e IL-12, tienen como característica la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que actúa sobre L-arginina produciendo óxido nítrico (ON) y citrulina. Estas células muestran un incremento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y mayor capacidad para presentar antígenos y eliminar patógenos intracelulares. En este sentido el ON actúa como una importante molécula citotóxica del sistema inmune, en contraste con los macrófagos activados por la vía alterna, estos fallan en producir ON a partir de L-arginina, en virtud a la inducción de la enzima arginasa y tienen comprometida su capacidad para eliminar patógenos intracelulares. Los resultados presentados muestran que las cepas de *M. bovis* inducen de manera importante la expresión de Arginasa como posible mecanismo para evitar la producción de ON y evitar su destrucción. En los 2 fenotipos, de Resistencia y Susceptibilidad, se observa una importante sobreexpresión de la enzima arginasa, y una baja expresión de la enzima iNOS. El fenotipo de Resistencia presenta la menor inducción de la expresión de iNOS. Estudios recientes sugieren que *M. bovis* inhibe vías de señalización relacionadas a mecanismos de defensa antibacterianos (Blanco, et al 2012), mientras que reportes realizados con monocitos derivados de animales sanos e infectados con *M. bovis* reportan una alta producción de ON y citocinas pro-inflamatorias asociadas a la resistencia natural de los bovinos a *M. bovis* (Aranday-Cortés 2007).

En términos generales los macrófagos bovinos responden a la infección con cepas de *M. bovis* con un esquema pro-inflamatorio que se muestra con diferentes niveles de sobreexpresión de los genes seleccionados y es evidente que la cepa virulenta tienden a disminuir estos niveles de expresión en comparación con la cepa mutante $\Delta mce2A$. Los macrófagos provenientes de bovinos con fenotipo de susceptibilidad e infectados con la cepa mutante *M. bovis* $\Delta mce2A$, que previamente había mostrado cierto grado de atenuación en el modelo murino (Aguilar, et al 2006, Giofre, et al 2007), son los que muestran mayores niveles de sobreexpresión de genes pro-inflamatorios, en cambio esta misma cepa expuesta a macrófagos con fenotipo de resistencia indujo los menores niveles de expresión en la mayoría de los genes seleccionados, hay que tomar en cuenta que a esta cepa se le provocó en el laboratorio la delección del gen *mce2A* del operon *mce2*, el cual cuenta con 2 alelos en los operones *mce1* y *mce4* y con todo el resto del genoma de *M. bovis*, que nos indica que puede ser una cepa potencialmente virulenta. De hecho existe una cepa en el este de África, que presenta una mutación natural en el gen *mce2A* (Af2) y continúa siendo patógena para el ganado bovino de esa área geográfica (Berg, et al 2011), sería interesante conocer el grado de susceptibilidad del ganado hacia *M. bovis* en esta zona y determinar la respuesta del fenotipo a la mutante $\Delta mce2A$ y también poder conocer si esta cepa con delección natural del gen *mce2A* presenta sobreexpresión de sus otros alelos.

Estudios experimentales en campo indican que las cepas virulentas de *M. bovis* inducen altos niveles de citocinas proinflamatorias comparados con BCG y producen extensas lesiones macroscópicas en el ganado que es inoculado. Además de una fuerte respuesta a

anticuerpos y tuberculina, así como altos niveles de IFN γ (Wedlock, et al 1999), recientemente Blanco, et al (2012) menciona que un porcentaje importante de genes, agrupados en diferentes funciones, incluyendo respuesta inmune, están subregulados en los bovinos infectados con *M. bovis* y que esto puede ser una estrategia del microorganismo para favorecer su supervivencia. En cultivos de macrófagos la inducción de citocinas proinflamatorias está asociado con el crecimiento y persistencia de cepas de *M. bovis* dentro de los macrófagos y una baja inducción de estas es observada en macrófagos infectados con BCG, en comparación con una mayor inducción con cepas virulentas (Wedlock, et al 1999, Wedlock, et al 2006, Aranday-Cortés, et al 2007, Castillo 2009)

La comparación de la respuesta inmune inducida en macrófagos bovinos por cepas virulentas y atenuadas de *M. bovis* puede ser de utilidad para identificar la respuesta asociada con resistencia o susceptibilidad a la enfermedad y para la búsqueda de marcadores genéticos al contacto con cepas virulentas y cepas utilizadas para la vacunación.

7.2.- Evaluación de la protección inducida por la mutante *M. bovis* $\Delta mce2$ en ratones contra la infección de cepas virulentas del complejo *M. tuberculosis*

Ambas especies *M. tuberculosis* y *M. bovis* pueden entrar y replicarse en macrófagos y células fagocíticas no profesionales, como son las células del epitelio bronquial o del endotelio. La invasión de micobacterias a células fagocíticas no profesionales es aparentemente importante en su diseminación y es mediada por proteínas bacterianas específicas como son las proteínas Mce (Arruda, et al 1993, Flesselles, et al 1999, Gioffre, et al 2005, Casali and Riley, 2007).

La familia de genes *mce* ha sido descrita en todas las cepas del complejo *M. tuberculosis* y otras cepas saprófitas. Esta amplia distribución de los operones *mce* en micobacterias patógenas y no patógenas sugieren que estos genes no son un indicador de virulencia de este microorganismo, pero su presencia y su participación en la virulencia bacteriana puede estar determinada por la regulación de su expresión (Casali and Riley, 2007, Kumar, et al 2003, Kumar, et al 2005). Estudios posteriores demostraron que la mutante $\Delta mce2$ de *M. tuberculosis* estaba atenuada y que puede ser utilizada como vacuna, confiriendo una alta protección tanto como BCG en el modelo de ratones Balb/c (Gioffre, et al 2005, Aguilar, et al 2006, Marjanovic, et al 2010). En el presente estudio se determinó la patogenicidad e inmunogenicidad inducida por la misma mutación pero en *M. bovis*, con el objetivo de tener una novedosa vacuna que fuera candidata para la tuberculosis bovina con la hipótesis de que *M. bovis* está mejor adaptada al ganado bovino. Por lo que primero determinamos la patología inducida y la inmunogenicidad de esta mutante en el modelo murino BALB/c, y después el nivel de protección evocado por la vacunación con esta mutante comparado con BCG en ratones BALB/c desafiados con diversas cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Nuestros resultados demostraron que en comparación con la cepa parental, la mutante *Δmce2* produce una patología pulmonar limitada y su crecimiento es eficientemente controlado por los ratones BALB/c. después de la vacunación ambas cepas, la mutante *Δmce2* y BCG, muestran similar diseminación y crecimiento en los pulmones, pero la cepa mutante *Δmce2* muestra mayor crecimiento en comparación con BCG en los linfonódulos y lo inverso fue observado en el bazo. Cuando se comparó con BCG, una mayor producción de IFN γ fue visto después de 30 pos vacunación en el bazo y 60 días pos vacunación en pulmones y linfonódulos en ratones vacunados con la cepa mutante.

Ha sido demostrado en modelos experimentales que la protección de BCG depende también de la virulencia del microorganismo infectante (López, et al 2006, Medina, et al 2006). Por esta razón, es por lo que además de la cepa tipo de laboratorio H37Rv, usamos un aislado clínico de *M. tuberculosis* la cual es altamente virulenta en el modelo BALB/c (Marquina-Castillo, et al 2009), y cepas de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia y aisladas de diferente huéspedes (Aguilar, et al 2009).

En este modelo, ninguno de las cepas vacunales utilizadas, la mutante *M. bovis Δmce2A* o BCG previno la infección, como fue indicado en los cambios patológicos y determinaciones de UFC. La mutante *Δmce2* muestra un nivel de protección similar a BCG en ratones desafiados con cepas de *M. tuberculosis*, siendo significativamente mayor en comparación con el grupo control no vacunado y desafiados con la misma cepa. En contraste, estudios previos mostraron que la mutante *Δmce2* de *M. tuberculosis* confería mejor protección comparada con BCG, cuando *M. tuberculosis* fue la cepa de desafío (Aguilar, et al 2006).

Los resultados de protección en ratones vacunados con la mutante de *M. bovis Δmce2A* o BCG y desafiados con cepas de *M. bovis* también muestran diferencias dependiendo de la virulencia bacteriana y el genotipo de la cepa. La cepa de *M. bovis* AN5 fue seleccionada para el desafío en los experimentos porque esta cepa ha sido usada en todo el mundo para la producción del Derivado Proteico Puro PPD, debido a su alto crecimiento en medios con glicerol. Este genotipo ha sido seleccionado por diferentes subcultivos en medios de crecimiento en el laboratorio, siguiendo un procedimiento similar al que es utilizado para la generación de la BCG (Brosch, et al 2002). De manera interesante, nuestros resultados muestran que aún después de varios pases en el laboratorio, la cepa AN5 no está atenuada y el nivel de protección en animales vacunados con BCG o con la mutante *Δmce2* fue similar y significativamente mayor cuando fue comparado con el grupo control no vacunado. La característica más llamativa y paradójica fue la poca carga bacteriana y extenso daño del tejido pulmonar (neumonía) en animales vacunados. En efecto, el porcentaje de la superficie pulmonar afectado por neumonía en los animales del grupo control no vacunado fue similar al medido en animales vacunados, mayor al 80 %.

La otra cepa de *M. bovis* de alta virulencia fue aislada de un jabalí. Gran cantidad de especies silvestres son afectadas naturalmente por *M. bovis* (Palmer, et al 2012) y los cerdos salvaje son uno de los principales reservorios en algunas regiones de Europa, como es el área del centro-sur de España, donde la prevalencia de lesiones tuberculosas macróscópicas observadas en estos animales son cercanas al 100 % (Gortazar, et al

2003). Por lo tanto, aunque exista una gran variabilidad genética del hospedador, los cerdos salvajes son fácilmente afectados por *M. bovis* (Acevedo-Whitehouse, et al 2005). Usando el mismo modelo murino de BALB/c, observamos que los aislados provenientes de jabalís salvajes americanos son altamente virulentos (Aguilar, et al 2009). Ambas cepas vacunales utilizadas, la mutante $\Delta mce2$ y BCG, fueron igualmente eficientes induciendo una significativa protección después del desafío con estas cepas. Promoviendo una alta sobrevivencia con una baja carga bacilar en los pulmones pero con alto porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía comparada al del grupo de ratones no vacunados. Sobre todo cuando los animales fueron desafiados con la cepa atenuada de *M. bovis*, el crecimiento de los bacilos fue eficientemente controlado y la inflamación del tejido pulmonar fue baja, pero similar a la exhibida por los ratones del grupo control no vacunado. De manera interesante este tipo de respuesta inflamatoria no fue observada en ratones vacunados y desafiados con cepas de *M. tuberculosis* sugiriendo que *M. tuberculosis* y *M. bovis* presentan diferente inmunogenicidad. Por lo tanto, aunque la homología en la secuencia de DNA entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* es muy alta (99.95%), diferencias significativas en la expresión y regulación de genes durante la infección puede estar relacionado a estas diferencias. En comparación con *M. tuberculosis*, la cepa bovina tiene un genoma más pequeño, careciendo de diversas regiones denominadas RD (Regiones de Diferencia) (Brosch, et al 2002). Los mayores grados de variación en las secuencias génicas entre los bacilos humanos y bovinos se presentan en los genes que codifican para componentes de la pared celular o proteínas secretadas (Brosch, et al 2002, Gioffre, et al 2005, Clarke, et al 2007, Aguilar, et al 2009, Waters, et al 2011), lo cual puede contribuir a la respuesta inflamatoria observada. Sin embargo, la dosis diferente de vacunación y el grado de crecimiento de la mutante $\Delta mce2A$ y BCG puede también contribuir a las diferencias observadas en la inflamación producida.

En conclusión, la mutante *M. bovis* $\Delta mce2$ confiere similar protección que BCG subcepa Phips en ratones BALB/c desafiados con diferentes cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, pero cuando el desafío es hecho con cepas de *M. bovis* de alta virulencia existe una importante respuesta inflamatoria que puede producir un daño significativo en el tejido.

9.- REFERENCIAS

- Acevedo-Whitehouse K, Vicente J, Gortazar C, Höfle U, Fernández-de-Mera IG, Amos W. 2005. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol. Ecol.*14: 3209–3217.
- Acha PN, Boris B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS/OMS, segunda ed. 1997:174-85
- Aguilar LD, Zumárraga MJ, Jiménez OR, Gioffré AK, Bernardelli A, Orozco EH, Cataldi AA, Hernández Pando R. 2009. *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 157(1): 139-147.
- Aguilar LD, Infante E, Bianco MV, Cataldi A, Hernández PR. 2006. Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis* mce-2 and mce-3 mutants in a Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Vaccine.* 24:2333- 2342.
- Ahmad S, Akbar PK, Wiker HG, Harboe M, Mustafa AS. 1999. Cloning, expression and immunological reactivity of two mammalian cell entry proteins encoded by the mce1 operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 50:510–8.
- Ahmad S, Amoudy HA, Thole JE, Young DB, Mustafa AS. 1999. Identification of a novel protein antigen encoded by a *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1 region gene. *Scand J Immunol.*49(5):515-22.
- Ahmad S, El-Shazly S, Mustafa AS, Al-Attayah R. Mammalian cell entry proteins encoded by the mce3 operon of *Mycobacterium tuberculosis* are expressed during natural infection in humans. *Scand J Immunol* 2004;60:382–91.
- Aldwell FE, Wedlock DN, Slobbe LJ, Griffin JFT, Buddle BM, Buchan GS. 2001. In vitro control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. *Tuberculosis.*81: 115-123.
- Aranday-Cortés E, Adams LG, Gutiérrez-Pabello JA. A bovine macrophage proinflammatory cytokine profile and nitric oxide production are associated with natural resistance to *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the 88th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, USA, December 2-4. 2007.
- Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 261(5127):1454-1457.
- Barrios-Payán J, Saqui-Salces M, Jeyanathan M, Alcántara-Vazquez A, Castañon-Arreola M, Rook G, Hernandez-Pando R. 2012. Extrapulmonary Locations of *Mycobacterium tuberculosis* DNA During Latent Infection. *J Infect Dis.* 21. Advance Access published

Berg S, Garcia-Pelayo MC, Müller B, Hailu E, Asiimwe B, Kremer K, Dale J, Boniotti MB, Rodriguez S, Hilty M, Rigouts L, Firdessa R, Machado A, Mucavele C, Ngandolo BN, Bruchfeld J, Boschioli L, Müller A, Sahraoui N, Pacciarini M, Cadmus S, Joloba M, van Soelingen D, Michel AL, Dønne B, Aranaz A, Zinsstag J, van Helden P, Portaels F, Kazwala R, Källenius G, Hewinson RG, Aseffa A, Gordon SV, Smith NH. 2011. African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. *J Bacteriol.*193(3):670-8.

Bigi F, Espitia C, Alito A, Zumarraga M, Romano MI, Cravero S. and Cataldi A. (1997). A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*, 143, 3599-3605.

Bigi F, Gioffré A, Klepp L, Santangelo MP, Velicovsky CA, Giambartolomei GH, Fossati CA, Romano MI, Mendum T, McFaden JJ, Cataldi A. 2005. Mutation in the p36 gene of *Mycobacterium bovis* provokes attenuation of the bacillus in a mouse model. *Tuberculosis* 85, 221- 226.

Bigi F., Alito A., Romano M. I., Zumarraga M., Caimi K. and Cataldi A. (2000). The gene encoding P27 lipoprotein and a putative antibiotic-resistance gene form an operon in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*, 146, 1011–1018

Blanco FC, Soria M, Bianco MV, Bigi F. (2012) Transcriptional Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Cattle Infected with *Mycobacterium bovis*. *PLoS ONE* 7(7): e41066. doi:10.1371/journal.pone.0041066

Blanco FC, Soria M, Gravisaco MJ, Bianco MV, Meikle V, Garbaccio S, Vagnoni L, Cataldi AA, Bigi F. Assessment of the Immune Responses Induced in Cattle after Inoculation of a *Mycobacterium bovis* strain deleted in two *mce2* genes. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:258353

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 3684–3689.

Buddle BM, Wedlock DN and Denis M. 2006. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. *Vet Microbiol.* 25;112(2-4):191-200.

Buddle BM. 2001. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2001;81(1-2):125-32

Calmette A. 1931. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. Section for the study of disease in children. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1: 1481-1490.

Casali N and Riley L, 2007. A phylogenomic analysis of the *Actinomycetales* mce operons. *BMC Genomics.* 8:60. doi:10.1186/1471-2164-8-60. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/60>.

- Casali N, Konieczny M, Schmidt MA, Riley LW. 2002. Invasion Activity of a *Mycobacterium tuberculosis* Peptide Presented by the *Escherichia coli* AIDA Autotransporter. *Infect and Immun.* 70 (12): 6846–6852
- Castillo-Rodal AI, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada-Díaz E, López-Vidal Y. 2006. *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 74(3): 1718-1724.
- Cataldi, A. A., Romano, M. 1. & Bigi, F. (1994). A western blot study of *M. bovis* antigens recognized by cattle sera. *Res Microbiol* 145, 689-698
- Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, Anand N, Lu S, Cohen-Gould L, Riley LW. 2001. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cellular Microbiology* 3:(4), 247-254.
- Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, Anand N, Lu S, Gould LC, Riley L. 2001. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cell Microbiol* 3:247–254.
- Clarke KA, Fitzgerald SD, Zwick LS, Church SV, Kaneene JB, 2007. Experimental inoculation of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*), house mice (*Mus musculus*), and Norway rats (*Rattus norvegicus*) with *Mycobacterium bovis*. *Wildl. Dis.* 43: 353–365.
- Clements CJ. Vaccination – The Current Status of BCG in Mycobacteria and TB. Editors: Kaufmann, S.H.E.; *Issues in Infectious Diseases*, Vol. 2. ISBN 3–8055–7459–2. 2003.
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I & Meslin FX. 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerg Infect Dis* 4: 59-70. Review.
- Dietrich J, Aagaard C, Leah R, Olsen AW, Stryhn A, Doherty TM, et al. 2005. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag86B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol.* 174(10):6332-9.
- Dietrich J, Weldingh K, Andersen P. 2006. Prospects for a novel vaccine against tuberculosis. *Vet Microbiol.* 112 (2-4):163-9.
- Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Maor GL, Bar-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG and Zink A. 2004. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet infect Dis.* 4: 584-92.
- Dubnau E, Fontán P, Manganelli R, Soares-Appel S and Smith I. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during Infection of human macrophages. *Infect and Immun.*70 (6): 2787–2795.

Fine PE. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*; 346:1339.

Fine, PE, Carneiro, IA, Milstien, JB, Clements, CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programs: a discussion document. Geneva, Switzerland: Department of Vaccines and Biologicals, World Health Organization, 1999:1-45.

Flesselles B, Anand NN, Remani J, Loosmore SM, Klein MH. 1999. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 177(2):237-242.

Flesselles BN, Anand N, Remani J, Loosmore SM, Klein MH. 1999. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 237–242.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus CJ, Medina N, Mansoor H, Pryor M Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV and Hewinson RG. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1130426100.

Gioffre A, Infante E, Aguilar D, De la Paz Santangelo M, Klepp L, Amadio A, Meikle V, Etchechoury I, Romano MI, Cataldi A, Hernandez RP, Bigi F. 2005. Mutation in mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes Infect* 7(3):325-334.

Glatman-Freedman A., Casadevall A. 1998. Serum Therapy for Tuberculosis Revisited: Reappraisal of the Role of Antibody-Mediated Immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 11(3):514–532

Gortazar C, Vicente J, Gavier-Widén D. 2003. Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Rec.* 152: 779–790.

Gradmann C. 2006. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin *Microbes and infection.* 8: 294- 301.

Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11554–11559.

Gurria TF. 1994. Situación actual de la campaña contra la tuberculosis y brucelosis en México. *México ganadero* 285:21-28.

Gutiérrez Pabello JA y Adams LG. 2003. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares. *Vet Mex* 34(3): 277-281.

Gutierrez- Pabello JA, Gary-Adams L. 2003. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares. Vet. Méx; 43 (3): 277-281.

Haile Y, Bjune G, Wiker HG. Expression of the mceA, esat-6 and hspX genes in *Mycobacterium tuberculosis* and their responses to aerobic conditions and to restricted oxygen supply. Microbiology 2002;148:3881–6.

Harboe M, Christensen A, Ahmad S et al. 2002. Cross-reaction between mammalian cell entry (Mce) proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol:56:580–7.

Hernández Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer M, Madrid MV. 1996. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. Immunol. 89: 26–33.

Hernández Pando, R., Orozco, E.H., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Alcocer, M., Madrid, M.V., 1996. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. Immunol. 89, 26–33.

Hernández PR, Aguilar LD, Infante E, Cataldi A, F. Bigi ,Martín C, Gicquel B. 2006. The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis. Tuberculosis. 86, 203-210.

Hernández-Pando R, Chacón-Salinas R, Serafín-López J, and Estrada Iris. Immunology, Pathogenesis, Virulence. 157-206. In Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Juan Carlos Palomino, Sylvia Cardoso Leão, Viviana Ritacco (Editors). First Edition. TuberculosisTextbook.com. 2007

Hope JC and Villareal–Ramos B. 2008. Bovine TB and the development of new vaccine. Comp Immunol Microbiol and Infect Dis. (31):77-100.

Hovav AH, Mullerad J, Davidovitch L, Fishman Y, Bigi F, Cataldi A and Bercovier H. 2003. The *Mycobacterium tuberculosis* Recombinant 27-Kilodalton Lipoprotein Induces a Strong Th1-Type Immune Response Deleterious to Protection. Infection and Immunity 71 (6): 3146–3154

Johnson L, Gough J, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M, Wangoo A. 2006. Immunohistochemical markers augment evaluation of vaccine efficacy and disease severity in bacillus Calmette- Guerin (BCG) vaccinated cattle challenged with *Mycobacterium bovis*. Vet Immunol and Immunopathol. 111: 219- 229.

Jonge MI, Brosch R , Brodin P, Demangel C and Cole ST. 2005. Tuberculosis: from genome to vaccine Expert Rev. Vaccines 4 (4).541-551.

Kaneene JB and Thoen CO. 2004. Tuberculosis. In zoonosis update. J Am Vet Med Assoc. 224(5):685-91.

- Kantor IN and Ritacco V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet Microbiol.* (40):5-14.
- Kumar A, Bose M, Brahmachari V. 2003. Analysis of expression profile of mammalian cell entry (mce) operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 71: 6083–6087.
- Kumar A, Chandolia A, Chaudhry U, Brahmachari V, Bose M. 2005. Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria: in silico analysis and expression profiling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43: 185–195.
- Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. 2000. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun*; 68: 4736-45.
- Le Moigne V, Robreau G, Borot C, Guesdon JL, Mahana W. 2005. Expression, immunochemical characterization and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein p27. *Tuberculosis (Edinb)* 85(4):213-9.
- López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernández-Pando R, Huygen K, Van Soolingen D., 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 133: 30–37.
- Marjanovic O, Miyata T, Goodridge A, Kendall LV, Riley LW. 2010. Mce2 operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis* is attenuated in C57BL/6 mice. *Tuberculosis (Edinb)*.90(1):50-6.
- Marjanovic O, Lavarone AT, Riley LW. 2011. Sulfolipid accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* disrupted in the mce2 operon. *J Microbiol*;49(3):441-7.
- Marquina-Castillo B, García-García L, Ponce-de-León A., Jimenez-Corona ME, Bobadilla-Del Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Kato-Maeda M, Robertson B, Young D, Small P, Schoolnik G, Sifuentes-Osornio J, Hernandez-Pando R. 2009. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunol.* 128(1): 123-133.
- Maue AC, Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Minion FC, Brown WC, Norimine J, Foote MR, Scherer CFC, Estes DM. 2007. An ESAT-6:CFP10DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine* .25: 4735-4746.
- Maue AC, Waters WR, Palmer MV, Whipple DL, Minion FC, Brown WC, et al. 2004. CD80 and CD86, but not CD154, augment DNA vaccine-induced protection in experimental bovine tuberculosis. *Vaccine.* 23(6)769-79
- McNair J, Welsh MD, Pollock JM. 2007. The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. *Vaccine.* 25:5504- 5511.

Meade KG, Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, O'Farrelly C, et al. 2007. Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. BMC Genomics 8: 400.

Meade KG, Gormley E, Park SD, Fitzsimons T, Rosa GJ, Costello E, Keane J, Coussens PM, MacHugh DE. 2006. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from *Mycobacterium bovis* infected cattle after in vitro antigenic stimulation with purified protein derivative of tuberculin (PPD). Vet Immunol Immunopathol. 15;113(1-2):73-89.

Medina E, Ryan L, LaCourse R, North R. 2006. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifested as an ability to cause extrapulmonary disease. Tuberculosis. 86: 20–27.

Meikle V, Schneider M, Azenzo G, Zumárraga M, Magnano G and Cataldi A. 2007. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* Genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters Zoonoses Public Health 54: 86-93.

Milián SF y Gallegos TRM. 2001. La vacunación con M. bovis BCG, posible alternativa para el control de la tuberculosis bovina en México. Memorias del 20 congreso internacional de epidemiología. AMEV:63-69.

Milián SF, Banda RV, Ramírez CC, Arriaga DC. 2002. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within México. Preventive Veterinary Medicine 55: 255- 264.

Murphy D, Corner LAL, Gormley E. 2008. Adverse reactions to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette- Guérin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. Tuberculosis 88 (4): 344-357.

Palmer MV, Thacker TC, Waters WA, Gortazar C, Corner LA. 2012. *Mycobacterium bovis*: A Model Pathogen at the Interface of Livestock, Wildlife, and Humans. Review Article. Vet. Med. Inter. ID 236205, 17 pages. doi:10.1155/2012/236205

Panigaglia M, Sturniolo T, Besozzi G, Boccieri MG, Sinigaglia F, Grassi F. 2002. Identification of a Promiscuous T-Cell Epitope in *Mycobacterium tuberculosis* Mce Proteins Infection and Immunity 79- 85

Qureshi T, Templeton JW, and Adams LG. 1995. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. Vet Immunol Immunopathol; 50: 55-65

Randhawa AK, Ziltener HJ, Merzaban JS, Stokes RW. 2005. CD43 is required for optimal growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and in mice. J Immunol; 175: 1805-12.

Rentería ETB, Hernández De Anda J. 1996. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. Exposure associated with management of colostrums and milk. *Prev Vet Med.* 27: 23-27.

Roy E, Stavropoulos E, Brennan J, Coade S, Grigorieva E, Walker B, Dagg B, Tascon RE, Lowrie DB, Colston J, Jolles S. 2005. Therapeutic Efficacy of High-Dose Intravenous Immunoglobulin in *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. *Infect and Immun* 73 (9): 6101–6109

Russell DG. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2(8):569-77. Review.

Ryan TJ, Livingstone PG, Ramsey DSL, Lisle GW, Nugent G, D.M. Collins DM, Buddle BM. 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: The experience from New Zealand. *Vet. Microbiol.* 112 :211-219.

Santangelo MP, Goldstein J, Alito A, Gioffre A, Caimi K, Zabal O, Zumarraga M, Romano MI, Cataldi AA, Bigi F. 2002. Negative transcriptional regulation of the *mce3* operon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 148(Pt 10):2997-3006

Schlesinger LS. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol*; 150: 2920-30.

Senarathe RH, Ben Sidders B, Sequeira P, Saunders G, Dunphy K, Marjanovic O, Reader JR, Lima P, Chan S, Kendall S, McFaden J and Riley LW. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in *mce3* and *mce4* operons are attenuated in mice. *Journal of Medical Microbiology.* 57, 164- 170.

Shi L, Jung YJ, Tyagi S, Gennaro ML, North RJ. 2003. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:241–246.

Shimono H, Morici L, Casali N et al. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15918–23.

Silva P, Bigi F, Santangelo MP, Romano MI, Martin C, Cataldi A and Ainsa JA. 2001. Characterization of P55, a Multidrug Efflux Pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 800–804.

Sivagnanam S, Namasivayam N, Chellam R. 2011. Polyclonal antibody against conserved sequences of *mce1A* protein blocks MTB infection in macrophages. *Appl Microbiol Biotechnol*; DOI 10.1007/s00253-011-3754-9

Thacker T, Palmer MV, Waters WR . 2007. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vet immunol and immunopathol.* 119: 204-213.

Thoen OC, LoBue AP, Enarson AD, Kaneene BL, Kantor NI. 2009 Tuberculosis: re-emerging disease in animals and humans. *Vet Italiana*. 45 (1): 135-181

Thoen OC, LoBue AP, Kantor NI. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol*. 25;112(2-4):339-45

Vallecillo M.A.J. Crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares y su asociación al polimorfismo de la 3' UTR del Nramp1 (tesis de maestría). México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.

Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, Hope JC, Estes DM. 2011. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clin. Dev. Immunol*. ID 768542, 11 pages doi:10.1155/2011/768542768542.

Wedlock DN, Aldwell FE, Collins DM, Lisle GW, Wilson T, Buddle BM. 1999. Immune responses induced in cattle by virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* strains: correlation of delayed-type hypersensitivity with ability of strains to grow in macrophages. *Infec and Immun*. 67 (5): 2172–2177.

Wedlock DN, Kawakami RP, Koach J, Buddle BM, Collins DM. 2006. Differences of gene expression in bovine alveolar macrophages infected with virulent and attenuated isogenic strains of *Mycobacterium bovis*. *Int Immunopharmacol*. 6(6):957-61.

Wedlock DN, Skinner MA, Palane MA, de Lisle GW, Vordermeier HM, Hewinson RG, et al. 2003. vaccination with DNA vaccine encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 prime protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis. *Tuberculosis(Edinb)*. 3(6):339-49.

Weir RE, Fine PE, Floyd S, Stenson R, Stanley C, Branson K, Britton WJ, Huygen K, Singh M, Black GF, Dockrell HM. 2008. Tuberculosis Comparison of IFN γ y responses to mycobacterial antigens as markers of response to BCG vaccination. 88: 31-38.

Whelan AO, Wright DC, Chambers MA, Singh M, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2008. Evidence for enhanced central memory priming by live *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in comparison with killed BCG formulations. *Vaccine*. 26: 166- 173.

Young D. and Garbe T R. 1991. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 142: 55-65.

Young DB, Kaufmann H E, Hermans PWM and Thole ER. 1992. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol Microbiol* 6:133-145.

Zumarraga M, Bigi F, Alito A, Romano MI, Cataldi AA. 1999. A 12.7 kb fragment of *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*:145:893–7.

Apéndice

Descripción de protocolos de trabajo.

Tinción para inmunohistoquímica

A.- Procedimiento de la Tinción

Desparafinación y rehidratación: Antes de la tinción las laminillas con los tejidos deben ser desparafinadas totalmente y rehidratadas. Los residuos de parafina pueden provocar un incremento de reacciones no específicas

1. Desparafinar 20 minutos a 60°C
2. Colocar las laminillas en xileno por 5 minutos. Cambiar el baño y repetir una vez.
3. Eliminar el exceso del líquido y poner la laminilla en etanol absoluto por 3 minutos. Cambiar el baño y repetir una vez.
4. Eliminar el exceso del líquido y poner la laminilla en etanol al 95 % por 3 minutos. Cambiar el baño y repetir una vez.
- 5.- Eliminar el exceso del líquido y poner la laminilla en agua destilada o desionizada por 30 segundos

Protocolo de tinción

Paso 1. Recuperación antigénica

Colocar las laminillas en un vaso de coupling y llenarlo con solución de recuperación antigénica, cerrarlo y colocarlo en una hoya de presión a 95-99°C por 30 minutos. Sacar, dejar enfriar y lavar con PBS

Paso 2. Bloqueo de peroxidasas endógenas

Eliminar el exceso de líquido y cuidadosamente utilizando una gasa eliminar líquidos remanentes alrededor de la muestra. Delimitar la muestra usando un lápiz DAKO.

Aplicar 3 gotas de reactivo para bloquear peroxidasas cubriendo la muestra por 5 minutos y lavar con PBS

Paso 3. Anticuerpo primario o reactivo de control negativo

Eliminar el exceso de líquido y cuidadosamente utilizando una gasa eliminar líquidos remanentes alrededor de la muestra.

Cubrir la muestra con 3 gotas del anticuerpo primario (α -Mce2A policlonal en conejo) diluido 1:1000 en buffer de dilución e incubar por 30 minutos y lavar con PBS.

Paso 4. Reactivo de visualización

Eliminar el exceso de líquidos y cubrir con 3 gotas de reactivo de visualización (α -IgG de conejo DAKO) por 30 minutos y lavar con PBS.

Paso 5.- Solución de cromógeno-sustrato (DAB)

Eliminar el exceso de líquidos y colocar 3 gotas de solución de cromógeno-sustrato (DAB-Peróxido de hidrógeno), incubar y ver al microscopio el revelado, parar la reacción con agua destilada. Mantener las laminillas en agua destilada.

Paso 6. Tinción de contraste

Las laminillas se contrastan con hematoxilina por 1 minuto, lavar suavemente y eliminar todo residuo de hematoxilina.

Paso 7. Montaje

Las muestras deben ser montadas con un medio de montaje no acuoso, dejar secar por 20 minutos en la oscuridad y leer.

Técnica de inclusión para inmunomicroscopía electrónica

Fijación: Las muestras de tejido pulmonar fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % en buffer de Sörensen pH 7.3, 0.2M, por 2 horas a 4°C.

- Lavado: Buffer de Sörensen pH 7.3, 0.2M, por 10 minutos a 4°C
- Buffer de Sörensen pH 7.3, 0.2M, por 10 minutos a 4°C
- Buffer de Sörensen pH 7.3, 0.2M, por 10 minutos a 4°C
- Bloqueo: Cloruro de amonio al 0.5M en Buffer de Sörensen pH 7.3, 0.2M, por 45 minutos a temperatura ambiente
- Buffer de Sörensen pH 7.3, 0.2M, por 10 minutos a 4°C
- Deshidratación: Alcohol etílico al 50 % por 30 minutos a 4°C
- Alcohol etílico al 70 % por 30 minutos a 4°C
- Alcohol etílico al 80 % por 30 minutos a 4°C
- Alcohol etílico al 90 % por 30 minutos a 4°C
- Alcohol etílico al 96 % por 1 hora a 4°C
- Alcohol etílico al 96 % por 20 minutos
- Alcohol etílico al 100 % por 1 hora a 4°C
- Alcohol etílico al 100 % por 1 hora a 4°C
- Infiltración: Alcohol etílico absoluto/Resina acrílica hidrosoluble(LR-White) 2:1 por 12 horas
- Alcohol etílico absoluto/Resina acrílica hidrosoluble(LR-White) 1:1 por 2 horas
- Alcohol etílico absoluto/Resina acrílica hidrosoluble(LR-White) 1:2 por 2 horas
- Resina acrílica hidrosoluble(LR-White) pura en cápsulas cerradas a 50°C por 12 horas

Técnica de inmunomicroscopía electrónica para la localización de antígenos

Cortes: Los cortes deben ser de 70 a 90 nm montados en rejillas de níquel (300 mesh)

- Permeabilización: Lavado por goteo con PBS/BSA/Tween 20
- Lavado por flotación con PBS/BSA/Tween 20 por 45 minutos
- Bloqueo: Se bloquea con suero distinto a la fuente del anticuerpo primario, se bloqueó con suero de caballo por 1 hora
- Anticuerpo primario: El antisuero α -mce2A, elaborado en conejo, es diluido con PBS/BSA por 12 horas a 4°C
- Lavado: PBS/Tween 20 por goteo. Por flotación con PBS/Tween 20 por 10 minutos
- Anticuerpo secundario: α -IgG de conejo conjugado a oro por 1 hora
- Lavado: PBS/Tween 20 por goteo. PBS/Tween 20 por flotación por 15 minutos
- Agua bidestilada por goteo
- Agua bidestilada por flotación por 10 minutos
- Contraste: Solución saturada de acetato de uranilo por 30 segundos

Ensayo de inmunogenicidad de la proteína *Mce2A*

En gabinete de seguridad se realizó el siguiente procedimiento:

- A cada tubo se adicionó 4 μ l de colagenasa y se incubó 1 hora a 37°C.
- Se maceró el órgano en una coladera para células y se filtró para eliminar restos de tejido, se adicionó 0.5 ml de RPMI para terminar de lavar.
- Se centrifugó a 3000 rpm x 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y resuspendió en 1 ml de buffer de lisis. Se incubó a 4°C x 4 minutos
- Se centrifugó a 3000 rpm x 1 minuto, se eliminó sobrenadante y resuspendió en 1 ml de RPMI
- Se centrifugó 3000 rpm x 1 minuto, se eliminó sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI suplementado y se cuantificó en cámara.
- Se colocaron 10000 células por pozo y los estímulos por triplicado:

ESAT6 5 μ g/ml

Ag85 5 μ g/ml

PPD 5 μ g/ml

Mce2Ar 2 μ g/ml

Mce2Ar 5 μ g/ml

- Se incubó a 37°C por 72 horas, se centrifugaron las placas a 1000 rpm x 2 minutos y se recuperó el sobrenadante.

La determinación de IFN γ se realizó por medio del kit de ELISA BD OptEIA Ste Mouse IFN γ (BD Bioscience 555138) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Purificación de monocitos derivados de sangre periférica de bovino

Gradiente de Percoll:

Para la recuperación de los monocitos por centrifugación isopícnica, se requiere que la suspensión a preparar de Percoll posea una gravedad específica similar a la de las células a separar. Se utiliza la suspensión de Percoll-trabajo a una gravedad específica (SG) de 1.0770. Para obtener esta gravedad específica se añade a la solución stock de Percoll una serie de soluciones en donde cada una de ellas posee una SG particular y así finalmente se obtiene la SG deseada. Las SG de cada solución adicionada puede equivaler al Índice de Refracción (RI) de las mismas y con éste índice obtener los mismos resultados que al utilizar las SG.

El RI del Percoll-trabajo equivalente a la SG=1.0770 es el RI=1.3460 y es el que se busca obtener al final para poder realizar la centrifugación isopícnica con Percoll.

Las sustancias o soluciones necesarias para preparar el Percoll-trabajo son: Percoll stock (10:1), albúmina sérica bovina al 5% (BSA 5%), Citrato de Sodio 130 mM (Citrato) y solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X).

Sustancia	SG	RI*
BSA 5%	1.0227	= 1.3415
Citrato	1.0219	= 1.3388
PBS 1 X	1.0056	= 1.3349
Percoll-stock	1.1245	= 1.3530
Final	1.0770	= 1.3460

* Variación máxima deseada de ± 0.0001 .

Para calcular los volúmenes de cada una de las anteriores soluciones que se deben adicionar para obtener el volumen final de la suspensión de Percoll de trabajo, se resuelve la siguiente fórmula.

$$Xa + 0.1b + 0.1c + (0.8-X)d = 1.077 - 1 \text{ Donde:}$$

X= ml de PBS por ml de suspensión final

a = SG del PBS - 1

b = SG de la BSA - 1

c = SG del Citrato - 1

d = SG del Percoll - 1

Determinar los volúmenes de cada sustancia:

Volumen en ml (cantidad necesaria que se requiere)

PBS = (X) (Volumen final en ml)

BSA = 0.1 (Volumen final en ml)

Citrato = 0.1 (Volumen final en ml)

Percoll = (0.8 - X) (Volumen final en ml)

Todas las mediciones de índice de refracción y el cálculo de los volúmenes de las soluciones para preparar la suspensión de Percoll-trabajo se deben hacer el mismo día que se utilizarán.

Soluciones:

ANTICOAGULANTE ACD

Citrato trisódico 22.0 g
Acido cítrico 8.0 g
Glucosa 24.5 g
Agua destilada c.b.p. 1000.0 ml
pH 5.0

PBS 10 X

Cloruro de sodio 87.7 g
Fosfato de sodio monobásico 1.5 g
Fosfato de sodio dibásico 13.0 g
Agua destilada c.b.p. 1000.0 ml

PBS 1 X

PBS 10 X 100.0 ml
Agua destilada c.b.p. 1000.0 ml
Ajustar pH 7.4

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CITRATO

Acido cítrico trisódico 38.23 g
Agua mQ c.b.p. 1000.0 ml

PBS-CITRATO

PBS 10 X 100.00 ml
Acido cítrico trisódico 3.72 g
Agua c.b.p. 1000.0 ml
Ajustar pH 7.4.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE NaCl 1.5 M + NaH₂PO₄

Cloruro de sodio 8.77 g
Fosfato de sodio monobásico 1.20 g

Agua c.b.p. 100.00 ml

MEDIO DE CULTIVO CRPMI

RPMI medium 1640 500.0 ml

L-glutamina 5.5 ml

MEM-no aminoácidos esenciales 5.5 ml

Piruvato de sodio 5.5 ml

Bicarbonato de sodio al 7.5% 12.0 ml

Albúmina sérica bovina 5% (p/v)

Albúmina sérica bovina cristalina 50.0 g

Agua destilada estéril c.b.p. 1000.0 ml

TWEEN 20 AL 0.5%

Tween20 0.5 ml

Agua destilada estéril c.b.p. 99.5 ml

SOLUCIÓN STOCK DE PERCOLL

Percoll comercial 10 partes - NaCl 1.5 M + NaH₂PO₄ 1 parte: 10:1

TODAS LAS SOLUCIONES SE ESTERILIZAN POR FILTRACIÓN 0.22µm