



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

"PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA POR BOVINOS  
TUBERCULOSOS INFECTADOS DE MANERA NATURAL Y SU  
ASOCIACIÓN CON LA RESISTENCIA NATURAL A LA  
INFECCIÓN CON *Mycobacterium bovis*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

**ARIEL DELILER SÁNCHEZ LÓPEZ**

Asesores:

Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello

Dr. Jaime Campuzano Granados



MÉXICO, D.F.

2012.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIA

A mis padres, principalmente mi mamá, la mejor madre del mundo.

A mis hermanas Claudia y Gloria.

A mi hermano Uriel.

A mi querida abuelita Estela y a mi papá que me cuidan desde el cielo.

A mis sobrinos Fabio, Grover, Angélica y Jared.

A mis amigos y a mi Kyara, a mi Nena y a mi Lunita.

Doy gracias a Dios y a la vida por rodearme de tanta gente valiosa como ustedes, que me dan su amor y su comprensión, pero sobre todo el apoyo y la fortaleza para realizar algo tan complicado y difícil que al final sólo puede reflejar lo que significa ser una gran familia, mi mayor tesoro en éste mundo. Sin ustedes no sería nada. Gracias por creer en mí siempre.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme obtener una educación de calidad a nivel mundial. Donde quiera que esté siempre seré puma.

A quienes pueda servir la información generada con éste trabajo, que como otros es la base para iniciar nuevos caminos para avanzar en la ciencia, camino que nunca termina. Gracias por tomar en cuenta mi trabajo.

A todos los animales del mundo, criaturas no siempre bellas, pero que son tan maravillosas y fascinantes como los diamantes mismos. “Nunca olvidemos que cada criatura viva en el mundo tiene el mismo derecho a la vida que nosotros”.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mami, Guadalupe, gracias por todo lo que me has dado, siempre lo diré lo que soy y lo grande que llegaré a ser algún día es por ti. Gracias por dejarme seguir mis sueños, por la vida llena de felicidad que me permitiste tener y por ser el ejemplo de una gran persona, que aunque con todos sus defectos, eres responsable, trabajadora, fuerte (de verdad no sé de dónde sacas tanta fuerza que ni yo tengo a veces), cariñosa e inteligente, cuando sea grande quiero ser como tú. Gracias por ser mi héroe y mi madre al mismo tiempo.

A mi papá, Ariel Francisco. Gracias por todo el cariño que me diste siempre, por las grandes cosas que me diste, por ser el mejor papá. Qué lástima que no estás presente para ver finalizado lo que te prometí el día que partiste con Dios, pero sé que ahí estarás conmigo, como siempre.

A mi abuelita, mamá Estela, gracias por haber sido la más cariñosa y linda abuelita del mundo, ya no llegaste al final conmigo, nuca voy a entender por qué Dios te llevó antes, pero que maravilloso fue tener una personita tan enorme como tú a mi lado, tan divertida, tan cariñosa, siempre pienso en ti y sé que también estarás ese día conmigo, como siempre. Te amo abuelita.

A mis hermanas, Claudia, gracias por esas vacaciones tan bonitas e inolvidables, las primeras de muchas miles más, qué grande eres al poder lograr tanto tú sola en un país extranjero, ojalá yo logre lo mismo que tú algún día. Es bonito saber que aunque estamos tan lejos nos queremos y nos apoyaremos siempre. A mi hermana Gloria, Yolis, gracias por todo tu cariño y apoyo, otra muestra más de fortaleza y grandeza que una persona puede tener, no sé si yo pudiera sobrevivir a todo lo que tú has pasado, te admiro mucho. Mis dos hermanas, mujeres tan fuertes y suficientes que no necesitan de nadie para ser lo que son las quiero mucho.

A mi hermano Uriel, mi gemelo. Sé que no somos el mejor ejemplo de hermanos, que somos tan distintos como el día y la noche, pero espero entiendas que eres grande, inteligente y que puedes lograr lo que quieras, no siempre se puede ser tranquilo y aburrido, pero valora lo que tienes y lo que serás algún día. Te quiero y me siento orgulloso de ser tu hermano, no lo olvides nunca.

A mis sobrinos, Fabio, Grover, Angélica y Jared, por ser mis amigos y cómplices de pequeñas aventuras, siempre le ponen ese toque de inocencia y diversión a todo.

A mis amigas, Catalina Tufiño Loza (mi mejor y más grande amiga), Karla, Itandehui, Lucia, Gretel y Valeria, por ser mis compañeras de tantas clases y prácticas tan pesadas y difíciles, pero con ustedes se hacía menos duro el trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de tuberculosis y brucelosis, Ramón, Yuliett, Yanela, Susana, Jorge, Jorge Alva, Omar, Karina y Anayatzin. Gracias por enseñarme tantas cosas y hacer más ameno un trabajo tan pesado y difícil, les deseo lo mejor y que sigamos siendo amigos siempre.

A mis grandes amigos Pablo, Julio, Junior e Israel (ya 20 años de amistad), gracias por ser mis amigos que nada tienen que ver con la medicina, pero que me ayudaban a salir de la rutina y a olvidarme de todo. Suerte en sus vidas amigos.

A mis asesores el Doctor José Ángel, gracias por ser mi asesor y por ayudarme con este trabajo, por su comprensión y dirección, al Doctor Jaime Campuzano, gracias por su apoyo y el aporte de conocimientos, a los dos, gracias por su tiempo y dedicación en este proyecto.

A la Dra. Irasema, gracias por su apoyo dentro del laboratorio de bioseguridad y por su amistad, y al técnico laboratorista Pablito, por ser mi acompañante de tantos viajes a Tizayuca, gracias por llevarme y traerme siempre con bien y hacerme el largo camino más divertido.

Al Dr. Antonio Vázquez García y al Dr. Rafael Soto Castor, por su gran apoyo durante la toma de muestras en Tizayuca, Hidalgo.

Al proyecto CONACYT SIN – licenciatura 102958, al proyecto PAPIIT IN – 214009 y a CONACYT – 48878 – Z, ciencia básica.

Finalmente, a mi querida perrita Kyara (mi niña), a mi Nena (mi cochecito), a mi Lunita, a Lucero (ojalá los humanos pudiéramos dar el mismo amor que tú nos diste) y a mi Negrita (ahora diviertes a Dios en el cielo); perritas tan nobles como todos los demás que me alegran la vida y me dan y dieron su amor, “qué bueno sería si todos los humanos pudiésemos ver la humanidad perfecta de los perros”. Y a todos mis animales que son mi fuente de inspiración y la razón de que haya elegido ser un Médico Veterinario Zootecnista, profesión más noble y altruista que muy pocos tenemos el privilegio de tener.

**¡Sé onr sverdar sitja hvass!**

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
PATOGENIA.....	3
RESPUESTA INMUNE HACIA TUBERCULOSIS BOVINA.....	4
RESISTENCIA NATURAL DEL HOSPEDADOR.....	7
HIPOTESIS (OBJETIVOS).....	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	30
REFERENCIAS.....	31

## **Título**

### **“Producción de Interferón gamma por bovinos tuberculosos**

**infectados de manera natural y su asociación con la resistencia natural a la infección con *Mycobacterium bovis*”.**

## **Resumen**

En éste estudio se evaluó la resistencia natural a *Mycobacterium bovis* en bovinos tuberculosos infectados de manera natural y su asociación con la producción de Interferón gamma (IFN $\gamma$ ) , para lo cual se emplearon once bovinos tuberculosos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, que fueron previamente identificados como animales reactivos positivos a tuberculosis mediante la prueba doble comparativa y, también, fueron positivos a PCR de exudados nasales que se les realizaron para confirmar su infección. A dichos animales se les extrajo sangre periférica para aislar los monocitos que fueron empleados en ensayos microbicidas con el fin de caracterizar a los bovinos fenotípicamente como resistentes o susceptibles a *Mycobacterium bovis*. De igual forma, se les realizó la prueba de Bovigam® a cada animal para conocer los niveles de IFN $\gamma$  que éstos presentaban. Como resultado, se observó que todos los bovinos analizados fueron susceptibles a *Mycobacterium bovis*, mostrando una aparente diferencia en el grado de susceptibilidad entre individuos; sin embargo, no hubo diferencia



estadística significativa para comprobar que unos animales fueron más susceptibles que otros. Por otro lado, los bovinos también mostraron diversos niveles de producción de IFN $\gamma$  sin diferencia estadística entre ellos, lo que tal vez pudiera sugerir que no hay una relación entre la producción de IFN $\gamma$  y la susceptibilidad a *Mycobacterium bovis*.

## **I. Introducción**

### **II.I. Tuberculosis bovina.**

La tuberculosis bovina es una enfermedad causada por una bacteria llamada *Mycobacterium bovis*, la cual afecta a diferentes especies animales, tanto domésticas como silvestres, incluyendo al hombre por lo que es de gran importancia en salud pública a nivel mundial (1). Es una enfermedad que no sólo se encuentra en países pobres y en vías de desarrollo, sino que también en países de primer mundo, es por eso que la OMS la ha considerado como una enfermedad de emergencia mundial (1). La tuberculosis bovina afecta al ganado bovino especializado en la producción láctea, ya que provoca importantes pérdidas económicas debido a que los animales enfermos presentan disminución de peso, de la producción láctea y de la duración de las lactancias; incremento en la mortalidad de becerros; aunado a los decomisos parciales y totales de las canales. Todo esto se agrava debido a que la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 (31) establece que en los hatos donde existan animales reactivos

positivos a la prueba de intradermorreacción éstos se eliminarán, por lo que será prohibida su comercialización y traslado (2).

*Mycobacterium bovis* pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual está conformado por ciertas especies, tales como: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microtti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. bovis* (2).

*Mycobacterium bovis* es un bacilo que mide 0.5 micrómetros, es Gramm positivo, ácido alcohol resistente y una característica relevante es la presencia de glicolípidos y peptidoglicolípidos (arabinomananos y lipoarabinomananos) en su membrana que le confieren cierta resistencia a la fagocitosis, lo que le permite sobrevivir a dicho proceso. Tiene un comportamiento aerobio estricto, es resistente al frío, la congelación y desecación, siendo por el contrario, muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultra violeta. Su replicación es lenta, incluso puede presentar estado de dormancia si las condiciones del ambiente no son adecuadas para su sobrevivencia (2, 3, 4 y 5).

## **II.II. Patogenia.**

La principal vía de transmisión es la respiratoria, la cual se da a través de aerosoles y donde los animales afectados desarrollan neumonías granulomatosas graves, lo cual conlleva a insuficiencia respiratoria. La segunda vía de transmisión, es la oral, asociada al consumo de alimento contaminado y en el caso de los becerros por leche o calostro contaminado, provocando lesiones en el tracto

digestivo. Otra vía de infección es la genital, la cual es de baja frecuencia (1, 3, 4 y 5).

Debido a que la principal ruta de infección es la respiratoria, los principales órganos afectados son los pulmones, pero dependiendo del estado inmunológico del individuo, la micobacteria se puede diseminar hacia otros órganos y provocar formas graves de la enfermedad como la miliar y la meníngea. Asimismo, cuando la micobacteria llega a los alveolos ésta es fagocitada por los macrófagos alveolares (donde es capaz de sobrevivir y, posteriormente, destruir al macrófago que la contiene) los cuales utiliza para diseminarse por vía linfática hacia los linfonódulos regionales (2, 3, 4 y 5). En el tejido pulmonar y linfoide, se produce una reacción inflamatoria crónica caracterizada por la formación de granulomas, que se observan como nódulos firmes, de color blanco, delimitados y de tamaño variable, y cuya superficie de corte es irregular, amarilla con un centro de exudado caseoso crepitante al tacto por mineralización. Microscópicamente, la lesión se caracteriza por ser nodular, delimitada por una cápsula de tejido conectivo fibroso, y subyacente a ella existe abundante infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas (células de Langhans) con un centro de necrosis caseosa mineralizado (3, 4 y 5).

## **II. Respuesta inmune hacia tuberculosis bovina.**

Una vez que la micobacteria se encuentra dentro del hospedador la evolución de la enfermedad y diseminación bacteriana están reguladas por la producción de

citocinas proinflamatorias (respuesta Th1), que favorecen la contención y evitan su replicación y diseminación, para finalmente eliminar la infección en el hospedador. Posteriormente, se inicia un cambio en el perfil de citocinas, es decir, comienzan a producirse citocinas antiinflamatorias (respuesta Th2), que tienen como objetivo principal regular y disminuir la actividad de las citocinas proinflamatorias y favorecer el desarrollo del tejido de reparación (15, 16, 19 y 20).

La respuesta inmunológica específica en contra de la infección micobacteriana inicia cuando las células presentadoras de antígeno como los macrófagos y células dendríticas, entre otras, presentan los antígenos a través del complejo principal de histocompatibilidad clase II a los linfocitos T cooperadores (TCD4+), los cuales iniciarán con la producción de citocinas proinflamatorias como Interferón gama ( $IFN\gamma$ ), Interleucina 2 (IL – 2) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (29).

El  $IFN\gamma$  incrementa el potencial de las células citotóxicas (Linfocitos T CD8) lo que promueve la inducción de la inmunidad mediada por células. Puede regular las vías de presentación de antígenos a través del complejo principal de histocompatibilidad tipo II, lo que promueve la activación de linfocitos TCD4 específicos. Es capaz de incrementar la expresión del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHCII) en células presentadoras de antígenos. Finalmente, favorece la activación de macrófagos, células citotóxicas y células asesinas naturales o “Natural Killers”, por sus siglas en inglés NK, para llevar a cabo su actividad bactericida mediante la producción de óxido nítrico (ON),

lisosomas, reactivos de oxígeno (ROS) y reactivos intermedios de nitrógeno (RNI), (29).

La IL – 2, es producida en linfocitos TCD4 por inducción del IFN $\gamma$ . Induce la proliferación de todos los tipos de linfocitos de respuesta Th1; estimula la síntesis de interferón, liberación de IL – 1 (proinflamatoria, pirógena y activadora de células Th1) y TNF $\beta$  (29).

El TNF $\alpha$  es producido por macrófagos y el TNF $\beta$  por linfocitos activados, estimulan la actividad citotóxica de células fagocíticas y la proliferación de fibroblastos. Son importantes para la formación del granuloma característico en la tuberculosis (29).

La respuesta inmunológica se caracteriza por inducir una reacción de hipersensibilidad de tipo IV (respuesta mediada por células) que se produce como consecuencia de la presentación de antígenos micobacterianos a los linfocitos TCD4+, lo que conlleva a la producción de citocinas que activan a los macrófagos dando como resultado una respuesta inmune específica mediada por linfocitos e histiocitos y que es de curso crónico. Se considera que la respuesta inmune de tipo Th1 efectiva, bajo condiciones óptimas y eficientes, a través de la producción de citocinas proinflamatorias puede contener al agente patógeno, sin embargo, la activación de este tipo de respuesta no solo produce la muerte del agente infeccioso sino también puede producir lesiones graves del tejido afectado, por lo que es necesario tener un sistema que lo regule, y este sistema se caracteriza por producir citocinas antiinflamatorias (respuesta inmune tipo Th2) y de esta manera

lograr un equilibrio en la respuesta inmune, ya que de lo contrario una respuesta inmune no regulada puede conducir a la muerte del individuo (15, 16, 19 y 20).

Si bien una respuesta inmune específica es importante para lograr el control de la infección, también es importante considerar la respuesta inmune innata, que permite que los individuos tengan “resistencia natural” a ciertas enfermedades, que cuando se llegan a presentar el individuo sea capaz de recuperarse con mayor rapidez.

### **III. Resistencia natural del hospedador a la infección por tuberculosis bovina.**

El término “resistencia natural” se refiere a la capacidad heredable de un animal de evitar la presentación de la enfermedad, o la severidad de ésta, cuando ha sido expuesto al agente causal de la misma sin haber tenido previa exposición o haber sido inmunizado (5). Bajo estas condiciones, se presenta una falta de susceptibilidad al proceso de enfermedad aún si existe contacto entre el huésped y el agente infeccioso debido sobre todo a que el agente patógeno no puede desarrollarse por incompatibilidad de tipo estructural o fisiológica con el huésped (6 y 7). Los mecanismos que un animal puede utilizar para resistir la enfermedad se dividen en mecanismos inmunes y no inmunes; siendo los macrófagos considerados como uno de los elementos más importantes en éstos procesos (5, 6, 7 y 8). Se han realizado diferentes estudios utilizando macrófagos de origen bovino, mediante los cuales, se ha demostrado que la condición genética del

ganado asociada a la resistencia natural a patógenos intracelulares es muy importante en el resultado final de la interacción microorganismo-huésped. Por ejemplo, para determinar la resistencia natural a la enfermedad causada por patógenos intracelulares se realizó un estudio *in vivo* en donde se formaron dos grupos de bovinos gestantes infectados con *Brucella abortus* y observaron que un grupo resistió la infección por lo que lo nombraron resistente, mientras que el otro grupo desarrolló la infección activa y por consiguiente abortaron, por lo que los consideraron como susceptibles (30). Otros investigadores (9) realizaron estudios *in vitro* para caracterizar la actividad funcional de los macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles a *Brucella abortus*, en donde tomaron macrófagos de glándula mamaria de bovinos divididos en dos grupos identificados como resistentes y susceptibles, y observaron que los macrófagos de bovinos resistentes presentaban un incremento significativo en la actividad oxidativa y bacteriostática contra *Brucella abortus* que los macrófagos de los bovinos susceptibles. Lo mismo describen otros autores (10) sobre macrófagos de una gran proporción de bovinos naturalmente resistentes que controlaron mejor la replicación intracelular de *Brucella abortus* que los macrófagos de bovinos susceptibles. Hay otros autores que analizaron los mecanismos de adhesión de patógenos intracelulares como *Brucella abortus* en bovinos caracterizados como resistentes o susceptibles y refieren que existen diferencias demostrables en el mecanismo de adhesión de *Brucella abortus* a los macrófagos de los bovinos genéticamente resistentes o susceptibles durante la infección de dicho microorganismo (11). Finalmente se estableció en 1995 (12) un ensayo

denominado “Ensayo microbicida” para analizar la actividad bactericida de los macrófagos de bovinos resistentes a brucelosis, pero que permite hacer una correlación *in vitro* del fenotipo de resistencia de los macrófagos hacia patógenos intracelulares tales como *Mycobacterium bovis BCG*, *Salmonella dublin* y *Salmonella typhimurium*. En este estudio se emplearon macrófagos de bovinos obtenidos de sangre periférica de animales previamente caracterizados como resistentes o susceptibles a *Brucella abortus* basados en una infección *in vivo*. Como resultado obtuvieron un valor del 65% para la sobrevivencia bacteriana en el caso de *Mycobacterium bovis BCG*, el cual tuvo un alto grado de correlación con el número de bovinos designados como resistentes, razón por la cual este valor fue considerado el punto de corte para designar a un animal como susceptible o resistente, así como, un marcador fenotípico de resistencia natural hacia dicho patógeno intracelular. Con base en lo anterior, se puede considerar que diferencias en el funcionamiento de los macrófagos puede ser un factor responsable de resistencia natural a la infección por patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* en ganado bovino.

En este estudio se analizaron los niveles de producción de IFN $\gamma$  y su asociación con la resistencia natural a la tuberculosis bovina identificada mediante los ensayos microbicidas en bovinos tuberculosos infectados de manera natural.



#### **IV. Hipótesis.**

**La producción de IFN $\gamma$  por bovinos tuberculosos es directamente proporcional al grado de susceptibilidad a la tuberculosis bovina.**

#### **V. Objetivos.**

##### **Objetivo general:**

Determinar la asociación entre la producción de IFN $\gamma$  y la resistencia natural que presenta el hospedador a *Mycobacterium bovis*.

##### **Objetivos específicos:**

- 1- Identificar bovinos positivos a la infección por *Mycobacterium bovis* (bovinos tuberculosos) mediante la prueba de la tuberculina y PCR de exudados nasales.
- 2- Medir la producción de IFN $\gamma$  de los bovinos tuberculosos mediante Bovigam®.
- 3- Caracterizar fenotípicamente a los bovinos tuberculosos, según su grado de susceptibilidad a *Mycobacterium bovis* mediante ensayos microbicidas.
- 4- Determinar la asociación existente entre la resistencia natural a *Mycobacterium bovis* con la producción de IFN $\gamma$ .

## VI. Material y Métodos

**Animales.-** Se emplearon bovinos Holstein del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) que se encuentra ubicado en el kilómetro 57 de la carretera federal México – Pachuca. En dicho lugar, se lleva a cabo la explotación de tipo intensivo de bovinos especializados en la producción lechera de la raza Holstein. El CAIT tiene antecedentes clínicos, patológicos y bacteriológicos de la presencia de *Mycobacterium bovis*. De acuerdo con los dictámenes de pruebas existentes, el establo en el que se trabajó cuenta con una prevalencia aparente del 32% (estimado de acuerdo a la última tuberculinización realizada). Los bovinos empleados en éste estudio resultaron ser reactores positivos en la prueba doble comparativa de tuberculina realizada por los médicos de la cuenca lechera y cuentan con una edad aproximada de 3 a 4 años y se encuentran actualmente en producción. Fueron once animales en total identificados con un número en su arete correspondiente que sirvió para identificarlos durante el estudio de la siguiente manera:

Id. Arete/vaca	Id. Estudio
808	B1
844	B2
863	B3
870	B4
1062	B5
1066	B6
1168	B7
1170	B8
1353	B9
1500	B10
1735	B11

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

- Se colectaron los exudados nasales de todos los animales evaluados, empleando hisopos estériles sumergidos en 2 ml de PBS 1x estéril. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, se centrifugaron a 20196 x g durante 10 minutos y los sedimentos nasales se mantuvieron a – 20° C hasta su procesamiento. Mediante un método descrito para micobacterias (32) se extrajo el ADN de los sedimentos, se homogeneizó con 400 µl de TE (100 mM tris – HCl, 10 mM EDTA pH8), con 50 µl de lizosima (10 mg/ml) (SIGMA – Aldrich, USA) y se incubó por 16 horas a 37° C. Posteriormente se agregaron 75 µl de SDS al 10% y 50 µl de proteinasa K (1mg/ml) (SIGMA – Aldrich, USA) y se incubó 20 minutos a 65°C. Se agregaron 100 µl de NaCl 5 M y, posteriormente, 100 µl de una solución de NaCl 5 M con 5% de N – cetyl – N, N, N – trimetyl bromuro de amonio (CTAB) (SIGMA – Aldrich, USA) y se incubó 10 minutos a 65°C. El ADN se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (SIGMA – Aldrich, USA). El ADN se precipitó con 0.5 volúmenes de isopropanol absoluto (SIGMA – Aldrich, USA) y se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas (GIBCO, Auckland, N.Z.) La concentración y pureza del ADN se evaluó por espectrometría (D.O. a 260/280 nm) utilizando un espectofotómetro tipo Nanodrop (ND - 1000 Spectrophotometer, USA). Se utilizó un protocolo de PCR anidado para la amplificación de un segmento del gen *mpb70* (33). El PCR simple se realizó mediante la amplificación de un producto de 372 pb

del gen *mpb70* con los iniciadores mpb70 F (5' – GAACAATCC GGAGTTGACAA – 3') y mpb70 R (5' – AGCACGCTGTCAATCA ATCATGTA – 3') empleando el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 60° C por 30 segundos y extensión a 75° C por 45 segundos, y finalmente un ciclo de 72° C por 5 minutos. Posteriormente el PCR anidado se realizó utilizando 1 µl de la reacción anterior para amplificar un producto de 208 pb del mismo gen, usando los iniciadores M22 F (5'- GCTGACGGCTGCACTGTCTGGGC – 3') y M22 R (5'- CGTTGGCCGGGCTGGTTTGGCC – 3'). En éste caso se empleó un sistema Touchdown para la amplificación del producto, debido a la amplificación de bandas inespecíficas con el protocolo propuesto. El sistema consiste en 7 ciclos iniciales a 94° C por 30 segundos y 70° C por 30 segundos, 10 ciclos con las mismas temperaturas, disminuyendo 1° C cada ciclo y 8 ciclos a 94° C por 30 segundos, 60 ° C por 30 segundos y un periodo de extensión a 72° C por 30 segundos. Para descartar la presencia de inhibidores del PCR y demostrar la integridad del ADN se realizó un PCR control con iniciadores específicos para amplificar un fragmento de 375 pb del gen *cyb*, que codifica el citocromo b del bovino, con los iniciadores cyb F (5' - CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA – 3') y cyb R (5' - GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTTCA – 3'). El protocolo de amplificación es similar al de PCR simple para *mpb70*, a excepción de la

temperatura de alineamiento que se realizó a 58° C. Los protocolos de amplificación se realizaron con el equipo Thermo – Hybaid, USA.

- Para la amplificación de los productos de PCR se tomaron 2 µl de ADN extraído de los exudados nasales juntos con la siguiente mezcla de reactivos en un volumen final de 25 µl. La siguiente tabla muestra la cantidad de reactivos que se emplearon para realizar el PCR de cada muestra:

Reactivo	PCR simple		PCR anidado	
	Concentración reacción	Volumen (µl)	Concentración reacción	Volumen (µl)
10x Buffer de la reacción	1x	2.5	1x	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1.25	1.5 mM	0.75
5 mM mezcla dNTP	200 µM	1	200 µM	1
20 µM iniciador F	0.4 µM	0.5	0.2 µM	0.25
20 µM iniciador R	0.4 µM	0.5	0.2 µM	0.25
Agua	-	17.05	-	19.05
ADN	-	2	-	1
5U/µl Taq DNA polimerasa	1 U	0.2	1 U	0.2

- Posteriormente, una alícuota de 10 µl de cada producto de amplificación se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.005%) y solución TAE (40 mM Tris – acetato, 1mM EDTA pH 8). El producto de la reacción fue visualizado utilizando un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, UK). Para determinar el tamaño de los segmentos amplificados se empleó un marcador de peso de peso molecular 100 pb (Gene Ruler 100 bp DNA ladder ready to use, Fermentas, USA).

#### Determinación de la producción de IFN $\gamma$ :

- Se colectaron 10 ml de sangre de los animales evaluados, en tubos vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante (VD Vacutainer® Sodium Heparine, USA). Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz y se procesaron dentro de las primeras 10 horas de haberse obtenido. El estímulo de los linfocitos en las muestras de sangre periférica se hizo utilizando placas para cultivo celular de 96 pozos (NUNC, Nalge International). En cada pozo se depositaron 250  $\mu$ l de sangre, las cuales se estimularon por duplicado con 17  $\mu$ l del PPD bovino y 17  $\mu$ l del PPD aviar (BIOCOR Animal Health, PRIONICS). Como control positivo se utilizó 1  $\mu$ g de Lectina de *Phytolacca americana* Pokewee (SIGMA Chemical CO. St. Louis MO, USA). Como control negativo se usó PBS 1x estéril (17  $\mu$ l). Las placas se incubaron por 16 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>. Las placas se centrifugaron a 820 x g por 20 minutos a 4° C, se recuperó el sobrenadante y se depositó en placas de 96 pozos nuevas, las cuales se almacenaron a – 20° C para la posterior evaluación de la producción de IFN $\gamma$  empleando la prueba comercial de BOVIGAM® (Pfizer Animal Health, Victoria, Australia).
- El IFN $\gamma$  liberado en los plasmas de las muestras se midió usando la prueba de diagnóstico BOVIGAM® (*Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle, Pfizer Animal Health, Victoria, Australia), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas (O.D.) de las placas de

IFN $\gamma$  se leyeron en un lector de ELISA automático (Multiskan Ascent, THERMO) utilizando el filtro de 450 nm.

- Se utilizaron los controles positivos y negativos incluidos en el kit, por duplicado en cada placa. Para la validación de la prueba se evaluaron las O.D. de los controles y se aceptó un rango de control negativo de  $\leq 0.130$  y  $\geq 0.700$  en el positivo.

Los ensayos microbicidas se realizaron con la cepa *Mycobacterium bovis* BCG.

Preparación del inóculo:

- Una vez alcanzada la fase logarítmica intermedia, el cultivo de la cepa fue cosechado. El cultivo bacteriano se centrifugó a 2500 x g por 15 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado y la pastilla resuspendida en 15 ml de CRPMI (Roswell Park Memorial Institute Culture media) con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y se centrifugó en las condiciones antes descritas por 10 min. Este procedimiento se repitió dos veces más. Del último lavado se retiró el sobrenadante, que se resuspendió en CRPMI 12% SFB. Para dispersar los agregados de bacterias, se pasó dos veces la suspensión de 15 ml de bacterias a través de una jeringa con aguja 27G x 13 mm. La suspensión obtenida se transfirió en cantidades de 1 ml a tubos con capacidad de 1.5 ml, se guardaron por 12 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente el lote del inóculo se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en un ultracongelador.

#### Extracción de monocitos de sangre periférica de bovino:

- Se empleó una jeringa de 60 ml con 8 ml de anticoagulante ACD por cada animal en cada sangrado y se realizaron tres sangrados en total por cada animal para poder realizar por triplicado cada experimento.
- La sangre se vació en tubos de 50 ml y se centrifugó a 2500 x g durante 30 min a 20° C.
- Se preparó el percoll de trabajo tomando los índices de refracción de todas las soluciones y se vaciaron 15 ml de percoll de trabajo a tubos falcon de 50 ml.
- De la sangre que se centrifugó, se colectó el plasma y el suero, y se colocó cada uno por separado en un tubo falcon de 50 ml. La capa blanca se colectó con pipeta de transferencia y se colocó en un tubo falcon de 50 ml para aforarlo a 30 ml con PBS – Citrato, se homogenizó y se pasó al tubo falcon de 50 ml que contenía el percoll de trabajo para aforar a 45 ml. Después, cada tubo se centrifugó a 2500 x g durante 30 min a 20° C.
- Después de este paso, se colectó la capa blanca y se aforó a 45 ml con PBS – Citrato y se centrifugaron los tubos 1500 x g durante 10 min a 20° C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de plasma (obtenido previamente de la sangre de cada bovino), se homogeneizaron las células y se les agregó c.b.p. 45 ml de PBS – Citrato. Este último paso se repitió dos veces más.
- Finalmente se desechó el sobrenadante y las células se suspendieron en 5 ml de medio CRPMI adicionado con 12% de suero autólogo y se pasaron



a matraces de teflón. Las células se incubaron a 37° C y 4% de CO<sub>2</sub> durante 13 días que es el tiempo en que maduraron y se pudieron emplear para el ensayo microbiciada.

#### Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del inóculo:

- Para determinar la cantidad de bacterias contenidas en 1 ml de suspensión bacteriana congelada, se retiró un tubo del congelador y se incubó por 60 min a 37° C en baño María. Posterior a esto, se colocaron 500 µl de la suspensión de bacterias en un tubo con 4500 µl de PBS (NaCl 1.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, pH 7.4, se mezclaron perfectamente y se tomaron de éste tubo 50 µl que se agregaron a otro tubo con 450 µl de PBS. Se siguió ésta serie de diluciones por 8 tubos. De cada una de las diluciones obtenidas se sembraron 100 µl, por duplicado, en placas de agar Middlebrook 7H1 con enriquecimiento OADC (Becton Dickinson BBL). Las placas inoculadas se incubaron por un periodo de 2 a 3 semanas hasta hacerse visible el crecimiento, se contó el número de colonias y se multiplicó por el factor de multiplicación correspondiente a la dilución. De ésta forma se obtuvo la concentración del inóculo. De acuerdo a la cantidad de bacterias, se calculó el factor de dilución para alcanzar una concentración de  $2 \times 10^7$  bacterias/ml, de la cual se tomaron 5 µl para infectar a  $1 \times 10^4$  macrófagos.

#### Ensayo microbicida:

- Los macrófagos de los bovinos obtenidos de cada animal se tomaron del matraz de teflón que los contenía y se colocaron en los pozos de las placas de Terasaki(Nunclon Surface TM, NUNC) a razón de 10 000 células por 5  $\mu$ l por pozo. Se realizó cada experimento por triplicado, por lo que se colocaron macrófagos de cada animal en tres pozos para ser infectados posteriormente con la micobacteria, y tres pozos más se emplearon como control negativo conteniendo solo macrófagos. Se emplearon dos placas en total, una para evaluar el tiempo 0 ( $T_0$ ), tiempo en el cual las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos, y la otra para evaluar el tiempo 1( $T_1$ ) que es el tiempo en el cual se observó el efecto que tienen los macrófagos sobre la replicación bacteriana. Las placas fueron centrifugadas a 1500 x g durante 10 min para permitir que los macrófagos se adhirieran al fondo de los pozos y, luego, se les colocó una gota de agua destilada estéril en cada esquina para favorecer la humedad dentro de estas al ser colocadas en una cámara húmeda e incubadas a 37° C y 4% de CO<sub>2</sub> durante un lapso de tiempo no mayor a 16 horas.
- El inóculo bacteriano se descongeló y se centrifugó a 3300 x g durante 10 minutos para finalmente ajustar la concentración bacteriana a 1 x 10<sup>4</sup> bacterias/ $\mu$ l.

Se retiró el agua de las esquinas de cada placa de Terasaki, así como el medio de los pozos para inmediatamente adicionar 5  $\mu$ l de la suspensión bacteriana (1 x 10<sup>4</sup>) para alcanzar una multiplicidad de infección (MOI) de

10:1. De igual manera se agregaron 5  $\mu$ l a 2 pozos sin células los cuales sirvieron como control positivo del inóculo. Las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 300 x g, posteriormente, se agregó una gota de agua destilada estéril en cada una de las esquinas de ambas placas para incubarlas a 37° C y 4% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas.

- Para verificar la concentración bacteriana del inóculo, se tomaron 5  $\mu$ l del inóculo con el que se infectaron los macrófagos y se depositaron en un tubo con 197  $\mu$ l de PBS 1X, para realizar diluciones décuples seriadas y después sembrar las diluciones 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> en cajas de petri con agar 7H11.
- Transcurridas 4 horas, que es el tiempo determinado para que los macrófagos fagociten a las bacterias, se retiró el medio de cada uno de los pozos excepto el del pozo con bacterias y se realizaron 5 lavados con 10  $\mu$ l de CRPMI a cada uno de los pozos para retirar las bacterias que no fueron fagocitadas ni adheridas a los macrófagos.
- Evaluación del tiempo 0: Para determinar el porcentaje de bacterias fagocitadas en la placa correspondiente al T<sub>0</sub>, las células fueron lisadas al incubarlas con Tween 20 (SIGMA) al 0.5 % en una cantidad de 10  $\mu$ l por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente, el contenido de cada pozo, así como 2 lavados adicionales fueron transferidos a un tubo Eppendorf con 170  $\mu$ l de PBS para obtener un volumen final de 200  $\mu$ l y se realizaron diluciones décuples seriadas para sembrar 100  $\mu$ l en placas con medio 7H11 enriquecido con 10 % OADC (Enriquecedor de medio Becton

Dickinson BBL). Las placas se incubaron durante 3 a 4 semanas a una temperatura de 37° C.

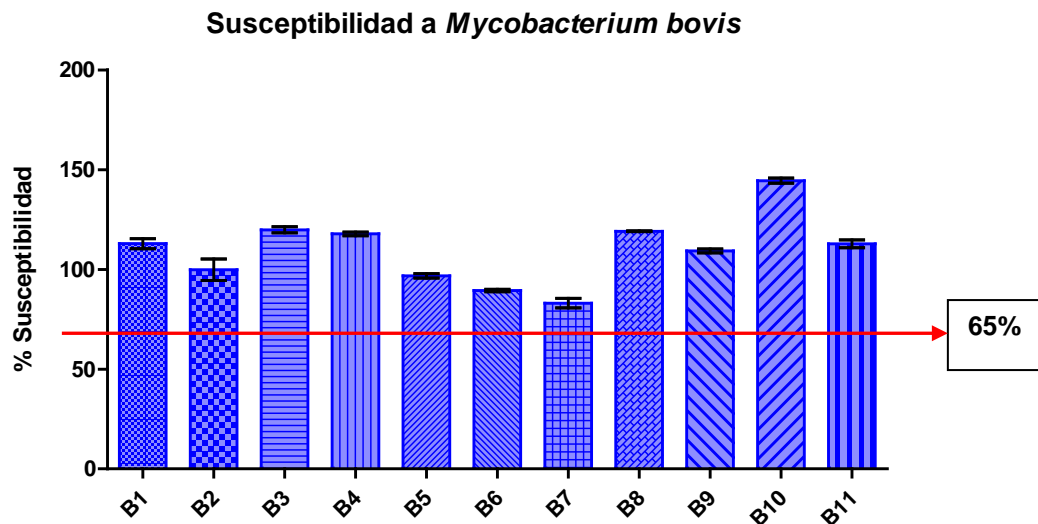
- Evaluación del tiempo 1: Para evaluar el T<sub>1</sub> se depositaron 10 µl de medio fresco en cada uno de los pozos excepto en el testigo incubando en las mismas condiciones durante 24 h. Después de incubar por 24 h, se depositó el contenido de cada pozo en tubos Eppendorf para diluciones conteniendo 160 µl de PBS 1X, después se agregaron a cada uno de los pozos con células 10 µl de Tween 20 al 0.5 % y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. El Tween 20 se retiró y depositó en tubos de dilución al igual que los 2 lavados con 10 µl de PBS 1X para obtener un volumen final de 200 µl; de las diluciones 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> de cada uno de los pozos se sembraron en placas con medio 7 H11 adicionado con 10% de OADC y se incubaron durante 3 a 4 semanas a 37° C para finalmente determinar el número de UFC.

Análisis estadístico: Cada experimento se realizó por triplicado de manera independiente y los resultados se expresaron como la media en porcentaje. Las comparaciones entre medias se evaluaron con la prueba de ANOVA para el contraste de hipótesis entre más de dos de medias y con la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey; tanto para los ensayos microbicidas como para la medición de los niveles de IFN<sub>γ</sub>. Después del análisis de varianza el valor de α se fijó en 0.05 y P = 95% para los ensayos microbicidas y se obtuvo un valor de P < 0.0001 para la producción de IFN<sub>γ</sub>.

## VIII. Resultados

Los once bovinos resultaron ser positivos a la prueba de la tuberculina (realizada previamente por parte de médicos veterinarios aprobados por la campaña nacional contra la tuberculosis bovina de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo.), en cuanto al PCR solo diez bovinos fueron positivos siendo el bovino B4 negativo.

Se realizaron los ensayos microbicidas a los once bovinos por triplicado, en donde todos demostraron ser susceptibles a *Mycobacterium bovis* (El porcentaje de susceptibilidad que presentó cada animal se muestra en la gráfica de la figura 1). Aunque todos fueron susceptibles (mostrando un porcentaje mayor al 65%) no se encontró diferencia estadística significativa entre individuos ( $P < 0.05$ ), por lo que no hay diferencia en el grado de susceptibilidad entre los bovinos.



**Figura 1.** Porcentaje de susceptibilidad a *Mycobacterium bovis* que los once bovinos obtuvieron en los ensayos microbicidas.

Se midieron los niveles de IFN $\gamma$  de cada animal mediante la prueba diagnóstica Bovigam®, también por triplicado, y se observó aparentes diferencias en la producción de IFN $\gamma$  entre cada individuo. La siguiente tabla muestra los diferentes niveles de IFN $\gamma$  de cada bovino en relación con su porcentaje de susceptibilidad a *Mycobacterium bovis*.

Bovino	% Susceptibilidad	PPD Bovino (OD)
B1	112.88	0.947
B2	99.76	0.341
B3	119.83	0.392
B4	117.77	0.332
B5	96.76	0.19
B6	89.38	0.333
B7	83.08	0.141
B8	119.09	0.17
B9	109.25	1.059
B10	144.47	0.201
B11	112.84	0.213

PPD Bovino = niveles de IFN $\gamma$  de cada animal. (OD = densidades ópticas).

Se tomaron los valores de IFN $\gamma$  de cada animal y se graficaron para poder comparar los resultados. En la gráfica de la figura 2, se comparan los diferentes niveles de IFN $\gamma$  y se puede observar que hay grandes variaciones aparentes en la producción de IFN $\gamma$  entre individuos. Pero, una vez más, no hubo diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los niveles de producción de IFN $\gamma$  entre cada animal.

## Producción de IFN $\gamma$

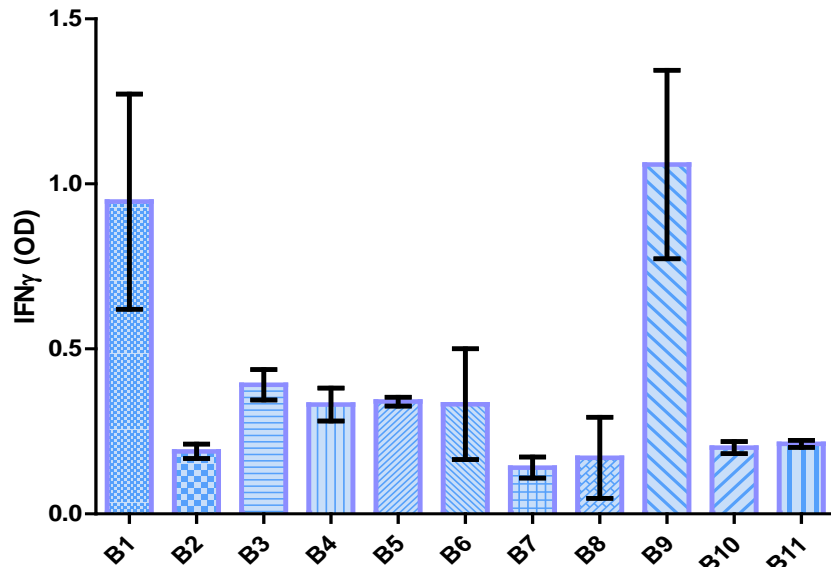


Figura 2. La gráfica muestra los diferentes niveles de IFN $\gamma$  que se obtuvieron de cada bovino mediante la prueba de Bovigam.

Todos los bovinos estudiados resultaron ser susceptibles a *Mycobacterium bovis*, aunque sin diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre individuos; de igual forma, tampoco hubo diferencia estadística significativa en cuanto a la producción de IFN $\gamma$ ; lo que podría sugerir que no hay relación entre la producción de IFN $\gamma$  y el grado de susceptibilidad a *Mycobacterium bovis*.

## IX. Discusión

En éste estudio se evaluó la relación entre la susceptibilidad de los bovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium bovis* y la producción de IFN $\gamma$  que éstos mostraron mediante la prueba diagnóstica llamada Bovigam®. Los resultados obtenidos en los ensayos microbicidas revelaron que todos los

animales analizados fueron susceptibles a *Mycobacterium bovis*, pues los macrófagos de cada individuo permitieron la proliferación de la micobacteria incluso más allá del 65%, mostrando menor control intracelular del patógeno. Esto es similar a un estudio realizado (34) en donde emplearon macrófagos de bovinos, previamente caracterizados como resistentes y susceptibles a *Mycobacterium bovis* mediante ensayos microbicidas, para estudiar el control del crecimiento intracelular de 18 cepas distintas de *Mycobacterium bovis* (incluyendo *Mycobacterium bovis* BCG); entre ellas algunas eran de campo, patógenas, aisladas de lesiones de un bovino tuberculoso, y observaron grandes diferencias en la supervivencia intracelular que atribuyeron a variabilidades genéticas que pudieran presentarse en cada cepa de campo.

Los resultados de la evaluación de los ensayos microbicidas mostraron una correlacionaron negativa con la producción de IFN $\gamma$ , como se demostró mediante los análisis estadísticos de varianza y de correlación.

En cuanto a la producción de IFN $\gamma$ , existen diferentes estudios que explican de manera detallada la interacción de citocinas de tipo Th1 y Th2 durante la respuesta inmunológica de los bovinos, humanos y ratones a las infecciones por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* (35). En algunos de ellos, se discute el papel exacto que juegan las citocinas Th1 y Th2 durante la infección por *Mycobacterium bovis*. En el presente estudio, se obtuvieron diferentes niveles de producción de IFN $\gamma$  de cada bovino, sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa entre los animales; por lo que se puede sugerir que la susceptibilidad



a *Mycobacterium bovis* no tiene relación directa con la producción de IFN $\gamma$ , además, si se considera que ésta última es la principal citocina de la respuesta Th1 en contra de la micobacteria, ésta debe estar siendo producida en grandes cantidad desde el inicio de dicha etapa de la respuesta inmune adaptativa ante la infección por *Mycobacterium bovis* (16 y 35), pero al haber empleado bovinos tuberculosos infectados de manera natural se tiene la dificultad de no conocer en qué etapa de la infección se encuentran dichos animales, por lo que también se desconoce el tiempo que lleva la respuesta inmune actuando sobre la infección y, por ende, no se puede considerar que la respuesta inmune tipo Th1 sea exacerbada en un bovino con respecto de otro; además de que no se contó con bovinos fenotípicamente resistentes a *Mycobacterium bovis* con los que se pudieran comparar sus niveles de IFN $\gamma$ , pues el tamaño de la muestra sobre la cual se trabajó el estudio fue muy pequeña (once animales), debido a la disponibilidad de animales, y se reporta en estudios previos (12) que existe alrededor del 18% de probabilidad de poder encontrar animales resistentes a *Mycobacterium bovis* en un hato. No obstante, se puede plantear la hipótesis de que en los bovinos susceptibles la respuesta Th1 no sea suficiente para contener a la micobacteria y entonces la respuesta continúe hasta provocar daños severos a los tejidos del propio hospedador, lo que no solo incrementaría la severidad de la enfermedad sino también explicaría los altos niveles de IFN $\gamma$  que se pueden observar en éstos animales, como sucedió en un estudio reciente (15) en el cuál infectaron bovinos de raza Holstein con *Mycobacterium bovis* BCG y observaron

que tanto *in vivo* como *in vitro* los bovinos con mayor número de lesiones severas fueron aquellos que presentaron altos niveles de óxido nítrico, TNF  $\alpha$  e IFN $\gamma$ .

Lo mismo se observó en otros estudios (17, 18 y 20) en donde altos niveles de IFN $\gamma$  incrementaron la actividad de linfocitos TCD8, células dendríticas y la quimiocina CCL2, lo que ocasionó mayor grado de severidad en las lesiones e incluso que se desarrollara lo que se conoce como “tuberculosis miliar” en pacientes humanos y en modelo murino. Hay otros autores (20) que concuerdan con ésta hipótesis, pues observan que en granulomas agudos o con poco tiempo de formación hay incremento de la molécula principal de histocompatibilidad tipo II (MHCII) y de IFN $\gamma$ , pero en el caso de granulomas con mayor tiempo de formación, disminuye la expresión de dichos elementos, lo que origina un descenso en la producción y actividad del IFN $\gamma$  suceso importante que aprovecha la micobacteria para sobrevivir dentro del granuloma y así poder seguir replicándose y diseminándose en los demás órganos del hospedador. Por otro lado, se sabe que para contener a la micobacteria se necesita una respuesta inmune Th1 eficaz que pueda frenar y destruir al agente patógeno para después permitir que se detenga la producción de citocinas proinflamatorias dando lugar a las citocinas antiinflamatorias que lleven a la regeneración de los tejidos y así se recupere la homeostasis en el hospedador, en lo que se conoce como respuesta inmune Th2, en donde se esperaría encontrar menos IFN $\gamma$  y más citocinas como la Interleucina 4 (IL – 4) y la Interleucina 10 (IL – 10)(21). Por ejemplo, se tiene la activación alterna de los macrófagos, analizada en un estudio previo durante la infección por

*Mycobacterium bovis* a macrófagos de bovinos previamente caracterizados como resistentes y susceptibles a dicha micobacteria (36) en la cual se observó que la IL – 4 incrementó la fagocitosis de los macrófagos, disminuyendo la expresión de genes de citocinas proinflamatorias Th1 como el IFN $\gamma$ , principalmente en los macrófagos de los bovinos resistentes. También se ha visto en otros estudios (23 y 24) que la IL – 10 juega un papel muy importante en cuanto a la efectividad de la respuesta inmune contra *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*, tanto en humanos como en murinos y bovinos, pues la IL – 10 producida por células Th2 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF  $\alpha$ , IL – 2 y particularmente IFN $\gamma$ , lo que suprime la respuesta Th1, teniendo como objetivo ser un mecanismo regulador de la respuesta Th2. Pero su interacción con citocinas como la TGF  $\beta$  suprime la respuesta inmune contra las micobacterias e inhibe la función de los macrófagos lo que favorece el crecimiento intracelular de las micobacterias, sugiriendo que “una secreción inapropiada de IL – 10 y TGF $\beta$ , así como la inhibición de la apoptosis en macrófagos infectados puede llevar a una falla en la adecuada respuesta inmune contra las micobacterias”.

Hay estudios (23) que han hecho sobre resistencia y susceptibilidad hacia organismos patógenos intracelulares en los que participan tanto el IFN $\gamma$  como la IL – 10 que pudieran traspolarse a lo que sucede con *Mycobacterium bovis* en bovinos, por ejemplo en “ratones susceptibles a la enfermedad de Lyme” (*Borrelia burgdorferi*), la producción de IFN $\gamma$  fue mayor y menos controlada por la IL – 10, a diferencia de “los ratones resistentes”. Lo que sugiere que la producción de IL – 10

y la sensibilidad o capacidad de ésta para regular la producción de IFN $\gamma$  durante la infección por *Borrelia burgdorferi* puede determinar la susceptibilidad a la “enfermedad de Lyme” (22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28).

El IFN $\gamma$  es la principal citocina Th1 que desencadena la respuesta inmune de tipo celular por parte del hospedador en contra de *Mycobacterium bovis*, por lo que se espera que se encuentre en altas cantidades en bovinos tuberculosos infectados de manera natural durante etapas tempranas de la respuesta inmune adaptativa. No obstante, para poder llevar un mejor seguimiento de un estudio más detallado que permita conocer el comportamiento de dicha citocina durante la infección, sería mejor contar con animales que se infecten de manera controlada para así poder realizar diferentes mediciones de IFN $\gamma$  a diferentes tiempos, asegurando que se conozca con certeza el tiempo que lleva actuando ésta citocina en la respuesta inmune del hospedador, ya sea al inicio o al final de dicho proceso. También se requiere de animales que sean caracterizados como resistentes para poder comparar la actividad de la citocina en cuestión pero en animales que se considera son capaces de controlar la infección por parte de la micobacteria. También sería de gran ayuda poder realizar el seguimiento de estos animales hasta la necropsia para así hacer más estudios que arrojen mayor información de la respuesta inmune que presentan los bovinos hacia *Mycobacterium bovis*. Por ejemplo, se puede realizar histopatología de los órganos afectados para observar y comparar en qué individuos (resistentes o susceptibles) se presentan lesiones más severas; también se podrían hacer estudios de inmunohistoquímica e

inmunofluorescencia, así como citometría de flujo de los tejidos para poder estudiar las poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune y así tratar de entender mejor lo que sucede en la interacción huésped hospedador de tan compleja enfermedad.

## **X. Conclusiones**

- No hubo diferencia estadística significativa entre la susceptibilidad a *Mycobacterium bovis* y la producción de IFN $\gamma$  entre los bovinos estudiados. Esto puede sugerir que la producción de IFN $\gamma$  no tiene relación con el grado de susceptibilidad a *Mycobacterium bovis*, en bovinos tuberculosos infectados de manera natural.

## Referencias

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Control Mundial de la Tuberculosis. Informe 2010.
2. Dwight C. Hirsh, N. James MacLachlan, Richard L. Walker. Veterinary Microbiology. 2<sup>nd</sup> edition, 2004. 38: 223-233.
3. Donald McGavin M., William W. Carlton, James F. Zachary. Especial Veterinary Pathology. 3<sup>th</sup> edition. 2001. 3: 170-171.
4. Donald McGavin M., James F. Zachary. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4<sup>th</sup> edition. 2007. 9: 626-527.
5. Thomas C. J., Ronald D. H., Noval W. K. Veterinary Pathology. 6<sup>th</sup> edition. 1997. 10: 489-497.
6. Hutt FB. Genetic resistance to disease in domestic animals. New York: Comstock Publishing Associates, 1958.
7. Skamene E. Genetic regulation of host resistance to bacterial infection. Rev. Infect Disease 1983;4: S823-832.
8. Haller O, Acklin M, Staeheli P. Genetic resistance to influenza virus in wild mice. Curr Top Microbiol Immunol 1986;127:331-337.
9. Harmon BG, Adams LG, Templeton JW, Smith R 3<sup>rd</sup>. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*. Am J Vet Res 1989;50: 459-465.
10. Price RE, Templeton JW, Smith R III, Adams LG. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to

- control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. Infect Immun 1990; 58: 879-886.
11. Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. Vet Immunol Immunopathol 1994;41: 295-306.
  12. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. 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 1995;50: 55-66.
  13. Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. Vet Immunol Immunopathol 1992;34: 291-305.
  14. Gutierrez-Pabello, JA, Adams LG. Intracellular survival of *Mycobacterium bovis* in macrophages from naturally resistant and susceptible cattle to intracellular parasites. Vet. Mex 34(3):277-281, 2003.
  15. Waters W.R., Palmer M. V., Whipple D. L., Carlson M. P. y Nonnecke B. J.. Diagnostic Implication of Antigen Induced Gamma Interferon, Nitric Oxide, and Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells from *Mycobacterium bovis* infected cattle. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 10 (5): 960 – 966, 2003.
  16. Rhodes S.G., Palmer N., Graham S. P., Bianco A. E., Hewinson R. G. y Vordermeier H. M. Distinct Response Kinetics of Gama Interferon and Interleukin – 4 in Bovine Tuberculosis. 68 (9): 5393 – 5400, 2000.
  17. Hope J. C., Kwong L. S., Sopp P., Collins R. A. y Howard C. J. Dendritic Cells Induce CD4 and CD8 T Cell Responses to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* Antigens in Bacille Calmette Guérin Vaccinated and Not vaccinated Cattle. Scand. J. Immunol. 52, 285 – 291, 2000.

18. H. Zahara, Cliff M. Jacqueline, Dockrell M. Hazel, J. Bushra, I. Muhammad, A. Mussarat y H. Rabia. CCL2 Responses to *Mycobacterium tuberculosis* are Associated with Severity in Tuberculosis. *Plos one*. 4 (12), 1 – 10, 2009.
19. Palmer M. V., Waters W. R. y Thacker T. C.. Lesion Development and Immunohistochemical Changes in Granulomas from Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Pathology On Line*. 10 (1354), 6 – 863.
20. A. S. Heidi, D. H. Paul, L. JangEun, P. Jozsef, B. Peter, S. Nora, S. H. Jeffrey, F. Zsuzsanna y S. Matyas. Dendritic Cells in Chronic Mycobacterial Granulomas Restrict Local Anti – Bacterial T Cell Response in a Murine Model. *Plos one*. 5 (7), 1 – 14. 2010.
21. Waters W. Ray, Palmer Mitchell V., Thacker Tyler C., Davis William C., Coussens Paul y Estes D. Mark. Tuberculosis Immunity: Opportunities from Studies with Cattle. *Clinical and Developmental Immunology*. 20 (11), 1 – 11, 2011.
22. W. Chensue Stephen, W. Kelly, R. Jeffrey, L. Pamela, M. Kuo y L. K. Steven. Cytokine Responses during Mycobacterial and Schistosomal Antigen – Induced Pulmonary Granuloma Formation. *American Journal of Pathology*. 145 (5), 1105 – 1113, 1994.
23. H. H. Laura, M. Wes, B. Anjia, B. Brittany, D. M. James y S. Matyas. *Mycobacterium bovis* BCG induced Granuloma Formation depends on Gamma Interferon and CD40 Ligand but does not required CD28. *Infection and Immunity*. 69 (4), 2596 – 2603, 2001.
24. T. Giorgio. Regulatory Role of T cells producing both Gamma Interferon and Interleukin 10 in Persistent Infection. Laboratory for Immunological Research, Schering – Plough Research Institute. 194 (10), 53 – 57, 2001.
25. Mustafa T., Wiker H. G., Morkve O. y Sviland L.. Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non – tuberculous mycobacteria: role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response. *Clinical and Experimental Immunology*. 150, 105 – 113. 2007.



26. Jaydip G., Pontus L., Bhupender S., Fredrick B. M., Nurul M., N. S. Sailendra, D. Santanu y A. K. Leif. Sporulation in mycobacteria. PNAS, 106 (26), 10781 – 10786, 2009.
27. B. K. Linda, F. Sherry, J. M. Peter, R. Bernard y K. Gilla. TNF –  $\alpha$  Controls intracellular Mycobacterial growth by both Inducible Nitric Oxide Synthase Dependent and Inducible Nitric Oxide Synthase – Independent Pathways. The Journal of Immunology. 166, 6728 – 6734, 2001.
28. M. C. Gregory, B. Michael, G. Susanne, H. Matthias, A. C. Robert, D. Olga y N. Michael. Physiology of Mycobacteria. Advances in Microbial Physiology. 55, 81 – 104, 2009.
29. S. Kate, J. H. Paul, R. Timothy y A. H. David. Gamma Interferon: an overview of signals, mechanisms and functions. Journal of Leukocyte Biology. 75, 163 – 189, 2004.
30. Templeton J. W., Estes D. M., Price R. E., Smith III R., Adams L. G. Immunogenetics of natural resistance to bovine brucellosis in: proceedings of 4<sup>th</sup> world congress on genetics applied to livestock production. 1990, 396 – 399.
31. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), 03 – 08 – 96 NORMA Oficial Mexicana NOM – 031 – ZOO – 1995.
32. Belisle J., Sonnenberg G. Isolation of genomic DNA from Mycobacteria. In: Parish T., Stoker N. G., editors. Mycobacteria protocols. New Jersey: Humana Press; 1998. 31 – 44.
33. Serrano M. B. A., Romero T. A., Arriaga D. C., Torres R. A., Pereira S. A. L., García S. J. A., Estrada C. C. High frequency of *Mycobacterium bovis* DNA in Colostra from tuberculous cattle detected by nested PCR. Zoonosis and public health 2008. 55; 258 – 600.
34. Benitez Guzman A. Tesis: Supervivencia intracelular de cepas de *Mycobacterium bovis* aisladas de lesiones tuberculosas en macrófagos de bovino.

35. Pearl J. E., Saunders B., Ehlers S., Orme I. M., Cooper A. M. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon gamma deficient mouse. Mycobacterial Research Laboratories. Colorado State University, Fort Collins Colorado, USA. 2001; 10: 211: 43 – 50.
36. Uziel C. V. Efecto de la Resistencia natural a *Mycobacterium bovis* en la activación de los macrófagos bovinos por la vía alterna. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009; 17 – 21.