

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



6

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE  
ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES  
DE *M bovis* QUE ESTIMULEN  
LINFOCITOS T BOVINOS.

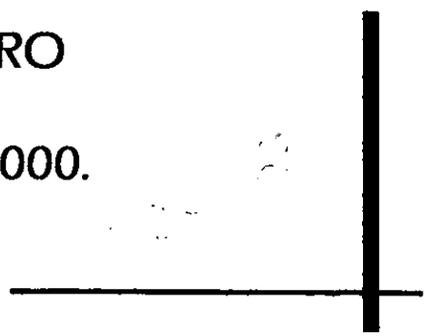
TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
PRESENTA

FERNANDO DÍAZ OTERO

CIUDAD UNIVERSITARIA 2000.





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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTIGENOS  
INMUNODOMINANTES DE *M. bovis*  
QUE ESTIMULAN LINFOCITOS T DE BOVINO.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**PRESENTA**

**FERNANDO DÍAZ OTERO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA.  
DR. FELIPE MASSO ROJAS**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 2000.**

## ÍNDICE

RESUMEN	1a
ABSTRACT	1b
1. INTRODUCCIÓN	1
2. DEFINICIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA	1
3. HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS	2
4. PRESENCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN MÉXICO	3
5. IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN SALUD PÚBLICA	4
6. IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS EN SALUD ANIMAL	5
7. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE HUMANOS A GANADO BOVINO	6
8. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO MYCOBACTERIUM	6
9. ESTRUCTURA DE LA ENVOLTURA CELULAR MYCOBACTERIANA	8
10. PATOGÉNESIS DE <i>Mycobacterium bovis</i> EN GANADO BOVINO	9
11. INMUNIDAD EN LA TUBERCULOSIS	12
12. ANTÍGENOS RELEVANTES DE <i>Mycobacterium bovis</i>	16
13. PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA INMUNIDAD HACIA LA TUBERCULOSIS	22
14. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
15. OBJETIVO GENERAL	26
16. OBJETIVOS PARTICULARES	26

### 17. MATERIAL Y MÉTODOS

I. CULTIVO DE <i>M. bovis</i> Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE FILTRADO DE CULTIVO.	27
II. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE CFPE DE <i>M. bovis</i> EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.	27
III. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS DE PUNTO ISOELÉCTRICO.	28
IV. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (BOVINOS).	28
V. PRUEBA DE INTRADERMORREACCIÓN	29
VI. AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO.	30
VII. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.	30
VIII. IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO <i>M. tuberculosis</i> POR PCR.	32
IX. ANÁLISIS DE INMUNOTRANSFERENCIA.	33
X. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVO DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS, ESTIMULADOS CON FRACCIONES SEPARADAS POR ISOELECTROENFOQUE DEL CFPE DE <i>M. bovis</i> .	33
XI. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVO DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS ESTIMULADOS CON PROTEÍNAS PURIFICADAS DEL CFPE DE <i>M. bovis</i> .	34
XII. ENSAYO DE INF- $\gamma$ .	35
XIII. DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4/ CD8.	35

## 18. RESULTADOS.

I. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE FILTRADO DE CULTIVO OBTENIDOS A LA SEXTA Y DÉCIMA SEMANA.	37
II. FRACCIONAMIENTO DEL CFPE POR PRECIPITACIONES DIFERENCIALES CON $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	37
III. RESPUESTA INMUNE HUMORAL A LOS CFPE OBTENIDOS A LA SEXTA SEMANA	38
IV. FRACCIONAMIENTO DEL CFPE POR ISOELECTROENFOQUE	39
V. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR ISOELECTROENFOQUE	40
VI. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS DE ELUCIÓN CONTINUA	42
VII. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENTES FRACCIONES DE CFPE DE <i>M. bovis</i> PARA INDUCIR LA SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS	43
VIII. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE ANIMALES, ESTIMULADOS CON VEINTE FRACCIONES SEPARADAS POR ISOELECTROENFOQUE.	46
IX. EVALUACIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE ANIMALES CON DIFERENTE GRADO DE TUBERCULOSIS BOVINA	47
X. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE BOVINOS PPD POSITIVOS Y PPD NEGATIVOS CON LAS PROTEÍNAS MPB70 Y Rv-1174c DE <i>M. bovis</i>	50
XI. RELACIÓN DE LINFOCITOS T CD4/CD8 EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE BOVINOS PPD POSITIVOS Y PPD NEGATIVOS ESTIMULADOS CON LAS PROTEÍNAS MPB70 Y Rv1174c DE <i>M. bovis</i> .	51
XII. EVALUACIÓN DE SIETE PROTEÍNAS PURIFICADAS EN ANIMALES PPD POSITIVOS Y PPD NEGATIVOS	53
19. DISCUSION.	55
a. Conclusiones	63
b. Inferencias	63
c. Implicaciones	63

## 20. ANEXO DE REACTIVOS

Medio de mantenimiento de <i>M. bovis</i> (Medio UTI: Lôwestein-Jensen modificado).	64
Medio de Stonebrink.	64
Medio de cultivo Dorser-Henley.	65
Desarrollo para la identificación bioquímica de micobacterias.	65
Soluciones para electroforesis SDS-PAGE	66
Amortiguadores de corrida.	67
Amortiguador para las muestras (cóctel).	67
Tinciones: Azul de Coomasie y Nitrato de Plata.	67
Reactivos de inmunotransferencia	68
Fórmula para reducir el alto contraste en tinciones negativas o positivas.	68
Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.	68
Condiciones para la separación de proteínas de <i>M. bovis</i> de acuerdo a sus puntos isoeléctricos.	69
Soluciones para lisis de glóbulos rojos de bovino.	70
Anticuerpos monoclonales de ratón para linfocitos T de bovino	70
Reactivos para la detección de IFN- $\gamma$ bovino.	70
Buffer salino de fosfatos (PBS)	71

## INDICE DE TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS

Figura 1. Situación epizootiológica de la tuberculosis bovina	3
Cuadro 1. Clasificación de las micobacterias de crecimiento lento	7
Cuadro 2. Especies micobacterianas y animales que afectan	7
Figura 2. Instalaciones del rancho de la Facultad de Estudios Superiores UNAM	29
Figura 3. Observación de micobacterias por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen	30
Figura 4. Lesiones anatomopatológicas en un animal tuberculoso (granulomas tipo I y III)	31
Figura 5. Linfadenitis granulomatosa tipo I	31
Figura 6. Linfadenitis granulomatosa tipo II	31
Figura 7. Linfadenitis granulomatosa tipo III	32
Figura 8. Observación microscópica de linfocitos T BoCD4	36
Figura 9. Electroforesis de los CFPE de <i>M. bovis</i> de la sexta y décima semana de cultivo en SDS-PAGE	37
Figura 10. Análisis electroforético de los CFPE obtenidos por precipitación secuencial	38
Figura 11. Análisis de inmunotransferencia hacia las proteínas del CFPE de un animal tuberculoso	39
Figura 12. Análisis de inmunotransferencia hacia las proteínas del CFPE de un animal PPD negativo	39
Figura 13. Separación mediante isoelectroenfoque del CFPE de <i>M. bovis</i> , empleando un gradiente de pH de 2.5-8.0	40
Figura 14. Separación mediante isoelectroenfoque del CFPE de <i>M. bovis</i> , empleando un gradiente de pH de 3.0-10.0	41
Figura 15. Aislamiento de tres proteínas de 19 kDa por refraccionamiento	42
Figura 16. Aislamiento de siete proteínas obtenidas por electroforesis de elución continua.	43
Cuadro 3. Selección de animales de experimentación	43
Gráfica 1. Secreción de IFN- $\gamma$ en cultivos de células de animales con alta reactividad al PPD, en presencia de 11 fracciones del CFPE de <i>M. bovis</i> .	44
Gráfica 2. Secreción de IFN- $\gamma$ en cultivos de células de animales con baja reactividad al PPD, en presencia de 11 fracciones del CFPE de <i>M. bovis</i> .	44
Gráfica 3. Secreción de IFN- $\gamma$ en cultivos de células de animales negativos al PPD, en presencia de 11 fracciones del CFPE de <i>M. bovis</i> .	45
Cuadro 4. Antecedentes de animales	46
Figura 17. Productos de amplificación de la proteína MPB70 del complejo <i>M. tuberculosis</i>	46
Gráfica 4. Secreción de IFN- $\gamma$ en animales con diferente respuesta al PPD bovino, en presencia de las veinte fracciones separadas por isoelectroenfoque	47
Gráfica 5. Evaluación de IFN- $\gamma$ en células de animales con diferente grado de tuberculosis hacia el PPD bovino, PPD aviar y Con-A.	48
Gráfica 6. Producción de IFN- $\gamma$ en células de animales con diferente grado de tuberculosis hacia las veinte fracciones separadas por isoelectroenfoque	49
Gráfica 7. Secreción de IFN- $\gamma$ en células de animales PPD positivos y PPD negativos en presencia de dos proteínas de 19 kDa de <i>M. bovis</i> .	50
Gráfica 8. Variación en la relación linfocitos T CD4/CD8 de animales PPD positivos y PPD negativos	51
Gráfica 9. Respuesta intradérmica a la tuberculina bovina y aviar en animales seleccionados	52
Gráfica 10. Respuesta de hipersensibilidad tardía a siete proteínas de <i>M. bovis</i> en animales PPD positivos y PPD negativos	53



## RESUMEN

*Mycobacterium bovis* es el principal microorganismo involucrado en la tuberculosis bovina (TB), enfermedad infectocontagiosa crónica que guarda gran importancia por el riesgo que representa para la salud humana y por los efectos negativos que produce en la ganadería nacional. La incidencia de la enfermedad varía con el tipo de explotación al que son sometidos los animales y con las diferentes zonas geográficas de nuestro país. La investigación en el área tiene como finalidad lograr reducir la incidencia, aplicando eficientes programas de control que permitan la identificación de los animales tuberculosos, mediante pruebas de diagnóstico altamente sensibles y específicas, junto con el establecimiento de medidas profilácticas adecuadas. Para alcanzar estas metas es indispensable conocer cuáles son los componentes micobacterianos capaces de inducir una inmunidad celular específica, dirigida principalmente por células T CD4 productoras de IFN- $\gamma$ , mediador clave en la activación del macrófago, célula con elevada capacidad fagocítica y micobactericida. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  de diferentes fracciones separadas por isoelectroenfoque de un extracto proteico del filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis*; así como de varias proteínas purificadas de algunas de estas fracciones en animales PPD positivos y PPD negativos. Para tal efecto se cultivo la cepa de *M. bovis* AN5 en medio sintético, dando seguimiento a la cantidad y número de proteínas excretadas en las diferentes semanas de cultivo mediante análisis electroforético. De este modo, se estableció que en la sexta semana de cultivo y empleando una saturación final del 80 % de sulfato de amonio hay una mayor recuperación de las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo. Los CFPE así obtenidos fueron utilizados para realizar estudios de inmunotransferencias y separación de proteínas por isoelectroenfoque. El análisis de las fracciones del CFPE separadas por isoelectroenfoque, mostró numerosas bandas proteicas comprendidas entre los 14 y 75 kDa, la mayoría de ellas distribuidas en un rango de pH de 5 a 6. Las fracciones se emplearon para estimular células de animales con diferente grado de reactividad a la tuberculina. Se observó que los niveles de IFN- $\gamma$  producidos están relacionados directamente con la reactividad que mostraban los animales, y que la producción de la citocina se favorece con la estimulación de fracciones que contienen proteínas con punto isoeléctrico ácido. Por otro lado, considerando la presencia y grado de lesiones que presentaban los animales, además de su grado de reactividad a la prueba intradérmica de la tuberculina, se observó un decremento progresivo en la capacidad de producción del IFN- $\gamma$  de las células de los animales conforme evoluciona la enfermedad. Esta tendencia se observó no solo con los antígenos micobacterianos, sino también con el mitógeno Con-A. Los índices más bajos de estimulación, se observaron en los cultivos de animales anérgicos, indicando la disfuncionalidad de las células de estos animales. Debido a que, la respuesta de producción de la citocina se ve favorecida con las proteínas ácidas; se evaluó la capacidad de dos proteínas purificadas de 19 kDa, una de ellas homóloga a la MPB70 y otra homóloga a la proteína Rv-1174c de *M. tuberculosis*. Ambas proteínas favorecieron la secreción de IFN- $\gamma$  en animales PPD positivos. También se evaluó la capacidad de otras siete proteínas purificadas para inducir una respuesta de hipersensibilidad tardía, así como la producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de animales reactivos. La respuesta fue heterogénea para estos animales, mientras que algunos respondieron fuertemente a los diferentes antígenos otros no exhiben ningún tipo de reactividad. Los resultados observados tanto en análisis de inmunotransferencia, como en los ensayos de estimulación *in vitro* con las diferentes fracciones o proteínas purificadas, indican variabilidad en la capacidad de respuesta de los animales la cual guarda relación con el

número de exposiciones y estado de enfermedad que presentan los animales. La variación se refleja principalmente hacia antígenos individuales más que a mezclas antigénicas. Sin embargo, la información que se obtiene al evaluar los antígenos individualmente permite determinar su participación en el desarrollo de una inmunidad protectora o en la inmunopatología de la enfermedad.

## ABSTRACT

*Mycobacterium bovis* is the main microorganism involved in bovine tuberculosis (TB) a chronic, infectious disease of great importance due to the risk it represents for human health and the negative effects on national livestock. Frequency of the disease varies with the geographical areas and the type of exploitation. Research on this area is aimed to decrease this frequency by applying efficient control methods based on identification of infected animals, using highly specific and sensitive diagnosis tests, together with adequate prophylactic actions. In order to achieve these goals it is essential to know which are the micobacteria components capable of inducing a specific cellular immunity, directed mainly by CD4 T cells which produce IFN $\gamma$ , a key component in activation of macrophages, cells that have a high phagocytic and mycobactericidal activity. The objective of the present work was to evaluate the ability of protein fractions from a *M. bovis* culture filtrate, as well as purified proteins, separated by isoelectric-focusing, to induce secretion of IFN $\gamma$  in cells from PPD positive and PPD negative animals. For this, *M. bovis* AN5 was cultured in synthetic medium and the number and concentration of peptides was followed by SDS-PAGE analysis. It was demonstrated that during the 6th week of culture and using 80% final concentration of ammonium sulphate gave higher yield of proteins recovered from the supernatant. These culture filtrates were then used for western blot analysis and purification of proteins by isoelectric-focusing. Analysis of culture filtrates by isoelectrofocusing showed numerous bands with MW from 14 to 75 kDa, most of them in a range of pH between 5 and 6. The fractions obtained were used to stimulate cells from animals that showed different response to PPD. It was observed that production of IFN $\gamma$  was directly related with reactivity to PPD in these animals and higher stimulation was achieved using acidic protein fractions. On the other hand, when the presence and magnitude of lesions were also considered, it seemed that there was an increase in production of this cytokine with more advanced stages of the disease. However, when stimulation index were determined, a progressive decrease was observed with the evolution of the disease. This was observed not only with micobacteria antigens but also with the mitogen Con-A. The lowest index was observed with anergic animals, suggesting dysfunction of cells from these animals. Since production of IFN- $\gamma$  was favored by acidic proteins, the capacity of two purified proteins, a 19 kDa component homologous to MPB70 and another hypothetic protein from *M. tuberculosis* was tested. Both proteins favored the secretion of IFN- $\gamma$  in PPD positive animals. The capacity of other 7 purified proteins to induce delayed hypersensitivity, as well as IFN- $\gamma$  production, was also evaluated in PPD positive animals. The response was heterogeneous, while some gave strong reactivity with these antigens, other did not show any response. Results in Western blot analysis and *in vitro* stimulation with different protein fractions indicated variability in the ability to respond these animals which is related with the number of exposures and the stage of the disease. This variation is observed more with individual antigens rather than with antigenic mixtures. The information obtained evaluating individual antigens allows determining their participation in the development of a protective immune response or in the immunopathogenesis of the disease.

# 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina fue descrita por primera vez en el siglo XIV DC, al Norte de Italia por Columella; pero no fue hasta que Robert Koch descubrió el bacilo de la tuberculosis en 1882, que se conoció más acerca de los microorganismos causantes de la enfermedad, tanto en el humano como en animales. Desde entonces, se han realizado grandes avances en el conocimiento de la biología de los microorganismos *Mycobacterium bovis* y *M. tuberculosis*, agentes etiológicos de la tuberculosis bovina y humana respectivamente. Lo que ha dado como resultado el mejoramiento en las técnicas de diagnóstico, prevención y control de la enfermedad. La tuberculosis ha acompañado al hombre desde el principio de su historia, se ha considerado que alrededor del 8 % de tuberculosis en humanos es causada por *M. bovis*, teniendo su origen a partir de animales enfermos o productos contaminados por *M. bovis* (1).

El establecimiento de programas de control de la tuberculosis bovina, con base en pruebas de diagnóstico confiables y en el sacrificio de animales reactivos a la tuberculina, ha permitido eliminar casi por completo la enfermedad en países con baja incidencia, dentro de las cuales invariablemente se encuentran los países del primer mundo. Sin embargo, el control de la enfermedad no se logra fácilmente en países con alta incidencia, debido a factores económicos, sociales y culturales, que limitan llevar a cabo eficientes programas de control; aunado a esta situación, hay que considerar la resistencia adquirida por la bacteria hacia las drogas y la presencia en los hatos de animales anérgicos, que diseminan la bacteria e infectan animales susceptibles; además, la presencia de esta enfermedad es silenciosa en muchos países del mundo. Estudios recientes sobre infección por tuberculosis en México, permiten suponer que se trata de una enfermedad de alta incidencia y posiblemente *in crescendo*. Ahora, es bien conocido que los animales de vida salvaje son reservorios y juegan un papel importante en la diseminación de *M. bovis* al ganado, razones por las cuales, la erradicación de la enfermedad se complica bajo estas circunstancias. En los últimos años la tuberculosis bovina ha ganado gran importancia en el ámbito mundial y los estudios que se hacen en este campo, están encaminados al conocimiento de la patogénesis, bacteriología, epidemiología, implicaciones zoonóticas, importancia de los reservorios de la enfermedad, la bioquímica y la biología molecular de *M. bovis*, así como en la identificación y caracterización de antígenos importantes del complejo tuberculosis para el diagnóstico oportuno.

## 2. DEFINICIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA

La tuberculosis bovina se caracteriza por ser una enfermedad infecto-contagiosa, crónica y progresiva de distribución mundial, producida principalmente por *M. bovis*, afecta tanto al hombre como a los animales, sin embargo en raras ocasiones *M. tuberculosis* y *M. africanum*, pueden producir problemas de tuberculosis en el bovino (2). La tuberculosis bovina producida por *M. bovis*, es la enfermedad más importante del ganado vacuno, que ha estado presente desde los tiempos más remotos de su domesticación. Es una enfermedad que guarda una estrecha relación con el desarrollo intensivo de la zootecnia. La especie más susceptible a la infección por *M. bovis* es el bovino, sin embargo esta bacteria no presenta especificidad de hospederos, razón por la que los animales salvajes constituyen un importante reservorio de la infección. El tipo de explotación y condiciones de alojamiento a las que son sometidos los animales, son factores que pueden favorecer la presentación de la

# 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina fue descrita por primera vez en el siglo XIV DC, al Norte de Italia por Columella; pero no fue hasta que Robert Koch descubrió el bacilo de la tuberculosis en 1882, que se conoció más acerca de los microorganismos causantes de la enfermedad, tanto en el humano como en animales. Desde entonces, se han realizado grandes avances en el conocimiento de la biología de los microorganismos *Mycobacterium bovis* y *M. tuberculosis*, agentes etiológicos de la tuberculosis bovina y humana respectivamente. Lo que ha dado como resultado el mejoramiento en las técnicas de diagnóstico, prevención y control de la enfermedad. La tuberculosis ha acompañado al hombre desde el principio de su historia, se ha considerado que alrededor del 8 % de tuberculosis en humanos es causada por *M. bovis*, teniendo su origen a partir de animales enfermos o productos contaminados por *M. bovis* (1).

El establecimiento de programas de control de la tuberculosis bovina, con base en pruebas de diagnóstico confiables y en el sacrificio de animales reactivos a la tuberculina, ha permitido eliminar casi por completo la enfermedad en países con baja incidencia, dentro de los cuales invariablemente se encuentran los países del primer mundo. Sin embargo, el control de la enfermedad no se logra fácilmente en países con alta incidencia, debido a factores económicos, sociales y culturales, que limitan llevar a cabo eficientes programas de control; aunado a esta situación, hay que considerar la resistencia adquirida por la bacteria hacia las drogas y la presencia en los hatos de animales anérgicos, que diseminan la bacteria e infectan animales susceptibles; además, la presencia de esta enfermedad es silenciosa en muchos países del mundo. Estudios recientes sobre infección por tuberculosis en México, permiten suponer que se trata de una enfermedad de alta incidencia y posiblemente *in crescendo*. Ahora, es bien conocido que los animales de vida salvaje son reservorios y juegan un papel importante en la diseminación de *M. bovis* al ganado, razones por las cuales, la erradicación de la enfermedad se complica bajo estas circunstancias. En los últimos años la tuberculosis bovina ha ganado gran importancia en el ámbito mundial y los estudios que se hacen en este campo, están encaminados al conocimiento de la patogénesis, bacteriología, epidemiología, implicaciones zoonóticas, importancia de los reservorios de la enfermedad, la bioquímica y la biología molecular de *M. bovis*, **así como en la identificación y caracterización de antígenos importantes del complejo tuberculosis para el diagnóstico oportuno.**

## 2. DEFINICIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA

La tuberculosis bovina se caracteriza por ser una enfermedad infecto-contagiosa, crónica y progresiva de distribución mundial, producida principalmente por *M. bovis*, afecta tanto al hombre como a los animales, sin embargo en raras ocasiones *M. tuberculosis* y *M. africanum*, pueden producir problemas de tuberculosis en el bovino (2). La tuberculosis bovina producida por *M. bovis*, es la enfermedad más importante del ganado vacuno, que ha estado presente desde los tiempos más remotos de su domesticación. Es una enfermedad que guarda una estrecha relación con el desarrollo intensivo de la zootecnia. La especie más susceptible a la infección por *M. bovis* es el bovino, sin embargo esta bacteria no presenta especificidad de hospederos, razón por la que los animales salvajes constituyen un importante reservorio de la infección. El tipo de explotación y condiciones de alojamiento a las que son sometidos los animales, son factores que pueden favorecer la presentación de la

enfermedad. Lo mismo ocurre en el ganado lechero, ya que su periodo productivo es mayor que el ganado de carne. El hacinamiento, las malas condiciones higiénicas del alojamiento, la mala alimentación, enfermedades recurrentes y una respuesta inmune deprimida, favorecen el desarrollo de la enfermedad (3, 4, 5).

### 3. HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

El primer microorganismo que se describió patógeno al humano del género *Mycobacterium* fue *M. leprae* (5). Años después la especie *tuberculosis*, perteneciente a este género, fue descubierta por Robert Koch quién observó que la bacteria se encontraba constantemente asociada a las lesiones tuberculosas. Koch logró su aislamiento en cultivo puro a partir de casos clínicos, reprodujo la enfermedad en animales de experimentación (cobayos) y recuperó el bacilo de los animales por él infectados. Esto constituyó una importante confirmación de los criterios que él había establecido para identificar al agente etiológico de una enfermedad infecciosa. Después del hallazgo de Koch y gracias al desarrollo alcanzado por la bacteriología, fue posible el descubrimiento de nuevas especie, entre las que podemos citar al *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. kansasii* y *M. bovis* (7).

A principios del siglo XIX, Rene Laenec reconoció la enfermedad bajo diferentes formas. La hipótesis de su carácter contagioso, tuvo dificultad para imponerse frente a la tesis del tumor de origen hereditario que en Francia prevaleció durante mucho tiempo. Desde 1546, H. Frascatoro, y luego un siglo después los anatomistas italianos A.M. Valsalva y G.B. Morgani, sospecharon el carácter contagioso de la tuberculosis, pero no fue hasta 1865 cuando el veterinario francés Jean Antoine Villemin, aportó la demostración de este hecho, infectando conejos con pus procedente de lesiones de humanos. Sin embargo, el descubrimiento permaneció ignorado por sus contemporáneos, incluido el médico y microbiólogo alemán Robert Koch. En 1897, C. Flügge médico alemán, sospecho que las gotas emitidas con la tos, llamadas desde entonces gotitas de Flügge, eran el origen de la contaminación. Esta vía de contagio fue confirmada en 1913 por P. Chaussé, médico francés, quien demostró que los bacilos pueden permanecer durante años en los esputos secos o en la ropa (8).

Es posible que la tuberculosis producida por *M. bovis*, haya aparecido como enfermedad endémica, primero en los animales, antes que en el humano (9). Se considera *M. tuberculosis*, microorganismo que posee la capacidad de infectar diferentes especies de primates, apareció primero en primates y posteriormente en humanos. Existen evidencias de la presencia de la enfermedad desde el año 3000 A. C. en el norte de África. En Egipto se han descubierto figurillas y pinturas, mostrando deformaciones óseas características de esta enfermedad, que datan de la era pre-dinástica de esa cultura. En los indígenas de América del Norte, también se han encontrado indicios de tuberculosis anteriores a la conquista. Recientemente se identificaron bacilos ácido-alcohol resistentes en momias de Perú, con una antigüedad de casi de 700 años DC. La incidencia de la tuberculosis en Inglaterra se incremento bruscamente en el siglo XVII, de aquí se extendió lentamente hasta la Europa Oriental. En el Oriente no se conocía la tuberculosis, hasta hace relativamente poco (1850 en las islas Hawaianas). La enfermedad era rara en la India a mediados del siglo XIX, pero su diseminación epidémica fue consecuencia del crecimiento poblacional, del arribo de comerciantes y colonos europeos provenientes de lejanos países (6). En los siglos XVIII y XIX la prevalencia de la enfermedad en el humano alcanzó su máximo, tanto en Europa Occidental como en los Estados Unidos, siendo indudablemente la principal causa de muerte en esos tiempos. Aunque la tuberculosis bovina es una enfermedad muy antigua, sus efectos sobre la producción y en salud pública, se

enfermedad. Lo mismo ocurre en el ganado lechero, ya que su periodo productivo es mayor que el ganado de carne. El hacinamiento, las malas condiciones higiénicas del alojamiento, la mala alimentación, enfermedades recurrentes y una respuesta inmune deprimida, favorecen el desarrollo de la enfermedad (3, 4, 5).

### 3. HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

El primer microorganismo que se describió patógeno al humano del género *Mycobacterium* fue *M. leprae* (5). Años después la especie *tuberculosis*, perteneciente a este género, fue descubierta por Robert Koch quién observó que la bacteria se encontraba constantemente asociada a las lesiones tuberculosas. Koch logró su aislamiento en cultivo puro a partir de casos clínicos, reprodujo la enfermedad en animales de experimentación (cobayos) y recuperó el bacilo de los animales por él infectados. Esto constituyó una importante confirmación de los criterios que él había establecido para identificar al agente etiológico de una enfermedad infecciosa. Después del hallazgo de Koch y gracias al desarrollo alcanzado por la bacteriología, fue posible el descubrimiento de nuevas especie, entre las que podemos citar al *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. kansasii* y *M. bovis* (7).

A principios del siglo XIX, Rene Laenec reconoció la enfermedad bajo diferentes formas. La hipótesis de su carácter contagioso, tuvo dificultad para imponerse frente a la tesis del tumor de origen hereditario que en Francia prevaleció durante mucho tiempo. Desde 1546, H. Frascatoro, y luego un siglo después los anatomistas italianos A.M. Valsalva y G.B. Morgani, sospecharon el carácter contagioso de la tuberculosis, pero no fue hasta 1865 cuando el veterinario francés Jean Antoine Villemin, aportó la demostración de este hecho, infectando conejos con pus procedente de lesiones de humanos. Sin embargo, el descubrimiento permaneció ignorado por sus contemporáneos, incluido el médico y microbiólogo alemán Robert Koch. En 1897, C. Flügge médico alemán, sospecho que las gotas emitidas con la tos, llamadas desde entonces gotitas de Flügge, eran el origen de la contaminación. Esta vía de contagio fue confirmada en 1913 por P. Chaussé, médico francés, quien demostró que los bacilos pueden permanecer durante años en los esputos secos o en la ropa (8).

Es posible que la tuberculosis producida por *M. bovis*, haya aparecido como enfermedad endémica, primero en los animales, antes que en el humano (9). Se considera *M. tuberculosis*, microorganismo que posee la capacidad de infectar diferentes especies de primates, apareció primero en primates y posteriormente en humanos. Existen evidencias de la presencia de la enfermedad desde el año 3000 A. C. en el norte de África. En Egipto se han descubierto figurillas y pinturas, mostrando deformaciones óseas características de esta enfermedad, que datan de la era pre-dinástica de esa cultura. En los indígenas de América del Norte, también se han encontrado indicios de tuberculosis anteriores a la conquista. Recientemente se identificaron bacilos ácido-alcohol resistentes en momias de Perú, con una antigüedad de casi de 700 años DC. La incidencia de la tuberculosis en Inglaterra se incremento bruscamente en el siglo XVII, de aquí se extendió lentamente hasta la Europa Oriental. En el Oriente no se conocía la tuberculosis, hasta hace relativamente poco (1850 en las islas Hawaianas). La enfermedad era rara en la India a mediados del siglo XIX, pero su diseminación epidémica fue consecuencia del crecimiento poblacional, del arribo de comerciantes y colonos europeos provenientes de lejanos países (6). En los siglos XVIII y XIX la prevalencia de la enfermedad en el humano alcanzó su máximo, tanto en Europa Occidental como en los Estados Unidos, siendo indudablemente la principal causa de muerte en esos tiempos. Aunque la tuberculosis bovina es una enfermedad muy antigua, sus efectos sobre la producción y en salud pública, se

pusieron de manifiesto a finales del siglo XIX y principios del XX, con el desarrollo de la industria ganadera en Europa y América (10, 11).

## 4. PRESENCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN MÉXICO

De 300 millones de cabezas que constituyen la población bovina de América Latina y el Caribe; 80 millones se localizan en ciudades donde la incidencia de infección por *M. bovis* es muy baja o casi nula, mientras que el resto de la población bovina (220 millones) se encuentra distribuida en ciudades donde la prevalencia es moderada o alta, y de donde no existe información valiosa sobre la presencia de la tuberculosis bovina. En México, tanto la ganadería lechera como la ganadería de carne muestran fuertes diferencias en la incidencia de infección por *M. bovis*. La prevalencia de tuberculosis bovina (TB) en la parte norte de México, se ha estimado en 2.1 % para ganado lechero y en un 0.1 % para ganado de carne (12). Sin embargo, en algunos puntos geográficos de la parte centro y sur de México, los valores de TB son mayores al 25 % primordialmente en ganado lechero. La presencia de esta enfermedad en hatos lecheros, constituye un riesgo potencialmente importante en salud pública, tanto por el consumo de productos no pasteurizados, como por el contacto de los trabajadores en el campo y en rastros con animales infectados (13). En 1992, México contaba con 32,731,924 cabezas de ganado bovino, de las cuales 3,433,641 (10.5%), correspondían a bovinos productores de leche y 29,298,283 (89.5%), correspondían a bovinos productores de carne. Los datos registrados más recientemente sobre la prevalencia de la TB indican un 11.1% y 2.9% para el ganado productor de leche y carne respectivamente, observando claramente un incremento importante en la enfermedad (14, 15). Por otro lado, en 1997 se tuberculinizaron un total de 4,132,793 bovinos de los cuales 1,432,437 pertenecían a ganado productor de carne; 1,440,267 a ganado productor de leche; 722,243 fueron tuberculinizados por motivo de movilización y 537,846 por exportaciones; del total de animales tuberculinizados se registraron 28,300 reactores, lo que se estima que la prevalencia hasta diciembre del año de 1998 era de 0.68% (16), estos datos muestran sesgo en la prevalencia de la enfermedad, ya que no mencionan las zonas que fueron evaluadas y corresponden únicamente a los datos globales en toda la República Mexicana.

SITUACIÓN EPIZOOTIOLÓGICA  
(TUBERCULOSIS BOVINA).



[http://www.sagar.gob.mx/users/Conasag/map\\_tub.htm](http://www.sagar.gob.mx/users/Conasag/map_tub.htm)

Fig. 1. Situación actual de la tuberculosis bovina de acuerdo la Campaña Nacional de Tuberculosis- SAGAR.

pusieron de manifiesto a finales del siglo XIX y principios del XX, con el desarrollo de la industria ganadera en Europa y América (10, 11).

## 4. PRESENCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN MÉXICO

De 300 millones de cabezas que constituyen la población bovina de América Latina y el Caribe; 80 millones se localizan en ciudades donde la incidencia de infección por *M. bovis* es muy baja o casi nula, mientras que el resto de la población bovina (220 millones) se encuentra distribuida en ciudades donde la prevalencia es moderada o alta, y de donde no existe información valiosa sobre la presencia de la tuberculosis bovina. En México, tanto la ganadería lechera como la ganadería de carne muestran fuertes diferencias en la incidencia de infección por *M. bovis*. La prevalencia de tuberculosis bovina (TB) en la parte norte de México, se ha estimado en 2.1 % para ganado lechero y en un 0.1 % para ganado de carne (12). Sin embargo, en algunos puntos geográficos de la parte centro y sur de México, los valores de TB son mayores al 25 % primordialmente en ganado lechero. La presencia de esta enfermedad en hatos lecheros, constituye un riesgo potencialmente importante en salud pública, tanto por el consumo de productos no pasteurizados, como por el contacto de los trabajadores en el campo y en rastros con animales infectados (13). En 1992, México contaba con 32,731,924 cabezas de ganado bovino, de las cuales 3,433,641 (10.5%), correspondían a bovinos productores de leche y 29,298,283 (89.5%), correspondían a bovinos productores de carne. Los datos registrados más recientemente sobre la prevalencia de la TB indican un 11.1% y 2.9% para el ganado productor de leche y carne respectivamente, observando claramente un incremento importante en la enfermedad (14, 15). Por otro lado, en 1997 se tuberculizaron un total de 4,132,793 bovinos de los cuales 1,432,437 pertenecían a ganado productor de carne; 1,440,267 a ganado productor de leche; 722,243 fueron tuberculizados por motivo de movilización y 537,846 por exportaciones; del total de animales tuberculizados se registraron 28,300 reactores, lo que se estima que la prevalencia hasta diciembre del año de 1998 era de 0.68% (16), estos datos muestran sesgo en la prevalencia de la enfermedad, ya que no mencionan las zonas que fueron evaluadas y corresponden únicamente a los datos globales en toda la República Mexicana.

SITUACIÓN EPIZOOTIOLÓGICA  
(TUBERCULOSIS BOVINA).



[http://www.sagar.gob.mx/users/Conasag/map\\_tub.htm](http://www.sagar.gob.mx/users/Conasag/map_tub.htm)

Fig. 1. Situación actual de la tuberculosis bovina de acuerdo la Campaña Nacional de Tuberculosis- SAGAR.

## 5. IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN SALUD PUBLICA

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa diseminada en el ámbito mundial, considerada una de las principales causas de muerte en el mundo, el agente etiológico más importante de esta enfermedad en el humano es *M. tuberculosis*, sin embargo existe una proporción no determinada de casos en los cuales *M. bovis* se ha encontrado involucrado. Este hecho ha propiciado que se tenga una atención especial en el control de la enfermedad en los bovinos. En países industrializados, el control de la tuberculosis en animales con programas de erradicación, conjuntamente con la pasteurización de la leche, han reducido drásticamente la incidencia de la enfermedad producida por *M. bovis*, tanto en ganado bovino como en la población humana. Desafortunadamente, esto no ocurre en países donde la tuberculosis bovina esta ampliamente diseminada, y las medidas de control no se llevan adecuadamente o se aplican de manera esporádica. La correlación directa entre la infección de *M. bovis* en ganado y la enfermedad en la población humana se encuentra bien documentada en países del primer mundo (17). La tuberculosis en humanos producida por *M. bovis*, es clínicamente indistinguible de aquella producida por *M. tuberculosis*, y muchos de los casos ocurren en personas jóvenes como resultado del consumo o manejo de leche contaminada; las formas más comunes de la enfermedad son linfadenopatias cervicales, lesiones intestinales, lesiones en la piel (lupus vulgaris) y otras formas no pulmonares que son particularmente comunes. Sin embargo, poco se sabe de la frecuencia relativa de formas de tuberculosis no pulmonares producida por *M. bovis*, en naciones en desarrollo, porque las facilidades de laboratorio son limitadas para el cultivo y tipificación de bacilos tuberculosos (18, 19).

Los efectos que sobre la producción ganadera y en salud pública tiene la tuberculosis bovina, se pusieron de manifiesto a fines del siglo XIX y principios del siglo XX, con el desarrollo de la industria ganadera en Europa y América. En los años 50's en ciudades como Alemania e Inglaterra, se encontró que cerca del 50 % del ganado lechero sacrificado en rastro, presentaba lesiones tuberculosas a la inspección post-mortem. La alimentación de niños con leche cruda proveniente de estos animales produjo más del 20 % de los casos de tuberculosis infantil debido al bacilo bovino (20).

En 1932, el 35 % de los casos de tuberculosis no pulmonar en Gran Bretaña fueron producidos por *M. bovis*. En ese entonces la tuberculosis pulmonar de origen bovino generalmente era rara. Sin embargo, después del uso de la pasteurización de la leche, la distribución anatómica de la enfermedad cambio significativamente; el pulmón se volvió el sitio predominante, después el aparato urinario, nódulos linfáticos, médula ósea y meninges (21).

A pesar de los esfuerzos realizados en el control de la enfermedad, esta ha resurgido en varios países Europeos, y en los Estados Unidos de donde se creía erradicada. Varios factores derivaron en el resurgimiento e incremento de la tuberculosis humana a nivel mundial, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha declarado a la enfermedad como un problema emergente de salud pública (22). Los factores que determinaron el recrudecimiento de esta enfermedad fueron, las infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana-I (VIH-I), la presencia de los albergues en las ciudades, la aparición de cepas multirresistentes, y una infraestructura de salud pública insuficiente. Se menciona que en este último decenio morirán 30 millones de personas por esta causa, si no se toman las medidas adecuadas para controlarla, y aparecerán 90 millones de nuevos casos. Según la OMS, aparecerá un tuberculoso por segundo; si la tendencia letal es ascendente, la cifra será de 5 millones en

el año 2050. Otros datos importantes descritos por la OMS, mencionan que más de 50 millones de personas infectadas con cepas de *M. tuberculosis* y algunos por *M. bovis*, presentarán resistencia múltiple, lo que le da el status de enfermedad de "difícil cura". Añádase a ello las dificultades del diagnóstico para identificar a los posibles reservorios, herramientas necesarias para luchar contra esta grave enfermedad, la OMS la define como **amenaza mundial** y la Organización de las Naciones Unidas (ONU) recomienda considerarla una cuestión prioritaria, e **impone que las autoridades sanitarias de los diferentes gobiernos, destinen los fondos económicos adecuados para organizar un rápido diagnóstico y un tratamiento total** (23).

La OMS estima que la mitad de la población humana en algún momento de su vida puede llegar a infectarse con *M. tuberculosis*, de los cuales 30 millones desarrollan la enfermedad y 3 millones mueren por este padecimiento anualmente (24, 25, 26). Esta enfermedad se considera un problema exclusivo de países en vías de desarrollo, debido a varios factores, dentro de los que destacan, la falta de infraestructura adecuada en lo concerniente a salud pública, la nutrición de cada individuo, la pobreza, la sobrepoblación, la contaminación, la resistencia del bacilo a los fármacos tradicionales y el mal uso de ellos (27, 28). En México al igual que en otros países subdesarrollados, la tuberculosis se encuentra ampliamente distribuida entre la población. Los factores que favorecen la diseminación de la tuberculosis, son el consumo tradicional de leche sin previa ebullición, así como el consumo de productos lácteos no pasteurizados, como dato relevante se determinó que, de los 7000 millones de litros de leche producidos en México en el año de 1992, solo el 60 % de la producción fue pasteurizada, poniendo de manifiesto el riesgo potencial, que representa los animales infectados como transmisores de esta enfermedad (29). La escasa información epidemiológica disponible, menciona que *M. bovis* es causante de entre un 6 y 30 % de los casos de tuberculosis humana en los Estados Unidos por el consumo de leche no pasteurizada (30). En México, entre los años 1991 y 1993, se presentaron más de 29,000 casos confirmados de tuberculosis humana y se considera que alrededor de un 8 % de estos casos pudieron ser causados por *M. bovis* (31). La tuberculosis en humanos por *M. bovis* contribuye importantemente en el ciclo de la tuberculosis en bovinos en el continente Africano (32).

## 6. IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS EN SALUD ANIMAL

Los factores determinantes para el inicio de los programas de control de la tuberculosis bovina, fueron su impacto en salud pública y en la economía, debido a que produce pérdidas directas, tanto en ganado lechero como en ganado de carne. La pérdida por concepto en producción de leche, se calculó entre un 10- 15 % en EE.UU. (33). En Argentina, en un estudio de casos y controles, se mostró que las pérdidas llegaban al 18 %, como consecuencias de retrasos en la primera lactación, disminución del número de lactancias, disminución de la duración de cada lactación entre un 5 y 20 % con respecto a los animales sanos (34).

En el ganado de carne la producción también disminuye, ocurriendo pérdidas directas en todo tipo de ganado. La relación beneficio costo de un programa de erradicación de tuberculosis bovina en los EE.UU., elaborada por Myers y Steele (35), mostró que el costo total del programa entre 1918 y 1966 fue de 435 millones de dólares. Si no se hubiera realizado este programa, se continuarían decomisando por tuberculosis cerca de 100,000 bovinos, por efectos del programa, los decomisos fueron disminuyendo hasta llegar en 1966 a sólo 68 animales. De esta

el año 2050. Otros datos importantes descritos por la OMS, mencionan que más de 50 millones de personas infectadas con cepas de *M. tuberculosis* y algunos por *M. bovis*, presentarán resistencia múltiple, lo que le da el status de enfermedad de "difícil cura". Añádase a ello las dificultades del diagnóstico para identificar a los posibles reservorios, herramientas necesarias para luchar contra esta grave enfermedad, la OMS la define como **amenaza mundial** y la Organización de las Naciones Unidas (ONU) recomienda considerarla una cuestión prioritaria, e **impone que las autoridades sanitarias de los diferentes gobiernos, destinen los fondos económicos adecuados para organizar un rápido diagnóstico y un tratamiento total** (23).

La OMS estima que la mitad de la población humana en algún momento de su vida puede llegar a infectarse con *M. tuberculosis*, de los cuales 30 millones desarrollan la enfermedad y 3 millones mueren por este padecimiento anualmente (24, 25, 26). Esta enfermedad se considera un problema exclusivo de países en vías de desarrollo, debido a varios factores, dentro de los que destacan, la falta de infraestructura adecuada en lo concerniente a salud pública, la nutrición de cada individuo, la pobreza, la sobrepoblación, la contaminación, la resistencia del bacilo a los fármacos tradicionales y el mal uso de ellos (27, 28). En México al igual que en otros países subdesarrollados, la tuberculosis se encuentra ampliamente distribuida entre la población. Los factores que favorecen la diseminación de la tuberculosis, son el consumo tradicional de leche sin previa ebullición, así como el consumo de productos lácteos no pasteurizados, como dato relevante se determinó que, de los 7000 millones de litros de leche producidos en México en el año de 1992, solo el 60 % de la producción fue pasteurizada, poniendo de manifiesto el riesgo potencial, que representa los animales infectados como transmisores de esta enfermedad (29). La escasa información epidemiológica disponible, menciona que *M. bovis* es causante de entre un 6 y 30 % de los casos de tuberculosis humana en los Estados Unidos por el consumo de leche no pasteurizada (30). En México, entre los años 1991 y 1993, se presentaron más de 29,000 casos confirmados de tuberculosis humana y se considera que alrededor de un 8 % de estos casos pudieron ser causados por *M. bovis* (31). La tuberculosis en humanos por *M. bovis* contribuye importantemente en el ciclo de la tuberculosis en bovinos en el continente Africano (32).

## 6. IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS EN SALUD ANIMAL

Los factores determinantes para el inicio de los programas de control de la tuberculosis bovina, fueron su impacto en salud pública y en la economía, debido a que produce pérdidas directas, tanto en ganado lechero como en ganado de carne. La pérdida por concepto en producción de leche, se calculó entre un 10 15 % en EE.UU. (33). En Argentina, en un estudio de casos y controles, se mostró que las pérdidas llegaban al 18 %, como consecuencias de retrasos en la primera lactación, disminución del número de lactancias, disminución de la duración de cada lactación entre un 5 y 20 % con respecto a los animales sanos (34).

En el ganado de carne la producción también disminuye, ocurriendo pérdidas directas en todo tipo de ganado. La relación beneficio costo de un programa de erradicación de tuberculosis bovina en los EE.UU., elaborada por Myers y Steele (35), mostró que el costo total del programa entre 1918 y 1966 fue de 435 millones de dólares. Si no se hubiera realizado este programa, se continuarían decomisando por tuberculosis cerca de 100,000 bovinos, por efectos del programa, los decomisos fueron disminuyendo hasta llegar en 1966 a sólo 68 animales. De esta

forma, el ahorro anual por menor cantidad de decomisos, fue de 150 millones de dólares, vale decir que en 3 años el programa ahorró más de lo que gastó en 49 años. En resumen, el control y la erradicación de la tuberculosis bovina traen beneficios económicos y de salud. Con el actual aumento de las exigencias sanitarias por parte de los países compradores, muy probablemente los países exportadores verán cerrarse estos mercados si no cumplen con los requerimientos establecidos (36). Por otro lado en Argentina, se estimó que las pérdidas económicas por tuberculosis bovina son cuantiosas, sumando sólo las pérdidas más directas, tales como las ocasionadas por los decomisos y las pérdidas de producción de leche, las cuales llegan a 16 millones de dólares por año (37).

## **7. TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD DE HUMANOS A GANADO BOVINO**

Las fuentes de infección de tuberculosis bovina al ganado bovino, fueron estudiada por Schliesser y sus colegas, en el Estado de Hessen en Alemania, donde la enfermedad virtualmente estaba erradicada por el año de 1961, sin embargo, las observaciones de campo señalaron que 12 personas con tuberculosis por *M. bovis*, infectaron 114 vacas de 16 establos entre 1968 y 1972. Se tiene datos de que solo un paciente con tuberculosis pulmonar abierta, infectó 48 vacas en 4 diferentes establos. Se considera, en general, que la tuberculosis transmitida por el humano hacia el ganado es de un 18 % (38). En vista de la importancia del humano como reservorio y fuente de *M. bovis* para los bovinos, se ha recomendado en algunos países que los casos de tuberculosis que presentan algunos trabajadores de establos lecheros, sean investigados y notificados a las autoridades de Salud Pública. La importancia del riesgo de transmisión de *M. bovis* de personas infectadas al ganado y probablemente a otros humanos, reside en el hecho de que este microorganismo pueda ser reintroducido en ciudades con baja prevalencia de la enfermedad, por leche proveniente de ciudades con alta prevalencia (39, 40).

La evidencia de que el ganado bovino y sus productos, son fuentes potenciales de infección de *M. bovis*, al humano, justifica la necesidad de proteger a la población mediante programas de eliminación de la enfermedad en los bovinos (41). Las campañas de control y erradicación de la tuberculosis en bovinos, se justifican plenamente por tres razones importantes; a) el gran riesgo que existe dentro de la salud humana; b) la posible prohibición de la exportación de nuestro ganado, así como todos los productos derivados lácteos; y c) la disminución en la productividad ganadera (42).

## **8. TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS DEL GÉNERO MYCOBACTERIUM**

Las micobacterias son bacilos delgados o ligeramente curvos de 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud. Aparecen como células aisladas, pero con frecuencia se encuentran en grupos pequeños y a veces en masas compactas en las que no se puede distinguir cada bacilo. Las micobacterias nombre común de las bacterias incluidas en este género, se consideran tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias, debido a

forma, el ahorro anual por menor cantidad de decomisos, fue de 150 millones de dólares, vale decir que en 3 años el programa ahorró más de lo que gastó en 49 años. En resumen, el control y la erradicación de la tuberculosis bovina traen beneficios económicos y de salud. Con el actual aumento de las exigencias sanitarias por parte de los países compradores, muy probablemente los países exportadores verán cerrarse estos mercados si no cumplen con los requerimientos establecidos (36). Por otro lado en Argentina, se estimó que las pérdidas económicas por tuberculosis bovina son cuantiosas, sumando sólo las pérdidas más directas, tales como las ocasionadas por los decomisos y las pérdidas de producción de leche, las cuales llegan a 16 millones de dólares por año (37).

## **7. TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD DE HUMANOS A GANADO BOVINO**

Las fuentes de infección de tuberculosis bovina al ganado bovino, fueron estudiada por Schliesser y sus colegas, en el Estado de Hessen en Alemania, donde la enfermedad virtualmente estaba erradicada por el año de 1961, sin embargo, las observaciones de campo señalaron que 12 personas con tuberculosis por *M. bovis*, infectaron 114 vacas de 16 establos entre 1968 y 1972. Se tiene datos de que solo un paciente con tuberculosis pulmonar abierta, infectó 48 vacas en 4 diferentes establos. Se considera, en general, que la tuberculosis transmitida por el humano hacia el ganado es de un 18 % (38). En vista de la importancia del humano como reservorio y fuente de *M. bovis* para los bovinos, se ha recomendado en algunos países que los casos de tuberculosis que presentan algunos trabajadores de establos lecheros, sean investigados y notificados a las autoridades de Salud Pública. La importancia del riesgo de transmisión de *M. bovis* de personas infectadas al ganado y probablemente a otros humanos, reside en el hecho de que este microorganismo pueda ser reintroducido en ciudades con baja prevalencia de la enfermedad, por leche proveniente de ciudades con alta prevalencia (39, 40).

La evidencia de que el ganado bovino y sus productos, son fuentes potenciales de infección de *M. bovis*, al humano, justifica la necesidad de proteger a la población mediante programas de eliminación de la enfermedad en los bovinos (41). Las campañas de control y erradicación de la tuberculosis en bovinos, se justifican plenamente por tres razones importantes; a) el gran riesgo que existe dentro de la salud humana; b) la posible prohibición de la exportación de nuestro ganado, así como todos los productos derivados lácteos; y c) la disminución en la productividad ganadera (42).

## **8. TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS DEL GÉNERO MYCOBACTERIUM**

Las micobacterias son bacilos delgados o ligeramente curvos de 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud. Aparecen como células aisladas, pero con frecuencia se encuentran en grupos pequeños y a veces en masas compactas en las que no se puede distinguir cada bacilo. Las micobacterias nombre común de las bacterias incluidas en este género, se consideran tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias, debido a

forma, el ahorro anual por menor cantidad de decomisos, fue de 150 millones de dólares, vale decir que en 3 años el programa ahorró más de lo que gastó en 49 años. En resumen, el control y la erradicación de la tuberculosis bovina traen beneficios económicos y de salud. Con el actual aumento de las exigencias sanitarias por parte de los países compradores, muy probablemente los países exportadores verán cerrarse estos mercados si no cumplen con los requerimientos establecidos (36). Por otro lado en Argentina, se estimó que las pérdidas económicas por tuberculosis bovina son cuantiosas, sumando sólo las pérdidas más directas, tales como las ocasionadas por los decomisos y las pérdidas de producción de leche, las cuales llegan a 16 millones de dólares por año (37).

## **7. TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD DE HUMANOS A GANADO BOVINO**

Las fuentes de infección de tuberculosis bovina al ganado bovino, fueron estudiada por Schliesser y sus colegas, en el Estado de Hessen en Alemania, donde la enfermedad virtualmente estaba erradicada por el año de 1961, sin embargo, las observaciones de campo señalaron que 12 personas con tuberculosis por *M. bovis*, infectaron 114 vacas de 16 establos entre 1968 y 1972. Se tiene datos de que solo un paciente con tuberculosis pulmonar abierta, infectó 48 vacas en 4 diferentes establos. Se considera, en general, que la tuberculosis transmitida por el humano hacia el ganado es de un 18 % (38). En vista de la importancia del humano como reservorio y fuente de *M. bovis* para los bovinos, se ha recomendado en algunos países que los casos de tuberculosis que presentan algunos trabajadores de establos lecheros, sean investigados y notificados a las autoridades de Salud Pública. La importancia del riesgo de transmisión de *M. bovis* de personas infectadas al ganado y probablemente a otros humanos, reside en el hecho de que este microorganismo pueda ser reintroducido en ciudades con baja prevalencia de la enfermedad, por leche proveniente de ciudades con alta prevalencia (39, 40).

La evidencia de que el ganado bovino y sus productos, son fuentes potenciales de infección de *M. bovis*, al humano, justifica la necesidad de proteger a la población mediante programas de eliminación de la enfermedad en los bovinos (41). Las campañas de control y erradicación de la tuberculosis en bovinos, se justifican plenamente por tres razones importantes; a) el gran riesgo que existe dentro de la salud humana; b) la posible prohibición de la exportación de nuestro ganado, así como todos los productos derivados lácteos; y c) la disminución en la productividad ganadera (42).

## **8. TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS DEL GÉNERO MYCOBACTERIUM**

Las micobacterias son bacilos delgados o ligeramente curvos de 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud. Aparecen como células aisladas, pero con frecuencia se encuentran en grupos pequeños y a veces en masas compactas en las que no se puede distinguir cada bacilo. Las micobacterias nombre común de las bacterias incluidas en este género, se consideran tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias, debido a

su estructura y composición química particular de la pared (43). Este género incluye más de cien especies que se dividen en tres grupos para fines de estudio: Complejo tuberculosis, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida cepa BCG), *M. africanum* y *M. microti*; Complejo *leprae*, que incluye *M. leprae* y *M. leprae-murium*; y las micobacterias atípicas (ver Cuadro I), donde se ubican todas las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores, estas pueden ser patógenas, patógenas oportunistas o saprofitas (44). Las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, se consideran aerobios estrictos y su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. La especie *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación de 10 a 15 horas, por lo que su crecimiento en medios de cultivo no se consigue hasta la 3 o 4 semanas como mínimo. Las formas saprofitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan a 22° C, producen más pigmento y son menos ácido-resistentes que las formas patógenas (45).

#### CUADRO I. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO LENTO.

COMPLEJO <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> y <i>M. microti</i>
COMPLEJO <i>M. leprae</i>	<i>M. leprae</i> y <i>M. leprae-murium</i>
COMPLEJO <i>M. avium</i> (micobacterias atípicas)	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> y <i>M. xenopi</i>

(46).

Varias de las especies del género *Mycobacterium* infectan una gran variedad de especies animales, por lo cual cobran gran importancia en Salud Animal. En el Cuadro 2, se muestran las especies micobacteriana más importantes relacionadas con sus hospederos.

#### CUADRO 2. ESPECIES MICOBACTERIANAS Y ANIMALES QUE AFECTAN.

GENERO <i>Mycobacterium</i>	ANIMALES AFECTADOS
<i>M. bovis</i>	Bovinos, borregos, perros, gatos, monos, simios, primates (hombre), cerdos, elefantes, rinocerontes, aves, venados, zorros, tapires, camellos, bisontes, llamas, elefantes marinos, zariguellas y jirafas
<i>M. tuberculosis</i>	Bovinos, monos, simios, primates (hombre), cerdos, perros, tapires y elefantes.
<i>M. leprae</i> <i>M. leprae-murium</i>	Gatos, ratas y ratones
<i>M. leprae</i>	Armadillo y humano
<i>M. fortuitum</i>	Perros, vacas y cerdos.
<i>M. marinum</i>	Peces y sapos.
<i>M. kansasii</i>	Monos, vacas y cerdos.
<i>M. chelonae</i>	Cerdos y manatíes
COMPLEJO: <i>M. avium</i> subsp. <i>Avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> . <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .	Pollos, pájaros y cerdos Paloma torcaz y ciervo Bovinos, ovinos, caprinos y rumiantes animales silvestres.

(47,57).

## 9. ESTRUCTURA DE LA ENVOLTURA CELULAR MICOBACTERIANA

En sentido amplio la envoltura celular micobacteriana incluye la membrana plasmática y la pared celular de la bacteria, constituida por complejos de micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) y lipoarabinomanosa (LAM). A su vez el mAGP está formado por polímeros de arabinogalactano, peptidoglicano y ácidos micólicos. El peptidoglicano de la pared celular es un polímero altamente entrecruzado, formado por aminoazúcares y aminoácidos (unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-glicolilmurámico), que se encuentra rodeando a la membrana plasmática; las moléculas de ácido murámico presentes en su estructura están unidas covalentemente al complejo micolil-arabinogalactano, formado por el arabinogalactano (polisacáridos de arabinosa y galactosa), que se encuentran esterificando a los ácidos micólicos (ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono) (48, 49, 50). El mAGP es un fuerte inmunógeno, pero se desconoce mucho acerca de sus interacciones con las células del hospedero y por otro lado, se ha especulado que éste provee una barrera protectora al paso de las drogas (51).

Otro grupo importante de componentes de la pared celular son los acil trealosa-2'-sulfatos. Estos pueden ser importantes en la virulencia, ya que la mayoría de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, elaboran sulfolípidos ácidos que pueden estar involucrados en la inactivación de los fagosomas del macrófago (52).

La segunda molécula que domina la envoltura de las micobacterias, es el polisacárido lipoarabinomanosa (LAM), formado por residuos de D-arabinosa y D-manosa. El LAM exhibe un amplio espectro de funciones inmunoregulatoras, entre las que se encuentran por un lado anular la activación de las células T, inhibir la activación de los macrófagos mediada por el IFN- $\gamma$ , así como la actividad de la proteína quinasa C; también estimula la producción de citocinas por los macrófagos, las cuales pueden provocar muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis. Las micobacterias son patógenos intracelulares, que pueden permanecer durante largos períodos de tiempo dentro de los macrófagos, debido a que muchos de sus componentes de superficie juegan un papel importante en las interacciones con estas células fagocíticas. Las micobacterias presentan una gran diversidad de lípidos, los cuales representan más del 40 % de su peso seco, la mayoría de ellos se localizan principalmente en la envoltura celular, constituidos por;

- |                          |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| * Ácidos micólicos       | * Sulfátidos          |
| * Glicopeptidolípidos    | * Ceras               |
| * Lipooligosacáridos     | * Fosfolípidos        |
| * Glicolípidos fenólicos | * Ésteres de trealosa |

A los lípidos de las micobacterias se les atribuyen varias funciones como son: responsables de la ácido-alcohol resistencia; específicamente se ha mostrado que los triglicéridos y trealosas contribuyen a la supervivencia de estos microorganismos ante condiciones adversas. Por otro lado, las propiedades antigénicas de este microorganismo se atribuyen principalmente a componentes proteico/polisacáridos, aunque también se ha demostrado a componentes lipídicos (53).

## 10. PATOGENESIS DE *M. bovis* EN GANADO BOVINO

La micobacteria *M. bovis* es la especie que presenta mayor capacidad para infectar un amplio rango de hospedadores, dentro de los cuales se incluyen las diferentes especies de primates, incluido el hombre, ungulados y carnívoros, tanto domésticos como de vida silvestre (54, 55). Cada vez son más frecuentes las citas sobre el aislamiento de *M. bovis*, en poblaciones de animales de vida libre, y su implicación en la epidemiología de la tuberculosis bovina (TB). Así, se ha mostrado que el tejón tiene gran importancia como reservorio de la micobacteria en diferentes países del mundo (56, 57).

La enfermedad es más frecuente en las vacas lecheras, debido a su mayor periodo productivo, en comparación con los animales que se sacrifican tempranamente para la producción de carne (58). Las vías más usuales de infección al ganado son las respiratoria y la digestiva. Los hallazgos patológicos y los actuales conocimientos de los modos de transmisión de la enfermedad, apoyan la teoría de que la mayoría de los animales se infectan por vía respiratoria. Se ha observado que las vacas tuberculosas, presentan casi siempre lesiones en los nodulos linfáticos asociados al aparato respiratorio; mientras que sólo el 1-2% de vacas tuberculosas presentan lesiones pulmonares, y por lo tanto son los que deben considerarse como “casos abiertos” capaces de diseminar la enfermedad. El animal puede excretar micobacterias viables por moco nasal y tráquea antes de que sean visibles lesiones pulmonares. La transmisión de la tuberculosis por contacto entre ganado infectado y no infectado vía aérea fue demostrada por Neill y col (59). Experimentalmente se observó que existe un periodo después de la inoculación, durante el cual es muy difícil aislar el germen de la mucosa nasal, y el tiempo que transcurre hasta la excreción; su cantidad y duración, parecen estar relacionados con la dosis de inoculación (60). Los bacilos tuberculosos son excretados preferentemente por aire espirado, esputo y moco nasal. Sin embargo, también se eliminan por heces, leche, orina, descargas vaginales, uterinas, seminales y a partir de nodulos linfáticos supurantes (61).

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

Se ha observado que las micobacterias pueden entrar a los macrófagos vía receptores para los componentes del complemento (C') CR1 y CR3 (62, 63). Los receptores del complemento están presentes en 3 diferentes formas estructurales. EL receptor del complemento tipo 1 (CR1) es una proteína monomérica transmembranal que se une a C3b y C4b. Las micobacterias patogénicas raramente reclutan fragmentos del complemento C2a para formar C3 convertasa, y generar actividad opsonizante de C3 en ausencia de los componentes tempranos activos de la vía alterna del complemento (64). Los mecanismos y las consecuencias que predominan en condiciones *in vivo*, pueden determinarse por las características de las cepas bacterianas individuales (dependientes e independientes de C'), el medio ambiente de los macrófagos y el estado de diferenciación y activación de los macrófagos (65). Otro de los mecanismos de destrucción presentes en los macrófagos, son los receptores de manosa, que es una proteína monomérica transmembranal, con un dominio extracelular que contienen ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos dependiente de calcio característica de lectinas (66). Los receptores de manosa se expresan en macrófagos maduros pero no en monocitos inmaduros. Los macrófagos derivados de monocitos de humanos se unen a cepas virulentas de micobacterias y las internalizan vía receptores de manosa (67). La expresión de receptores de manosa disminuye en presencia de IFN- $\gamma$  (68); por lo tanto, el papel de la ingestión temprana de *M tuberculosis* en la infección de individuos con inmunidad celular comprometida, puede ser más importante que el mismo establecimiento del granuloma. Otro de los mecanismos implícitos en la adherencia de las micobacterias a células epiteliales del tracto respiratorio, son las proteínas A surfactantes (Sp-A), que se encuentran en los pulmones. Por lo menos se han descrito tres receptores candidatos para Sp-A que han sido identificados. Una proteína de 126 -kDa denominada C1qRp que se expresa sobre monocitos, macrófagos, neutrofilos y células endoteliales. Una segunda conocida como CD35 que se une a C1q con una alta afinidad y finalmente una proteína de 210-kDa denominada SRP210 (69). Los hallazgos sugieren que la Sp-A, no simplemente actúa como una opsonina, sino que participa en la actividad de uno o más receptores que son responsables de la modulación en la unión de la micobacteria (65).

Otro mecanismo de patogenicidad que está presente, es la fusión del fagolisosoma, también puede servir de estímulo para el crecimiento del bacilo tuberculoso dentro del macrófago (70).

La presencia de necrosis en las lesiones tuberculosas, ocurre después del desarrollo de la hipersensibilidad tardía (HT) con la infiltración de linfocitos y macrófagos. Se han dado varias explicaciones a este fenómeno: a) algunas linfocinas pueden ser tóxicas a ciertas concentraciones, b) los compuestos tóxicos de los bacilos (factor cordón) son liberados en grandes cantidades, cuando las micobacterias son destruidas por la HT y la inmunidad mediada por células (IMC), c) la isquemia de los vasos sanguíneos trombosados, probablemente incrementen el daño al tejido, d) las reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), o incluso las proteínas secretadas en el tejido necrótico, activan localmente la cascada del complemento y dañan las células del huésped, e) enzimas hidrolíticas (proteasas y lipasas) liberadas tanto por los macrófagos vivos como aquellos en desintegración, pueden dañar directamente al tejido, así como, los f) intermediarios reactivos del oxígeno ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{-1}$ ,  $O_2$  y OH) liberados por los macrófagos, y g) el factor de necrosis tumoral (TNF) de macrófagos y linfocitos que favorecen a la liberación de mediadores solubles de la inflamación (71).

La licuefacción de los centros caseosos es una de las respuestas más nocivas en la enfermedad, el material es un excelente medio de cultivo donde la micobacteria se multiplica extracelularmente alcanzando altas cantidades, las paredes de los bronquios se necrosan y se rompen formando una cavidad. Después los bacilos y el material

caseoso licuado son descargados en las vías aéreas alcanzando otras partes del pulmón. Los macrófagos no sobreviven en el material licuado o incluso caseoso, debido a la sensibilización por una gran cantidad de antígenos micobacterianos presentes en altas concentraciones. Es posible que los macrófagos, que entran a esta lesión sean destruidos por los ácidos grasos tóxicos originados por las células huésped (72). El bacilo en el interior del macrófago, se multiplica ocasionando su destrucción y liberación de enzimas hidrolíticas y factores quimiotácticos, que atraen monocitos y macrófagos hacia la zona de lesión iniciando la formación del granuloma. Las células fagocíticas son atraídas por los bacilos liberados, restos celulares y factores quimiotácticos del hospedero, como C5a (componente del complemento) y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1). En el daño tisular, la multiplicación logarítmica bacilar se detiene, debido a condiciones anóxicas, pH bajo y a presencia de ácidos grasos inhibidores; el huésped casi invariablemente es tuberculina positivo cuando la lesión sufre necrosis caseosa (73).

La respuesta celular intenta controlar la enfermedad, resultando en la acumulación de un gran número de células fagocíticas y finalmente en la formación de una lesión macroscópica, referida como tubérculo (74). La respuesta IMC se desarrolla y los macrófagos del hospedero adquieren una incrementada capacidad para matar a los bacilos intracelulares. En la respuesta mediada principalmente por linfocitos T, se liberan linfocinas, que atraen, inmovilizan y adicionalmente activan a los monocitos en el sitio donde la micobacteria y sus productos existen. La hipersensibilidad celular que se desarrolla, contribuye a la destrucción del tejido (necrosis caseosa). En algunos casos, la licuefacción y formación de cavidades ocurre debido a la acción enzimática sobre proteínas y lípidos. La formación de granulomas es un intento del hospedero por localizar la enfermedad y permitir que los mecanismos inmunes e inflamatorios destruyan al bacilo. Típicamente, la apariencia microscópica de un granuloma focal (tubérculo), presenta una área central rodeada por células epiteloideas, linfocitos y granulocitos. En algunos casos puede existir mineralización en el centro necrótico mientras que en procesos avanzados varios focos de mineralización pueden juntarse. En las lesiones producidas por *M. bovis* pueden encontrarse pocas, si es que alguna micobacteria a la examinación microscópica. El desarrollo de la enfermedad en los animales, depende de la capacidad del bacilo tuberculoso para multiplicarse dentro de las células e inducir una respuesta en el hospedero. La patogenicidad de la micobacteria, es un fenómeno multifactorial y de efectos acumulativos de varios componentes bacterianos (75). Dentro de ellos destaca la capacidad del *M. bovis* para formar el factor de acordonamiento, que es un glicolípido identificado como 6,6'-dimicoliltrehalosa. Se sabe que este componente no induce sensibilidad a la tuberculina, pero si es capaz de inhibir la migración de leucocitos y es leucotóxico, debido a que causa una disminución en la actividad respiratoria fosforilativa de las mitocondrias, así como, separación de los ribosomas del retículo endoplasmico, afectando de esta manera la actividad bactericida de las células fagocíticas. Varios componentes lipídicos se han aislado y caracterizado químicamente con el propósito de evaluarlos tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, para poder así determinar su importancia en la patogénesis. Por otro lado, la estructura y funciones biológicas de la pared celular micobacteriana, se han investigado; sin embargo, el conocimiento de las funciones de cada uno de sus componentes en la patogénesis aún no es claro (76). Un importante mecanismo de virulencia observado, en las micobacterias patógenas, es la producción y liberación de la enzima superóxido dismutasa (SOD). La SOD protege a la micobacteria de los efectos de los radicales de oxígeno generados durante el estallido oxidativo por los macrófagos (77).

## 11. INMUNIDAD EN LA TUBERCULOSIS

La respuesta inmunológica específica tanto humoral como mediada por células hacia un antígeno se inicia con la participación de las células T, a través del reconocimiento de porciones de antígeno proteicos (péptidos), unidos a moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) (78). Tras la activación por el antígeno específico (antígenos micobacterianos) estas células secretan citocinas, muchas de las cuales actúan sobre otras poblaciones celulares implicadas en la defensa del huésped. Algunas de las citocinas liberadas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la linfotoxina (LT) activan a neutrófilos y células endoteliales; mientras que la interleucina-5 (IL-5) causa la activación, crecimiento y diferenciación de las células B, promoviendo la producción de anticuerpos (79); el interferón -  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) activa a los fagocitos mononucleares; y la interleucina-2 (IL-2) activa a las células NK así como a los linfocitos T y B (80, 81).

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

Para la eliminación de estos bacilos ácido-alcohol resistentes, es necesario que las citocinas, derivadas de las células T aumenten la función microbicida de los fagocitos. La misma secuencia de activación de las células T y del macrófago pueden producirse por medio de antígenos proteicos solubles. En esta situación como en la defensa del huésped, la activación de los macrófagos puede producir lesión tisular. Por ejemplo, como en el caso del derivado proteico purificado (PPD), que induce una respuesta de HT, cuando se inocula animales que han estado expuesto a *M. bovis* bajo condiciones naturales o tienen una infección activa. La respuesta característica de la HT, aparecen dentro de las 24 a 48 horas, poco después de la inoculación del antígeno PPD, se acumulan neutrófilos alrededor de las vénulas postcapilares; el infiltrado desaparece rápidamente y posteriormente se infiltran células T y monocitos sanguíneos. Las células endoteliales que recubren estas vénulas se hinchan, aumentan la biosíntesis en organelos y se hacen permeables a las macromoléculas plasmáticas. El fibrinógeno sale de los vasos sanguíneos hacia los tejidos vecinos, donde se convierte en fibrina. El depósito de fibrina y, en menor grado, la acumulación de células T y monocitos dentro del espacio extravascular alrededor del punto de inyección, hace que el tejido se hinche y se vuelva duro (induración). La induración, característica de la HT, se detecta a las 18 horas posteriores a la inoculación del antígeno y es máxima a las 72 horas. El retraso en la aparición de la induración palpable es la razón de llamarla respuesta tardía (82). La reacción de HT consta de 3 eventos secuenciales:

1. - La fase de reconocimiento, en la que las células T CD4+ y en menor proporción las células T CD8+, reconocen antígenos proteicos presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA).
2. - La fase de activación, en la que las células secretan citocinas y proliferan.
3. - La fase efectora que puede dividirse en dos etapas: a) la etapa de inflamación, en la que las células endoteliales vasculares, activadas por citocinas, atraen leucocitos circulantes a los tejidos en donde se encuentra

el antígeno micobacteriano; y b) resolución, en la que los macrófagos, activados por las citocinas, eliminan el antígeno. Este proceso puede acompañarse de lesión tisular (83).

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

1.- La IL-2 produce una proliferación autocrina y paracrina de las células T activadas por el antígeno. Concentraciones superiores de IL-2 pueden también estimular células T vecinas que no son específicas al antígeno, a medida que la infiltración linfocitaria se hace más pronunciada, más del 90 % de las células T activadas presentes en el lugar de inducción por el antígeno (PPD) no son específicas; conjuntamente, también existe un aumento de producción de IFN- $\gamma$ , TNF y LT, inducida por la IL-2.

2. - El IFN- $\gamma$  actúa sobre las CPA, que pueden ser células endoteliales o macrófagos, aumentando la expresión de moléculas clase II del MHC, e incrementado así la eficacia de la presentación antigénica a las células T CD4+ *in situ*. Este es otro mecanismo importante de amplificación para la inducción de HT.

3. - El TNF y LT actúan sobre las células endoteliales aumentando la expresión de moléculas de adhesión, lo cual induce la activación de leucocitos y de la respuesta inflamatoria. El IFN- $\gamma$  y la IL-4 pueden tener acciones similares sobre las células endoteliales, reclutando de forma específica células mononucleares.

4. - El IFN- $\gamma$  actúa sobre los monocitos que infiltran el lugar de inflamación, aumentando su capacidad de eliminación del antígeno por medio de la fagocitosis y efecto bactericida. El IFN- $\gamma$  es la citocina activadora de los macrófagos más potente que se conoce y es el mediador más importante de la HT (84).

Las células endoteliales venulares en el sitio de inoculación del antígeno, desempeñan dos funciones importantes en la reacción de HT; a) primero, actúan como CPA para iniciar la activación de las células T, b) segundo, regulan la infiltración de leucocitos en la reacción inflamatoria, mediante la producción de sustancias vaso activas como los leucotrienos, prostaglandinas, y óxido nítrico; además, las células endoteliales secretan IL-8 y una proteína quimiotáctica para monocitos-1 (MCP-1) (85). Otra célula central en la HT es el monocito, el que una vez que deja la circulación y entra a los tejidos extravasculares en los que se producen las reacciones de HT, se diferencia a macrófago. La diferenciación de los monocitos a células efectoras se llama activación del macrófago. La activación se compone de alteraciones cuantitativas en la expresión de varios productos génicos (proteínas o enzimas), que confieren al macrófago activado la capacidad de realizar funciones que no puede realizar el monocito en reposo. Dentro de las funciones de los macrófagos activados se encuentran. 1. -La muerte o efecto bactericida debido al aumento en su capacidad fagocítica y en la generación de formas reactivas del oxígeno. Citocinas como el IFN- $\gamma$  aumentan en los monocitos la endocitosis y la fagocitosis. 2.- Los macrófagos activados estimulan la inflamación aguda, a menudo a través de la secreción de mediadores inflamatorios de vida corta, como el factor activador de plaquetas (PAF), prostaglandinas y leucotrienos. 3. - Los macrófagos activados son mejores CPA. 4. - Los productos de los macrófagos activados, como las citocinas y los factores de proliferación, modifican de forma progresiva el ambiente tisular local en las reacciones de HT crónicas, produciendo inicialmente la destrucción del tejido y después, el reemplazamiento por tejido conectivo (86, 87, 88, 89).

La reacción de tuberculina considerada como prototipo de la inmunidad celular de HT, es el principal método empleado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, la reacción que se desarrolla difiere con la reacción tuberculínica que se produce en el hombre, donde por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado que la mayoría de los linfocitos infiltrados en la dermis entre 6 y 12 horas después de la inoculación del PPD, son células T CD4<sup>+</sup> (90), mientras que en el bovino, las principales células infiltradas son células T  $\gamma\delta$ , que como se

sabe participan en los mecanismos inmunes iniciales, posteriormente, se observa infiltración de las células Bo CD4<sup>+</sup>, que probablemente representan la población efectora de las células T antígeno específico, para la amplificación de la reacción tuberculínica bovina (91).

En la práctica clínica, la pérdida de la respuesta de HT a antígenos que se encuentran de forma universal (por ej antígenos micobacterianos), es indicio de una función deficiente de células T, situación conocida como anérgia. Los animales anérgicos son extremadamente susceptibles a la infección por microorganismos intracelulares. Se ha mencionado que existen una gran cantidad de factores asociados con la disminución de la respuesta inmune mediada por células en ganado, como la administración de corticoesteroides (92), las infecciones con el virus de diarrea viral bovina (93) y la influencia del estado de preñez y lactación (94). Sin embargo, una restricción en la dieta (proteína y energía) no ha mostrado una reducción significativa en la prueba intradérmica al PPD, ni en la producción de IFN- $\gamma$  en la blastogenesis linfocitaria por estimulación *in vitro* (95).

Actualmente se considera que la inmunidad hacia la tuberculosis implica una serie compleja de interacciones entre varias poblaciones celulares, que tienen como finalidad controlar y mantener la infección, así como prevenir al hospedero de una posible reactivación de la enfermedad. Los eventos inmunes celulares, que ocurren durante la infección micobacteriana, pueden conducir a una resistencia específica o a una HT. Orne y col (96), han propuesto que estos dos mecanismos son fenómenos separados; y considera que la inmunidad protectora puede estar dirigida principalmente por citocinas, mientras que la HT lo esta por las quimiocinas. Un elemento clave en los procesos celulares, parece ser el factor de necrosis tumoral (TNF), citocina que puede ser la barrera decisiva entre el proceso antimicrobiano y la HT. Avances recientes en la caracterización de la respuesta inmune protectora a las micobacterias, han puesto de relieve el papel central de las diferentes subpoblaciones de células T, estas células no solo contribuyen a la defensa del hospedero secretando citocinas activadoras de los macrófagos, sino también lisando células infectadas y destruyendo micobacterias (97).

De las diferentes subpoblaciones de células T, las células T CD4<sup>+</sup> juegan un papel central, aunque no exclusivo en la defensa inmune contra la tuberculosis, funcionalmente estas células contribuyen a la protección produciendo citocinas específicas de antígeno; entre estas citocinas el IFN- $\gamma$  parece ser la molécula efectora más crítica, para la activación del macrófago, debido a que media su efecto protectoro principalmente por la inducción de intermediarios reactivos del nitrógeno, necesarios para la destrucción de las micobacterias intracelulares (98). En el humano se ha descrito que las células T CD4<sup>+</sup> citotóxicas, pueden participar en la respuesta inmune local, contra la tuberculosis pulmonar, debido a que los macrófagos alveolares infectados ofrecen una relativa resistencia a la destrucción por estas células, se cree que esta resistencia puede ser benéfica al hospedero, pues de cierto modo se inhibe la diseminación de las bacterias a través del tejido pulmonar (99).

El papel de las células T CD8 en la inmunidad contra la enfermedad no es completamente claro, se sabe que estas células pueden prolongar la sobrevivencia de ratones infectados con *M. tuberculosis*, mientras que los animales que carecen de ellas son más susceptibles a la infección (100, 101, 102). Las clonas o linajes celulares derivadas de células CD8<sup>+</sup> específicas a antígenos micobacterianos, secretan IFN- $\gamma$  y reconocen el péptido antigénico en el contexto de las clásicas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I. Sin embargo recientemente, se han clonado células CD8<sup>+</sup>, capaces de reconocer antígenos no peptídicos de las micobacterias en el contexto de moléculas CD1 en el humano (103, 104). Más aún también se ha determinado la existencia de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> en individuos enfermos de tuberculosis que reconocen el antígeno en el contexto de moléculas clase Ib no polimórficas del MHC. Por otro lado, estudios realizados en modelo

murino han mostrado que las células T CD8<sup>+</sup>, pueden inducir actividad tuberculostática en macrófagos infectados, debido a que durante el proceso de lisis vía exocitosis o liberación granulocítica, las células liberan moléculas efectoras que directamente destruyen a las micobacterias intracelulares; una de estas moléculas es la granulisina, homologa de la proteína NK-lisina, antibacteriana que destruye a bacilos ácido-alcohol resistentes alterando la integridad de la membrana. Se cree que la perforina que se localiza junto con la granulisina en los gránulos citotóxicos, provee el acceso de esta última a los compartimientos intracelulares de las células infectadas, donde son destruidas las micobacterias. Este novedoso mecanismo se dice puede contribuir a la inmunidad protectora, ya que directamente se destruye al patógeno intracelular (105).

Por otro lado, se ha determinado que las células T  $\alpha\beta$  doble negativas (CD4<sup>-</sup>; CD8<sup>-</sup>) reconocen antígenos no proteicos restringidos por CD1; este tipo de células, realizan funciones efectoras que contribuyen significativamente a la respuesta del hospedero ante la infección, incluyendo la liberación de IFN- $\gamma$  y expresión de actividad citolítica, después del contacto con células blanco sensibilizadas con lípidos o glicolípidos micobacterianos. Sin embargo a diferencia de las células T CD8<sup>+</sup>, las células T doble negativas lisan macrófagos vía interacción Fas-FasL y no tiene efecto sobre la viabilidad de la micobacteria, su papel parece estar más dirigido a limitar la respuesta inflamatoria, manteniendo una tolerancia periférica; en el contexto de la infección, esta vía puede servir para reducir la expresión antigénica en las células presentadoras de antígeno, amortiguando de esta manera el extenso daño al tejido por los mediadores inflamatorios liberados durante la respuesta inmune (106).

El papel que tiene las células T  $\gamma\delta$  en la inmunidad contra las infecciones micobacterianas no es muy claro; estas células se acumulan en el sitio de lesión al inicio del proceso infeccioso y funcionalmente son capaces de producir IFN- $\gamma$  y exhibir citotoxicidad en respuesta a macrófagos infectados con micobacterias. Al parecer este tipo de células tienen influencia sobre el tráfico celular local, debido a que su presencia favorece el reclutamiento de monocitos necesarios para el desarrollo del granuloma linfocito típico; mientras que en ausencia se desarrollan lesiones piogranulomatosas. La participación de las células T  $\gamma\delta$  en la formación del granuloma parece estar mediada por la producción de la quimiocina, proteína 1 quimioatrayente del macrófago (MCP-1) (107).

Por otro lado, se ha observado que la interacción del receptor  $\gamma\delta$  con el antígeno micobacteriano induce la expresión de FasL en células T  $\gamma\delta$  constantemente estimuladas, a su vez la interacción del receptor con Fas presente sobre los leucocitos infiltrados induce la activación de la muerte celular de las células  $\gamma\delta$ . De esta manera se cree que las células  $\gamma\delta$  participan al inicio de la infección tratando de localizar y resolver el daño al tejido; sin embargo si la enfermedad se torna crónica, ocurre la apoptosis de las células vía Fas-FasL. La reducción de las células  $\gamma\delta$  en el sitio, sirve para limitar la inflamación al inhibirse la acumulación de las células inflamatorias; se cree que este evento contribuye al desarrollo de una forma crónica de la infección (108, 109).

Como se mencionó, se ha considerado que la inmunidad protectora y la hipersensibilidad tardía son mecanismos separados, que pueden distinguirse por sus moléculas mediadoras como citocinas o quimiocinas respectivamente. De esta manera se ha determinado que la formación del granuloma, que se caracteriza por el influjo de macrófagos, es una reacción de HT, similar a la que ocurre en la piel, después de la inoculación del PPD, debido a la producción de quimiocinas por los leucocitos y células endoteliales, localizadas en el sitio de infección (110, 111). Es probable que varias quimiocinas, estén involucradas en este mecanismo como la MCP-1, aunque esta no parece ser esencial, ya que ratones infectados con *M. tuberculosis*, y cuyo gen MCP-1 ha sido deletado, pueden controlar una infección aguda (112); sin embargo, en otro modelo murino, donde el gen de ICAM, fue el que se

deleteo, se encontró que el influjo masivo de macrófagos, que comúnmente continua después de que la infección se ha contenido, esta ausente; como consecuencia no hay formación del granuloma y se favorece la diseminación bacteriana (113). El elemento clave en este orquestamiento parece ser el TNF, producido por los macrófagos activados, esta citocina no solo participa en los mecanismos antimicrobianos, sino que también dirige la respuesta de HT, favoreciendo la producción de quimiocinas y el reclutamiento de monocitos en el sitio de lesión; si las células no se activan apropiadamente se degeneran y si están infectadas por micobacterias, este evento resulta en una reactivación potencial de la enfermedad y a necrosis del tejido. Así el TNF, puede ser arma de doble filo, necesario para la formación del granuloma, pero si su producción no es regulada puede causar una acumulación celular innecesaria y daño al tejido.

## 12. ANTÍGENOS RELEVANTES DE *Mycobacterium bovis*

La caracterización de antígenos de *M. bovis*, se ha realizado, desde la década de los 30's (114, 115, 116), con la esperanza de producir un reactivo bien definido y específico para las pruebas de diagnóstico. En general, el estudio de los componentes micobacterianos a partir del derivado proteico purificado (PPD), ha llevado a mejorar el conocimiento del curso de la infección, y la respuesta inmunológica del hospedero hacia ellos (117). En medicina veterinaria el estudio de los antígenos de *M. bovis*, se ha enfocado principalmente al desarrollo de pruebas diagnósticas confiables, debido a que la prueba de tuberculina, principal herramienta utilizada para el diagnóstico de tuberculosis bovina, muestra baja sensibilidad y especificidad, en parte, por la naturaleza compleja del antígeno usado (PPD), que incluye además proteínas que presentan reacción cruzada con una gran variedad de otras micobacterias. Los antígenos se clasifican como inmunodominantes (inmunorelevantes), si evocan una fuerte respuesta inmune celular y humoral, tanto en animales vacunados como en animales infectados. Sin embargo algunos antígenos inmunodominantes no necesariamente son protectivos ya que probablemente en algunos casos, estos desencadenan reacciones inmunopatológicas. Se debe considerar que algunos antígenos reconocidos como protectivos o inmunogénicos en algunos animales, pero no serlo para otros animales, situación que dificulta la elección de antígenos candidatos a vacunas. Además, los antígenos purificados pueden presentar múltiples epitopos para células T, incrementando su capacidad para producir amplios efectos sobre la respuesta inmune, tanto inducir una inmunidad protectora, como un estado de inmunosupresión.

Gran parte de los trabajos sobre caracterización de los antígenos de *M. bovis*, se han realizado gracias al interés que se tiene en tuberculosis humana debido a que el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), que es una cepa atenuada de *M. bovis*, se utiliza como vacuna en el humano. Esta cepa vacunal puede prevenir enfermedades causadas tanto por *M. tuberculosis* como por *M. bovis*, especies íntimamente relacionadas con *M. microti* y *M. africanum*, referidas dentro del complejo *M. tuberculosis*. Un gran número de antígenos que se han caracterizado de *M. tuberculosis* y *M. bovis* muestran una elevada homología (118, 119, 120).

Existen grandes dificultades para la purificación de los antígenos micobacterianos, pues se ha observado que las proteínas solubles, activamente secretadas o liberadas al medio de cultivo, no son fácilmente separables. Varias características inherentes a los antígenos micobacterianos obstaculizan los intentos para purificar componentes

deleteo, se encontró que el influjo masivo de macrófagos, que comúnmente continua después de que la infección se ha contenido, esta ausente; como consecuencia no hay formación del granuloma y se favorece la diseminación bacteriana (113). El elemento clave en este orquestamiento parece ser el TNF, producido por los macrófagos activados, esta citocina no solo participa en los mecanismos antimicrobianos, sino que también dirige la respuesta de HT, favoreciendo la producción de quimiocinas y el reclutamiento de monocitos en el sitio de lesión; si las células no se activan apropiadamente se degeneran y si están infectadas por micobacterias, este evento resulta en una reactivación potencial de la enfermedad y a necrosis del tejido. Así el TNF, puede ser arma de doble filo, necesario para la formación del granuloma, pero si su producción no es regulada puede causar una acumulación celular innecesaria y daño al tejido.

## 12. ANTÍGENOS RELEVANTES DE *Mycobacterium bovis*

La caracterización de antígenos de *M. bovis*, se ha realizado, desde la década de los 30's (114, 115, 116), con la esperanza de producir un reactivo bien definido y específico para las pruebas de diagnóstico. En general, el estudio de los componentes micobacterianos a partir del derivado proteico purificado (PPD), ha llevado a mejorar el conocimiento del curso de la infección, y la respuesta inmunológica del hospedero hacia ellos (117). En medicina veterinaria el estudio de los antígenos de *M. bovis*, se ha enfocado principalmente al desarrollo de pruebas diagnósticas confiables, debido a que la prueba de tuberculina, principal herramienta utilizada para el diagnóstico de tuberculosis bovina, muestra baja sensibilidad y especificidad, en parte, por la naturaleza compleja del antígeno usado (PPD), que incluye además proteínas que presentan reacción cruzada con una gran variedad de otras micobacterias. Los antígenos se clasifican como inmunodominantes (inmunorelevantes), si evocan una fuerte respuesta inmune celular y humoral, tanto en animales vacunados como en animales infectados. Sin embargo algunos antígenos inmunodominantes no necesariamente son protectivos ya que probablemente en algunos casos, estos desencadenan reacciones inmunopatológicas. Se debe considerar que algunos antígenos reconocidos como protectivos o inmunogénicos en algunos animales, pero no serlo para otros animales, situación que dificulta la elección de antígenos candidatos a vacunas. Además, los antígenos purificados pueden presentar múltiples epitopos para células T, incrementando su capacidad para producir amplios efectos sobre la respuesta inmune, tanto inducir una inmunidad protectora, como un estado de inmunosupresión.

Gran parte de los trabajos sobre caracterización de los antígenos de *M. bovis*, se han realizado gracias al interés que se tiene en tuberculosis humana debido a que el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), que es una cepa atenuada de *M. bovis*, se utiliza como vacuna en el humano. Esta cepa vacunal puede prevenir enfermedades causadas tanto por *M. tuberculosis* como por *M. bovis*, especies íntimamente relacionadas con *M. microti* y *M. africanum*, referidas dentro del complejo *M. tuberculosis*. Un gran número de antígenos que se han caracterizado de *M. tuberculosis* y *M. bovis* muestran una elevada homología (118, 119, 120).

Existen grandes dificultades para la purificación de los antígenos micobacterianos, pues se ha observado que las proteínas solubles, activamente secretadas o liberadas al medio de cultivo, no son fácilmente separables. Varias características inherentes a los antígenos micobacterianos obstaculizan los intentos para purificar componentes

micobacterianos individuales, como lo es su propia naturaleza y su capacidad para agregarse con moléculas homologas o heterólogas. Se ha mostrado que la agregación es más seria en extractos celulares donde los antígenos se agregan con lípidos, polisacáridos, u otros componentes moleculares de las membranas. Se considera que es más fácil obtener proteínas purificadas a partir de cultivos en etapas tempranas, mediante extractos proteicos de filtrados de cultivo (CFPE's), que de preparaciones celulares de las micobacterias. También se ha observado que algunas proteínas micobacterianas, pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como resultado de cambios de carga espontáneos, por procesos de desaminación, glicosilación, acilación, etc. (121).

Existe un gran número de proteínas, que presentan asociaciones covalentes con heteromoléculas como azúcares o lípidos (122, 123, 124). En algunos casos, solamente un porcentaje del total de las proteínas se encuentra asociadas a estas moléculas. Por ejemplo, la proteína MPB70, principal proteína de secreción de *M. bovis*, puede encontrarse en diferentes formas glicosiladas, demostrado por análisis electroforético en dos dimensiones e inmunotransferencia, empleando anticuerpos monoclonales (125).

Los mayores problemas que presenta la caracterización de antígenos micobacterianos son la insuficiencia del material en un inicio, la falta de un sistema de referencia cruzada y la dificultad en la caracterización analítica de los antígenos. Las técnicas modernas han ayudado a vencer estos problemas, junto con el desarrollo de anticuerpos monoclonales (AcM's) y las técnicas de recombinación de DNA, que no solo han abierto nuevos caminos para la purificación, sino también para el desarrollo de un buen sistema de referencia (126).

Se ha realizado un enorme trabajo de investigación, dirigido hacia la purificación y caracterización individual de los antígenos micobacterianos, y su papel dentro de la reactividad inmunológica (127, 128, 129). Gran parte de los intentos tempranos de caracterización, habían sido difíciles de relacionar con los estudios existentes, debido a que no se tenía un sistema de referencia cruzada de uso general. Antes del surgimiento de la tecnología de los AcM's, se habían desarrollado dos sistemas de referencia cruzada. Uno, desarrollado por Daniel y Janicki (130), quienes proponen por primera vez un sistema de referencia para antígenos micobacterianos, basado en su reactividad con sueros hiperinmunes empleando un sistema de inmunodifusión, de esta manera se identificaron 4 antígenos; mientras que el otro sistema contemplaba la identificación de antígenos por inmunoelectroforésis cruzada, 60 antígenos se identificaron en *M. bovis* por este método (131).

Ambos sistemas presentaban limitaciones y defectos, debido a que el sistema de inmunodifusión requería buenas purificaciones de los componentes originales y la inmunoelectroforésis cruzada no era fácilmente reproducible en diferentes laboratorios por lo que en muchas ocasiones, la identificación de los antígenos se dificultaba (132). Además, actualmente se sabe, que algunos antígenos existen en formas múltiples, debidas a las modificaciones post-traduccionales, como es el caso de la MPB70. Fenómenos similares se han observado para los antígenos de 70 y 80 kDa mediante el sistema de contrainmunolectroforésis (CIE), en donde se aprecian líneas de precipitación múltiple (133).

Se han descritos también proteínas de choque térmico (HSP, del inglés heat shock protein), dentro del complejo tuberculosis, proteínas altamente conservadas en su secuencia de aminoácidos, se conocen desde 1973, pero no fue hasta el año 1989 que se empezó a comprender cuales son sus funciones, una de ellas es proteger a las proteínas que todavía no sé repliegan (de síntesis reciente) o que se han desplegado después de un choque térmico, a fin de evitar su interacción con otras moléculas (134). Esta función de protección y de asistencia al repliegue es muy importante, ya que la actividad biológica de una proteína depende de su correcto repliegue. La

clasificación de estas proteínas, se basa en el peso molecular, como la HSP65 (GroEL), HSP10 (GroES) y la HSP70 representantes típicos de esta familia. Otra de ellas es la HSP90 proteína de la cual se desconoce sus funciones. Estas proteínas están presentes tanto en células eucarióticas como en procariotes y su denominación se debió a que se incrementan por una variedad de estímulos, que causan estrés en las células, como: calor, deficiencias de nutrientes y radicales de oxígeno (135).

La utilidad de los AcM's, con respecto a su reactividad antigénica y su especificidad de especie o reactividad cruzada fue cotejada en el segundo Congreso de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (136). Desde entonces esta metodología se ha utilizado como herramienta en la identificación y aislamiento de antígenos micobacterianos, y como sondas para identificar genes clonados a partir de bibliotecas genómicas y de cDNA (137).

De importancia relevante, fue el hecho de que prácticamente todos los AcM's hacia *M. tuberculosis*, producidos a fines de los 80's, presentaban reacción cruzada con los antígenos de *M. bovis*, y para entonces solo uno era específico a *M. tuberculosis*, indicando con ello la similitud antigénica que existe entre estas especies. Además, uno de los inconvenientes que se tuvieron para desarrollar un mayor número de AcM's específicos de especie, fue el uso de la misma cepa de ratones singénicos Balb/C, cepa en la que varios de los antígenos micobacterianos son inmunodominantes. Con el empleo de otras cepas de ratones ha sido posible obtener un mayor número de AcM's hacia otros antígenos (138). Varios AcM's ahora disponibles, se dice son específicos al complejo *M. tuberculosis*. Con la intención, también, de desarrollar AcM's específicos a *M. bovis*, Morris encontró uno que reaccionaba con un antígeno de 30 kDa presente solo en cepas de campo de esta especie y que no exhibía reactividad con la cepa vacunal BCG ni con otras especies del complejo *M. tuberculosis* (139, 140). Empleando uniones competitivas y estudios de inmunotransferencia de preparaciones antigénicas de CFPE's de *M. bovis* con AcM's, se han determinado tres diferentes epitopes presentes sobre la proteína de 22 kDa o MPB70 (141).

Así, el sistema que actualmente se usa para la caracterización de antígenos, comprende la descripción de las características fisicoquímicas del antígeno tales como: tamaño, peso, carga (punto isoelectrico P.I), hidrofobicidad, asociación con heteromoléculas, reactividad con AcM's y finalmente la secuenciación del antígeno (127).

El desarrollo de pruebas serológicas confiables, para el diagnóstico de tuberculosis en humanos y ganado vacuno se complica, debido al alto grado de reactividad cruzada que existe entre antígenos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, así como con un gran número de otras micobacterias. Sin embargo, en pacientes tuberculosos se han encontrado niveles altos de anticuerpos hacia una proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (antígeno de secreción), por lo que se ha considerado un importante antígeno de utilidad potencial en las pruebas de diagnóstico, además, se ha mostrado induce una buena respuesta inmune tanto celular como humoral (142). Otras dos proteínas interesantes de *M. tuberculosis* son las de 30-31 y 58-60 kDa, que presentan afinidad a fibronectina y se cree participan en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune. También se han descrito glicoproteínas como las que forman el complejo 45-47 kDa obtenido del medio de cultivo de *M. bovis* que presenta reactividad cruzada con los antígenos de 50-55 kDa de *M. tuberculosis* (143, 144, 145, 146).

Los métodos de diagnóstico empleados para diagnosticar la tuberculosis bovina no son completamente confiables y muestran serias limitaciones; como se mencionó anteriormente, el método estándar es la prueba de tuberculina intradérmica que evalúa la reacción de HT hacia un derivado proteico purificado (PPD) (147). Sin embargo, esta prueba tiene baja especificidad y puede afectar el estado inmune de los animales que son sujetos a

repetidas pruebas (148), por lo que es necesario desarrollar métodos de diagnóstico alternativos, que eviten la sensibilización del animal y que puedan ser de utilidad para identificar animales que cursen en las diferentes fases de la infección.

Tradicionalmente la respuesta de anticuerpos en bovinos se ha investigado empleando preparaciones no fraccionadas o antígenos que presentan una alta reactividad cruzada, como el PPD, filtrados de cultivos completos y sonicados de *M. bovis* (149, 150, 151, 152, 153, 154).

Varios antígenos proteicos purificados a partir de filtrados de cultivo se han empleado para el diagnóstico serológico de la tuberculosis bovina, dentro de estos las proteínas MPB70 (22 kDa) y MPB64 (24 kDa), han mostrado ser altamente inmunodominantes y específicas (155).

También se han empleado otros antígenos proteicos como MPB83 y P27, evidenciando una mejor especificidad inmunológica para *M. bovis*. Sin embargo, los inmunoensayos basados sobre un antígeno, usualmente solo detectan la respuesta serológica en un número muy reducido de animales infectados (156). Más recientemente para caracterizar la respuesta de anticuerpos (Ig G) durante la tuberculosis bovina experimental, se empleó una batería de 12 proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*, también producidas por *M. bovis*. Las proteínas empleadas fueron la MPB70 específica de *M. bovis*, y las proteínas ESAT-6, 14 kDa, MPT63, 19 kDa, MPT64, MPT61, MTC28, Ag 85B, 38 kDa, MPT32 y KatG, de estas la ESAT-6, la proteína de 14 kDa, la MPT63, la MPT70, la MPT51 y la MPT32 fueron los antígenos más seroreactivos en la tuberculosis bovina (157).

El análisis de la cinética en la respuesta de anticuerpos, ha revelado un patrón variable a múltiples antígenos, reconocidos por sueros, obtenidos de diferentes animales, con marcados cambios en los perfiles de reconocimiento antigénico en los mismos animales durante diferentes etapas de evolución de la enfermedad (158).

Existe una gran lista de antígenos que se han descritos en *M. tuberculosis*. Sin embargo, el 35 % de los antígenos secretados *in vitro*, está representado por tres proteínas, comprendidas en el rango de 30/32 kDa denominado complejo antigénico 85, las cuales se han designado como 85 A-32, 85B-30, y 85C- 32 kDa; estas proteínas también se han encontrado localizadas en la pared celular y en la superficie de la bacteria, pues exhiben actividad de carboxilesterasa lo cual apoya los conceptos de que participan en la síntesis de la pared celular, (159, 160) y de que participan en la unión de la bacteria a la fibronectina, lo cual puede tener un significado clínico; debido a que la fagocitosis de la micobacteria por los monocitos/macrófagos puede estar influenciada por la interacción del antígeno 85 sobre la superficie de la bacteria, la fibronectina soluble y los receptores de esta última en la superficie de las células fagocíticas. La respuesta inmunológica hacia el complejo 85 puede interferir en la interacción, afectando la fagocitosis del bacilo ácido resistente (161).

Los genes correspondientes a las proteínas del complejo 85 se han clonado y secuenciado no solo en *M. tuberculosis*, sino también en *M. bovis* BCG y en *M. smegmatis*, donde se ha observado que las secuencias, prácticamente son idénticas, sin embargo la expresión del complejo es distinto entre las especies mencionadas (162, 163). Los genes para estas proteínas también se han clonado en *M. leprae* y estas presentan un 90 % de homología con los genes de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* (164).

El complejo antigénico 85 se genera durante el metabolismo de la bacteria y son parcialmente responsables del reconocimiento temprano, por parte de los linfocitos T y de los macrófagos. Además, experimentalmente se ha visto que pueden inducir una protección similar a la obtenida con BCG en ratones y cobayos (165). En la

tuberculosis experimental en ratones se ha observado un reconocimiento selectivo hacia los antígenos del complejo antigénico 85 y a las proteínas 50-55 y 80 kDa de secreción de *M. tuberculosis* (130).

Un gran número de antígenos de *M. tuberculosis* se han aislado y caracterizado, dentro de estos se encuentra el antígeno MPT64, proteína de secreción; el antígeno MPT51, proteína de secreción; el antígeno MTP40; el antígeno TB66 de 66 kDa, proteína seroreactiva / homologa a albúmina de suero, obtenida de *M. tuberculosis*, H37Rv; el antígeno nativo de 30 kDa de *M. tuberculosis*, H37Ra; el antígeno de 14 kDa de *M. tuberculosis*; el antígeno de 10 kDa, homologa entre *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*; la proteína denominada MMP de 19 kDa ubicada en membrana principal de *M. tuberculosis*, cepa Erdman N° 107; el antígeno de 10 kDa; el antígeno de 14 kDa; la proteína de 35 kDa; el antígeno de 19 kDa (con codon de iniciación gtg); AT9S (gi/216781 clave de proteínas secuenciadas no clasificadas de *M. tuberculosis*); proteína 88 (gi/441448); alanina deshidrogenasa (gi/44564; KCS (gi/44601); antígeno Ag84 (gi/453174); catalasa (gi/488442); superóxido dismutasa (gi/581379) (AA 1-207); proteína de estrés 71 kDa (*M. tuberculosis*); antígeno b proteico (*M. tuberculosis*) (pir//A45820); antígeno proteico principal MPT51 (*M. tuberculosis*); Cpn60-1 chaperona-60 homologa (*M. tuberculosis*) (pir//B47292); antígeno proteico MPT32 (*M. tuberculosis*) (pir//B60274); antígeno proteico MPT46 (*M. tuberculosis*) (pir//D60274); antígeno proteico principal MPT63 (pir//E60274); proteína de regulación de la virulencia (*M. tuberculosis*) (JN0519); proteína AT103 (*M. tuberculosis*) (pir//JN0876); chaperonina 60 beta (pir//JT0902); antígeno Ag 84 (*M. tuberculosis*) (pir//S42804); catalasa peroxidasa (prf//1816341<sup>a</sup>); proteína activa de la tuberculina (TUBE MYCTU/P02944; precursor antigénico lipoproteico 19 KD (19KD MYCTU/P11572 (166).

La estimulación de linfocitos T por antígenos micobacterianos, es un paso esencial en el desarrollo de la inmunidad protectora a micobacterias patógenas. Numerosas proteínas micobacterianas han sido descritas, algunas asociadas a las células y otras secretadas, pero, ¿cuales de estas son potencialmente importantes en el desarrollo de una vacuna ?. Los antígenos específicos que evocan la inmunidad protectora de los linfocitos TH1 aun no son conocidos, sin embargo las micobacteria vivas, generalmente se han reportado como más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica comparada con las preparaciones de micobacterias muertas; esta observación se ha utilizado como argumento de que los antígenos secretados presentes en los CFPE's micobacterianos, producidos por el metabolismo activo bacteriano, son esenciales para la inducción de la inmunidad protectora (167). Estudios realizados sobre la respuesta de células T bovinas a proteínas de lisados y filtrado de cultivo de *M. bovis* BCG, muestran que la respuesta obtenida a partir de ganado vacunado con BCG vivo o muerta, es muy similar a la que se observa hacia los antígenos de lisados, en humanos en un modelo parecido PPD positivos (168, 169). Por otro lado bovinos inmunizados con BCG viable, respondieron a proteínas de filtrado de cultivo, contrariamente al ganado que había recibido BCG muerta la cual no reconoció los CFPE's. La respuesta de ganado inmunizado con BCG viable a proteínas de CFPE's, claramente ha mostrado un alto grado de heterogeneidad en la activación de células T. No obstante la diversidad de la respuesta mostrada, la mayoría ésta dirigida hacia proteínas comprendidas en el rango de 60-80 kDa. El componente principal de estas fracciones de CFPE's tiene un peso molecular de 68 000 (170). Por otro lado se ha observado que una proteína de CFPE de *M. bovis* BCG, evoca una fuerte respuesta de hipersensibilidad retardada en cobayos inmunizados con *M. bovis* BCG vivo comparada con *M. bovis* BCG muerto (171).

Desde hace varios años, se han hecho esfuerzos para construir subunidades vacunales, a fin de proteger contra la tuberculosis, estos esfuerzos se han enfocado principalmente hacia proteínas liberadas por las micobacterias en

un medio sintético. Las proteínas de secreción, se cree son las responsables de la alta eficacia que muestra la vacuna viva de *M. bovis* BCG. Existe un gran número de estudios en donde se han evaluado subunidades a base de proteínas derivadas del filtrado de cultivo (CFPE's) de *M. tuberculosis*, estos estudios han demostrado el desarrollo de una inmunidad protectora en modelos animales de tuberculosis (172, 173), los antígenos de CFPE's son fuertemente reconocidos durante la infección por *M. tuberculosis*, en varios modelos animales (174), así como en estados tempranos de la tuberculosis pulmonar en humanos (175). El CFPE's es pues una fuente de antígenos para el desarrollo de nuevas vacunas y reactivos de diagnóstico.

Por otro lado, se ha encontrado que en los extractos proteicos de filtrado de cultivo obtenidos a partir de tiempos cortos de crecimiento (ST-CFPE), están presentes numerosos componentes, de los cuales muy pocos han sido aislados y caracterizados. Aproximadamente 15 proteínas obtenidas de ST-CFPE se han caracterizado empleando AcM's (176). Los ST-CFPE, se han empleado como fuente de antígenos, en varios estudios experimentales de subunidades vacúnales, y se ha mostrado contienen antígenos, que son reconocidos en las etapas tempranas de la infección de *M. tuberculosis*, tanto en animales como en humanos (177).

El ST-CFPE es una mezcla antigénica compleja, con un gran número de componentes presentes en diferentes concentraciones. Boesen et. al (175), observaron que la respuesta inmune en pacientes con una tuberculosis mínima, se caracterizada por una fuerte respuesta celular reactiva a proteínas del ST-CFPE; principalmente dirigida a proteínas comprendidas en el rango de 5 a 35 kDa. Observaciones similares hicieron Weldingh et. al (178); quienes caracterizaron recientemente 6 proteínas de bajo peso molecular a partir de filtrado de cultivo (CFPE's) *M. tuberculosis*; las proteínas designadas como CFPEP17, CFPEP20, CFPEP21, CFPEP22, CFPEP25 y CFPEP28 fueron capaces de estimular la producción de IFN- $\gamma$  en cantidades significativas e inducir una fuerte respuesta celular. En este estudio se encontró que las proteínas CFPEP22 y CFPEP25 mostraron un peso molecular aparente de 22 kDa, determinado en geles preparativos SDS-PAGE realizados bajo condiciones no reductoras.

Algunos de los antígenos que han mostrado ser importantes en la tuberculosis, son proteínas de secreción que exhiben actividad enzimática, como el complejo antigénico 85 de *M. tuberculosis*, necesario para la síntesis de la pared celular de la bacteria (162). Así, existe fuerte evidencia de que las proteínas de bajo peso molecular secretadas por las micobacterias inducen la proliferación de células T y la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  tanto *in vivo* como *in vitro* (179).

Por otro lado, en geles de poliacrilamida de 2-D, se ha revelado la complejidad antigénica de *M. bovis* BCG, tanto de preparaciones obtenidas por ultrasonificación o de preparaciones obtenidas por destrucción de la célula a altas presiones, como de sobrenadantes de cultivo.

Uno de los antígenos ampliamente estudiados y descritos en *M. bovis*, es la proteína MPB70 la cual exhibe una alta especificidad de especie y ha mostrado ser un antígeno inmonodominante de la bacteria, capaz de inducir una inmunidad celular, estimular una respuesta linfoproliferativa e inducir la producción de anticuerpos en animales infectados por *M. bovis*. La proteína es una de los principales componentes del filtrado de cultivo de *M. bovis* y se considera forma parte del componente activo del PPD bovino (180). Así como *M. tuberculosis*, también se ha encontrado que las proteínas de secreción de bajo peso molecular de *M. bovis*, inducen la proliferación de células T productoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  (181, 182).

Harboe y col (133), encontraron que la MPB80 y MPB70 son formas muy similares del mismo producto genético, con diferencias en su movilidad electroforética; la microheterogeneidad observada para estas proteínas,

se dice, puede deberse a varios grados de glicosilación o a diferencias de carga en las cadenas laterales de sus aminoácidos.

A diferencia de los grandes avances que se tienen en la caracterización de antígenos de *M. tuberculosis* pocos antígenos de *M. bovis* han sido aislados y caracterizados. Además, la caracterización de varios de los antígenos de esta especie se han hecho utilizando la cepa vacunal BCG y muy poca investigación relacionada con cepas de campo de *M. bovis*. La purificación y caracterización de proteínas específicas de *M. bovis*, es esencial para dilucidar tanto los mecanismos de patogenicidad de la bacteria, como los mecanismos inmunes que se desarrollan durante la infección a fin de identificar aquellos antígenos capaces de inducir una inmunidad protectora y aquellos que pueden servir con fines diagnósticos. El trabajo a realizar necesita tomar en cuenta la diversidad genética de la respuesta inmune a los antígenos, pues no todos los animales responden del mismo modo al estímulo antigénico así, hay mucho trabajo de investigación por desarrollar en el campo de la tuberculosis bovina para poder lograr, si no la erradicación de la enfermedad, sí un mejor control de ella.

### **13. PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA INMUNIDAD EN LA TUBERCULOSIS.**

El desarrollo y control de las enfermedades infecciosas, están determinados por la naturaleza dinámica que se establece con los diferentes mediadores producidos localmente por las células que participan en la respuesta inmune y los constituyentes o productos de los microorganismos infecciosos. Los linfocitos T, células que juegan un papel central en la respuesta inmune pueden dividirse en dos diferentes subpoblaciones por el papel de secreción de citocinas que producen, las cuales dictan el papel funcional de las células. Las células Th1 producen principalmente IFN- $\gamma$  e IL-12, citocinas que se asocian con la resistencia a parásitos intracelulares en algunos modelos experimentales (183); mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-6, citocinas necesarias para regular la síntesis de anticuerpos y promover la proliferación de eosinófilos y células cebadas (184). Ambas poblaciones celulares producen IL-3, factor estimulante de la colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y TNF. En el curso de la respuesta inmune a un patógeno específico, las células Th1 y Th2, ejercen una influencia reguladora que finalmente favorece el predominio de una subpoblación. En modelos murinos se ha observado que el IFN- $\gamma$  producido por las células Th1 inhibe la proliferación de las células Th2; mientras que la IL-10 producida por estas últimas inhibe la síntesis de las citocinas producidas por las células Th1.

La resistencia inmunológica a la infección micobacteriana en el ratón se dice esta mediada por células Th1 altamente productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2; mientras que la susceptibilidad en esta especie se asocia con células que producen niveles altos de IL-4 y niveles bajos de IFN- $\gamma$  e IL-2 (185). Además, hay evidencias de que los ratones cuyo gen del IFN- $\gamma$  ha sido deletado, es susceptible a la infección con *M. bovis* (186, 187).

En el humano las células T exhiben también una dicotomía en el patrón de producción de citocinas similar a la de las células T murinas, pero a diferencia de esta especie, la IL-10 es producida por ambas subpoblaciones celulares y puede inhibir la proliferación celular y la secreción de las citocinas de ambos tipos de células (188, 189). Estudios realizados para evaluar la producción de citocinas en células T humanas en respuesta a antígenos

se dice, puede deberse a varios grados de glicosilación o a diferencias de carga en las cadenas laterales de sus aminoácidos.

A diferencia de los grandes avances que se tienen en la caracterización de antígenos de *M. tuberculosis* pocos antígenos de *M. bovis* han sido aislados y caracterizados. Además, la caracterización de varios de los antígenos de esta especie se han hecho utilizando la cepa vacunal BCG y muy poca investigación relacionada con cepas de campo de *M. bovis*. La purificación y caracterización de proteínas específicas de *M. bovis*, es esencial para dilucidar tanto los mecanismos de patogenicidad de la bacteria, como los mecanismos inmunes que se desarrollan durante la infección a fin de identificar aquellos antígenos capaces de inducir una inmunidad protectora y aquellos que pueden servir con fines diagnósticos. El trabajo a realizar necesita tomar en cuenta la diversidad genética de la respuesta inmune a los antígenos, pues no todos los animales responden del mismo modo al estímulo antigénico así, hay mucho trabajo de investigación por desarrollar en el campo de la tuberculosis bovina para poder lograr, si no la erradicación de la enfermedad, si un mejor control de ella.

### **13. PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA INMUNIDAD EN LA TUBERCULOSIS.**

El desarrollo y control de las enfermedades infecciosas, están determinados por la naturaleza dinámica que se establece con los diferentes mediadores producidos localmente por las células que participan en la respuesta inmune y los constituyentes o productos de los microorganismos infecciosos. Los linfocitos T, células que juegan un papel central en la respuesta inmune pueden dividirse en dos diferentes subpoblaciones por el papel de secreción de citocinas que producen, las cuales dictan el papel funcional de las células. Las células Th1 producen principalmente IFN- $\gamma$  e IL-12, citocinas que se asocian con la resistencia a parásitos intracelulares en algunos modelos experimentales (183); mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-6, citocinas necesarias para regular la síntesis de anticuerpos y promover la proliferación de eosinófilos y células cebadas (184). Ambas poblaciones celulares producen IL-3, factor estimulante de la colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y TNF. En el curso de la respuesta inmune a un patógeno específico, las células Th1 y Th2, ejercen una influencia reguladora que finalmente favorece el predominio de una subpoblación. En modelos murinos se ha observado que el IFN- $\gamma$  producido por las células Th1 inhibe la proliferación de las células Th2; mientras que la IL-10 producida por estas últimas inhibe la síntesis de las citocinas producidas por las células Th1.

La resistencia inmunológica a la infección micobacteriana en el ratón se dice esta mediada por células Th1 altamente productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2; mientras que la susceptibilidad en esta especie se asocia con células que producen niveles altos de IL-4 y niveles bajos de IFN- $\gamma$  e IL-2 (185). Además, hay evidencias de que los ratones cuyo gen del IFN- $\gamma$  ha sido deletado, es susceptible a la infección con *M. bovis* (186, 187).

En el humano las células T exhiben también una dicotomía en el patrón de producción de citocinas similar a la de las células T murinas, pero a diferencia de esta especie, la IL-10 es producida por ambas subpoblaciones celulares y puede inhibir la proliferación celular y la secreción de las citocinas de ambos tipos de células (188, 189). Estudios realizados para evaluar la producción de citocinas en células T humanas en respuesta a antígenos

micobacterianos, muestran resultados contradictorios; mientras que algunos autores apreciaron que muchas de las clonas de células T CD4<sup>+</sup> reactivas a *M. tuberculosis* tienen un perfil de secreción Th1, otros autores reportan clonas de células T con un amplio espectro de producción de citocinas incluyendo IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 (190, 191). Considerando estas discrepancias Zhang y col. (192), evaluaron la expresión de citocinas en células mononucleares de pacientes tuberculosos y personas sanas reactivas a la tuberculina, estimuladas con *M. tuberculosis in vitro*, en estos grupos la expresión de IL-4 e IL-10 fue similar; sin embargo las células mononucleares de pacientes tuberculosos presentaron una producción y expresión reducidas de IFN- $\gamma$  e IL-2 con relación a las personas reactivas a la tuberculina, lo cual sugiere que la susceptibilidad a la enfermedad se asocia con una respuesta tipo Th1 deprimida más que con una incrementada respuesta tipo Th2, como se sugirió por otros investigadores. Las discrepancias en los estudios realizados pueden ser resultado de los diferentes métodos experimentales y los efectos de las condiciones de cultivos *in vitro*, que no reflejan los eventos que se producen *in vivo*; lo cual motiva que otros investigadores hayan querido evaluar la producción de citocinas en el sitio de la enfermedad. De este modo Barnes y col. (193), encontraron que la expresión de RNAm de IL-4 es más baja en líquido pleural que en sangre. Estas observaciones proveen evidencia de que se produce una acumulación selectiva de células tipo Th1 en el sitio de la enfermedad en pacientes con una respuesta inmune resistente y confirman que este tipo de células tienen un papel importante en las defensas antimicobacterianas en el humano. La definición de cuales son los mecanismos que promueven un patrón de respuesta tipo Th1 en la tuberculosis, es uno de los principales desafíos para los investigadores en esta área. Para muchas enfermedades infecciosas, se sospecha que la producción local de los mediadores solubles de la respuesta inmune influye en la producción de un patrón particular de secreción de citocinas de las células T. De esta manera se ha determinado que los macrófagos infectados *in vitro* con *M. tuberculosis* liberan citocinas inflamatorias que promueven el reclutamiento de células mediadoras de la inflamación y la activación de las propias células infectadas. Las citocinas secretadas por los macrófagos como la IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 ayudan a promover una respuesta tipo Th1 al inicio de la infección (194). A nivel de macrófagos existe evidencia de que el TNF- $\alpha$  y la IL-12 son moléculas reguladoras claves en la inmunidad celular, pues se sabe que el TNF contribuye al desarrollo e integridad del granuloma y puede sumar sus efectos con los del IFN- $\gamma$  para promover la destrucción de las bacterias intracelulares. En tuberculosis humana se ha observado que los macrófagos alveolares y las células mononucleares producen gran cantidad de TNF en respuesta a *M. tuberculosis* y a ciertos componentes específicos de la bacteria, como la lipoarabinomana y algunas proteínas de 20, 44, 58 y 65 kDa (195, 196, 197, 198), indicando con ello la influencia de los componentes bacterianos en la producción de las diferentes citocinas. La IL-2 producida por los macrófagos en el sitio de la enfermedad no solo favorecen la proliferación y expansión de las células Th1 específicas a antígenos micobacterianos, sino que incrementa la citotoxicidad y proliferación de las células T citolíticas y células NK (199, 200). Esta interleucina induce la expansión de las células T citolíticas solo cuando hay una estimulación antigénica específica, a diferencia de la IL-2 e IL-7 que pueden inducir la proliferación de las células T citotóxicas en presencia o ausencia del antígeno (201). La IL-18 es una citocina novel que exhibe funciones biológicas similares a las de la IL-12 y por ende tiene influencia en el curso de la infección micobacteriana. Este hecho se comprobó cuando se inocularon ratones Knock out en el gen de la IL-18 con *M. bovis*, los animales infectados desarrollaron marcadas lesiones granulomatosas; mientras que en otro grupo de estos mismos ratones la administración exógena de IL-18 redujo significativamente la presencia de la enfermedad (202). En tuberculosis bovina se ha tratado de determinar si la

resistencia a la enfermedad esta asociada también con la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, inoculando bovinos con *M. bovis* y evaluando después de varias semanas de infección la expresión de RNAm de IFN- $\gamma$  e IL-2 en células mononucleares de sangre periférica. La expresión y secreción de estas citocinas fue altas en animales que mostraron pequeñas lesiones, como en animales que no desarrollaron ningún tipo de lesión. La correlación de la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 con otros parámetros para evaluar la inmunidad intradérmica al PPD y la determinación de niveles de anticuerpos, sugieren fuertemente que las citocinas mencionadas juegan un papel importante en la respuesta inmune a la tuberculosis bovina. Sin embargo, debe realizarse un mayor número de investigaciones en tuberculosis bovina para poder describir que componentes micobacterianos, pueden favorecer una respuesta inmune tipo Th1 con el propósito no solo de desarrollar mejores y nuevas vacunas sino también de comprender los mecanismos inmunes dinámicos que se establecen entre la bacteria y las células que participan en la respuesta inmune (203).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Mycobacterium bovis* es el agente etiológico de la tuberculosis bovina, enfermedad que se considera uno de los problemas más serios en salud animal, debido no solo a los efectos que sobre la ganadería nacional tiene, sino porque representa un riesgo de infección al humano. Situación que ha suscitado la investigación en el desarrollo de mejores y eficientes vacunas, así como en el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico, que ayudarían enormemente a conseguir un mejor control de la enfermedad.

Tales desarrollos, sin embargo, no se pueden alcanzar sin hacer una disección y estudio de los componentes micobacterianos aislados, que conduzca a un mejor entendimiento del establecimiento y evolución de la enfermedad, así como en la evaluación del tipo de respuesta inmune que inducen; considerando que una inmunidad protectora hacia este microorganismo se favorece con la estimulación de células T específicas productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Th1). Los antígenos del CFPE de la bacteria pueden favorecer la inducción de este tipo de inmunidad. Sin embargo, en tuberculosis bovina poca investigación se ha realizado, para identificar cual o cuales de ellos son inmunológicamente importantes para este propósito.

## OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Obtener antígenos inmunodominantes de *M. bovis*, que estimulen a linfocitos T.
- ❖ Determinar y correlacionar la respuesta celular, determinando la expresión de IFN- $\gamma$  hacia antígenos definidos de *M. bovis*.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar el perfil electroforético de los extractos proteicos de filtrados de cultivo de *M. bovis*.
2. Separación de proteínas de sobrenadantes de medio de cultivo de *M. bovis* de acuerdo a sus puntos isoelectrónicos (pI).
3. Evaluar las diferentes fracciones obtenidas mediante el isoelectroenfoque de los CFPE de *M. bovis*; así como varias proteínas purificadas de estas fracciones, en su capacidad para inducir la producción de IFN- $\gamma$  en animales sanos y enfermos.
4. Determinar el efecto de dos proteínas purificadas de *M. bovis* sobre la relación de linfocitos T CD4 /CD8 en animales PPD positivos y PPD negativos.

## OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Obtener antígenos inmunodominantes de *M. bovis*, que estimulen a linfocitos T.
- ❖ Determinar y correlacionar la respuesta celular, determinando la expresión de IFN- $\gamma$  hacia antígenos definidos de *M. bovis*.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar el perfil electroforético de los extractos proteicos de filtrados de cultivo de *M. bovis*.
2. Separación de proteínas de sobrenadantes de medio de cultivo de *M. bovis* de acuerdo a sus puntos isoeléctricos (pI).
3. Evaluar las diferentes fracciones obtenidas mediante el isoelectroenfoque de los CFPE de *M. bovis*; así como varias proteínas purificadas de estas fracciones, en su capacidad para inducir la producción de IFN- $\gamma$  en animales sanos y enfermos.
4. Determinar el efecto de dos proteínas purificadas de *M. bovis* sobre la relación de linfocitos T CD4 /CD8 en animales PPD positivos y PPD negativos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## I. CULTIVO DE *M. bovis* Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE FILTRADO DE CULTIVO.

La cepa de micobacteria que se empleo en este estudio fue *M. bovis* AN5, donada por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). La cepa *M. bovis* AN5 fue mantenida en medio de Lowenstein-Jensen o en medio de Stonebrink-Lesslie (203). Para el análisis electroforético de las proteínas presentes en sobrenadantes de cultivo, se cultivó la micobacteria en medio líquido sintético de Dorser-Henley modificado (204). El medio de cultivo se distribuyó en cantidades de 1 litro en frascos con capacidad de 2 litros, estos frascos fueron inoculados con semilla de *M. bovis*, e incubados a 37 ° C, durante sexta y décima semana (205). Al terminar los diferentes periodos de incubación los cultivos se filtraron a través de una malla de alambre N° 85 (178 µm de apertura), para separar la mayor cantidad de masa bacteriana. El líquido residual se paso a través de filtros de asbesto y celulosa (Carlson Ford 1/1250 BK9 o Seitz K2), posteriormente se filtró a través de papel filtro Whatman # 3 y por último se emplearon filtros millipore (Millipore Corp. , Bedford, Mass) de 1.2, 0.45 y 0.22 µm. Las proteínas presentes en los filtrados de cultivo se precipitaron con cristales de sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>] a una saturación final del 80 %, con agitación constante a 4° C por 24 horas. También se realizaron precipitaciones secuenciales con saturaciones del 30, 40, 50 y 60 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (206). Al término de este tiempo, la solución se centrifugó a 4° C por 60 minutos a 10 000 r.p.m. (Beckman rotor JS-13.1) para empaquetar el precipitado, el cual fue resuspendido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 y posteriormente dializado exhaustivamente contra PBS, en bolsas de diálisis (Spectra/Por No 3787-D40) con punto de corte de 12 a 14 kDa, a 4° C durante 36 horas con 4 cambios de 2 litros cada uno. Después del dializado se comprobó la ausencia de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> agregando cloruro de bario. El material así obtenido se designo como extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteína de los CFPE se determinó por el método de Bradford, para fines prácticos esta concentración se ajusto a 35.0 µg/ml de proteína y se dividió en alícuotas de 1 ml, las cuales se almacenaron a - 70 ° C hasta su empleo (207).

## II. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE CFPE DE *M. bovis* EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Las proteínas presentes en los CFPE de las diferentes semanas de cultivo se sometieron a un análisis electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), bajo condiciones reductoras de acuerdo al método descrito por Laemmli (208, 209). Se utilizó un sistema de geles discontinuo con un gel concentrador al 4 % y un gel separador al 15.0 % de acrilamida. Se colocaron 50 µl (15 µg de proteína) de cada uno de los CFPE en los carriles correspondientes y proteínas con peso molecular como estándares. Los corrimientos se efectuaron a 200 V constante, usando una solución buffer de Tris-glicina pH 8.3 con SDS al 0.1 %. Los geles se tifieron con azul de Coomassie R-250 al 0.2 % y se destifieron con una mezcla de ácido acético / metanol, o bien se teñían con nitrato de plata según el método de Merrill y cols. (210, 211).

### III. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS DE PUNTO ISOELECTRICO.

Una estrategia alternativa para la purificación de proteínas, es su separación por medio de la propiedad característica de su punto isoelectrónico a partir de mezclas complejas de las mismas. Cuando las proteínas se someten a una separación electroforética en un gradiente de pH autogenerado y preformado, migran a través de este hasta alcanzar el pH al cual su carga neta es cero, es decir hasta alcanzar su punto isoelectrónico (pI), metodología conocida como isoelectroenfoque; la separación puede llevarse en solución empleando una celda Rotofor (BIO-RAD). La separación en este sistema se realiza en condiciones no desnaturizantes, ofreciendo la ventaja de que las proteínas mantienen su estado nativo y funcionalidad. La cámara de enfoque del aparato esta dividida en 20 compartimientos en los cuales se establecen las zonas de enfoque o gradiente de pH, inicialmente se utiliza un gradiente de pH 3-10, bajo el cual proteínas con pI similares pueden localizarse en una fracción. Las proteínas separadas en este gradiente, pueden reenfoquearse nuevamente utilizando gradientes de pH mas estrecho, lo que permite la semipurificación de proteínas con pI cercanos (212, 213, 214). Para el isoelectroenfoque de las proteínas presentes en el CFPE se estableció primero el gradiente de pH 3-10, colocando en la cámara de enfoque una mezcla de 2.5 ml de una solución de anfolitos 3-10 pH, 10 ml de glicerol y 30 ml de agua bidestilada; el recipiente del ánodo se lleno con una solución de  $H_3PO_4$  0.1 M; mientras que en la cámara del cátodo se lleno con NaOH 0.1 M, se estableció una precorrida a 12 W constante por una hora. Posteriormente se colocaron 15 ml del CFPE en la cámara de enfoque y se corrió a 12 W constante por un espacio de 5 - 6 horas a 4° C. Después de este tiempo se colectaron las 20 fracciones por aspiración con la ayuda de un cosechador diseñado para este propósito. En todas las separaciones por isoelectroenfoque se determino el pH individual de cada fracción para determinar si había establecido el gradiente de pH.

Los anfolitos presentes en las fracciones se eliminaron adicionando 100 mg de NaCl por mililitro de muestra de cada fracción; el exceso de sales y anfolitos se elimino dializando contra Tris 50 mM y NaCl 45 mM pH 7.2 a 4° C, empleando una membrana con punto de corte de 3500 daltones (Spectra/Por No 3787-D40). También se realizo un isoelectroenfoque empleando un rango de pH 2.5-8.0. Las proteínas de algunas fracciones seleccionadas fueron purificadas por electroforesis de elución continua, utilizando un equipo de electroforesis preparativa (BIO-Rad Model 491 Prep Cell).

Las diferentes fracciones obtenidas por isoelectroenfoque y las proteínas aisladas por refraccionamiento o por electroforesis de elución continua, fueron empleadas para estimular células periféricas mononucleares obtenida de vacas PPD (+) y PPD (-).

### IV. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (BOVINOS).

Para determinar el reconocimiento antigénico hacia las proteínas presentes en el CFPE de *M. bovis* en animales con prueba intradérmica francamente positiva, moderada y negativa al PPD bovino, así como evaluar algunas de estas proteínas en su capacidad para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  en células sensibilizadas obtenidas de los diferentes grupos. Se seleccionaron animales bovinos de la raza Friesian-Holstein, pertenecientes a dos establos lecheros, uno de ellos localizado en el municipio de Coacalco, Edo de México, con cerca de 800 animales en producción y el otro en el municipio de Cuatlitlán-Izcalli, Edo de México, en las instalaciones del rancho de la

FES-Cuatitlán-UNAM propiedad de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia con un total de 59 animales (Fig. 2). La prevalencia determinada de tuberculosis en los establos fue de 60 y 55 % para el primero y segundo respectivamente. Del primer establo se seleccionaron 31 animales por los parámetros de baja producción lechera y estado físico general disminuido; bajo estas condiciones los animales regularmente se envían al rastro, hecho que brinda oportunidad para confirmar la presencia de la enfermedad y evaluar el grado de lesiones. Del segundo establo se trabajó prácticamente con todos los animales. Antes de que los animales se enviarán a rastro, se obtuvo sangre heparinizada de varios de los animales con el propósito de realizar los estudios de estimulación *in vitro*. Al momento del sacrificio, se realizó una inspección minuciosa para determinar la presencia de lesiones sugestivas de tuberculosis, así como llevar a cabo la toma de muestras para el aislamiento de las micobacterias, y en algunos de los casos el estudio histopatológico y la aplicación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específica para el complejo *M tuberculosis* en muestras de tejido.



Fig. 2 Instalaciones del rancho de la Facultad de Estudios Superiores UNAM, explotación lechera con 59 bovinos de la raza Friesian-Holstein.

## V. PRUEBA DE INTRADERMORREACCIÓN.

Con la finalidad de identificar el grado de reactividad que mostraban los diferentes animales en estudio hacia el PPD bovino, se aplicó la prueba doble comparativa como lo marcan las normas establecidas por la Campaña Nacional de Tuberculosis; se inoculó intradérmicamente en la tabla del cuello con ayuda de jeringas dosificadoras 0.1 ml de PPD bovino y 0.1 ml de PPD aviar. La inoculación se realizó al mismo tiempo y en sitios próximos uno del otro. La lectura de la reacción se evaluó midiendo a las 72 h, con un vernier, el aumento en el grosor de la piel por la induración que se produce en respuesta al PPD. Los criterios para considerar a los animales como positivos, sospechosos o negativos al PPD se aplicaron de acuerdo a como lo marca la Norma Oficial: a) si la induración producida en el sitio de inoculación del PPD bovino es mayor a cuatro mm o más a la que se produce en el sitio de inoculación del PPD aviar, el animal se considera positivo; b) si la induración que se produce en respuesta al PPD bovino es entre uno y cuatro mm mayor que la medida del PPD aviar, el animal se considera sospechosos y c) si la induración en la zona del PPD bovino es igual o dos mm menor que la del PPD aviar el animal se considera negativo; el animal también se considera negativo si no presenta ninguna induración (215, 216).

## VI. AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO.

Las muestras de tejido colectadas en rastro de los animales en estudio, como: nódulos linfáticos retrofaríngeos, bronquiales, mediastínicos, traqueales y en algunas ocasiones de pulmón, se colocaron en viales de plástico conteniendo solución saturada de borato de sodio; las muestras se trasladaron al laboratorio de Bioseguridad del Departamento de Microbiología de la FMVZ-UNAM. Para intentar el aislamiento y cultivo de las micobacterias, en los medios de Löwestein-Jensen y Stonebrink (ver sección de anexo), muestras de 2 gs. de tejido se colocaron en morteros que contenían 20 ml de una solución de hipoclorito de sodio 1:1000 durante 30 min., con la finalidad de solubilizar las grasas y eliminarlas por decantación, las muestras se maceraron por 15 minutos y se les agregó 10 ml de rojo de fenol, se tomaron 7 ml del macerado en solución y este se colocó en un tubo de 50 ml, al cual se le había agregado 5 ml de hidróxido de sodio al 0.5 N; se incubó durante 10 min. y posteriormente se agregó HCl 6.0 N gota a gota hasta que la mezcla tuvo un color amarillo, acto seguido se centrifugo a 1700 r.p.m. (Beckman rotor JS-13.1) durante 20 min. El líquido se descarto y el sedimento se resuspendió en 1 ml PBS estéril, se inocularon 2 tubos con medio de Löwestein-Jensen sin glicerina y 2 tubos con medio de Stonebrink. Los tubos inoculados se incubaron a 37 °C y cada semana se examinaban hasta observar las colonias características de las micobacterias, de las colonias sospechosas se realizaron frotis los cuales se tiñeron por Ziehl-Neelsen (Fig. 3), para poder determinar si estas eran micobacterias (ver anexo). La identificación de las micobacterias se realizó de acuerdo a sus reacciones bioquímicas a las pruebas de niacina, catalasa, nitratos y pigmentación de la colonia (217).



Fig. 3.- Observación de micobacterias Ziehl-Neelsen de un animal positivo a la prueba de la tuberculina.

## VII. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.

De los animales que resultaron INTRADERMORREACCIÓN positivo o aquellos que presentaban lesiones compatibles con tuberculosis, se tomaron muestras de tejido de 1 cm<sup>3</sup> depositándolas en una solución de formalina al 10 % pH 7.2, y posteriormente fueron incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 4 µm de grosor que fueron teñidas por la técnica de hematoxilina y eosina (H-E), para su evaluación histológica. Considerando en el análisis el aspecto microscópico en los diferentes tejidos afectados como tipo y grado de respuesta inflamatoria, presencia o ausencia de necrosis y calcificación.

Los criterios a considerar en el análisis histopatológico fueron: Tipo I: lesión constituida por infiltrado de células mononucleares, principalmente macrófagos, células epitelioides y células gigantes (Fig. 5); Tipo II: lesión donde se observa necrosis y calcificación en diferente grado, rodeada por células mononucleares, sin que este se encuentre delimitado por tejido conectivo fibroso (Fig. 6); y el Tipo III: lesiones que se caracterizan por elementos del tipo II, solo que los procesos inflamatorios y de necrosis se encuentran bien delimitados por una gruesa capa de tejido conectivo fibroso, constituyendo un granuloma típico (Fig. 7).



Fig. 4. Seguimiento de animal al rastro, ilustración que corresponde a múltiples granulomas del tipo I y III (tubérculo), de diversos tamaños con calcificaciones en varios sitios anatómicos.



Fig. 5. Linfadenitis granulomatosa tipo I. Se muestra un foco con abundantes macrófagos y células epitelioides. La flecha nos muestra la formación de células gigantes tipo Langhans (Tinción HE x 400).



Fig. 6.- Linfadenitis granulomatosa tipo II. Sección de linfonódulo con áreas extensas de necrosis (Nc) y calcificación moderada (Ca), rodeada de macrófagos, células epitelioides, Las flechas nos indican la presencia de células gigantes (HE x 100).



Fig. 7 . Linfadenitis granulomatosa tipo III. Se observa un área extensa de necrosis caseosa central (Nc), focos de calcificación (Ca), rodeada de células mononucleares, delimitados por una cápsula de tejido fibroso (\*). En la periferia se observa tejido linfoide reactivo y la formación de un granuloma tipo I (HE x 25).

## VIII. IDENTIFICACIÓN DEL complejo *M. tuberculosis* en tejido por PCR.

La presencia de micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, en las muestras de tejido de los animales sacrificados se determinó mediante la técnica de PCR, desarrollada por Wilton y col (218). Los iniciadores empleados en la reacción fueron el TB1-A (5' GAACAATCCGGAGTTGACAA3') y el TB1-B (5' AGCACGCTGTCAATCATGTA3'), que amplifican una región de 372 pb del gen que codifica para la proteína de secreción MPB70 de *M. bovis*.

Como controles del producto de amplificación se utilizaron cepas de referencia de *M. bovis* AN5, *M. avium* D4 (donadas por la PRONABIVE) y *M. tuberculosis* H37Rv (ATTC). La extracción del ADN de las micobacterias se realizó de acuerdo al método descrito por van Soolingen y col (219), brevemente, de los cultivos de las bacterias se tomaron 4 asadas, las cuales colocaron en tubos conteniendo 400  $\mu$ l de solución amortiguadora de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), la suspensión se calentó a 94 ° C por 10 minutos con el propósito de inactivar a las micobacterias; posteriormente se adiciono 50  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml) e incubo a 37 ° C toda la noche, después de este tiempo de incubación se agregó 75  $\mu$ l de SDS al 10 % y 5  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml), incubando a 65 ° C por 10 min. Posteriormente se agregó 100  $\mu$ l de NaCl 5 M, agitando la mezcla, en seguida se adicionó 80  $\mu$ l de bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (CTAB) al 10 % y NaCl al 4 %, nuevamente se agitó la mezcla y se incubó a 65 ° C durante 10 min. Después de este tiempo se adicionó un volumen igual de alcohol isoamílico-cloroformo (1:24), se agito por 10 scg., y cntrífugo a 14 000 r.p.m. (38,340 g) por 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y estéril y se agregó 600  $\mu$ l de isopropanol, la mezcla se dejo en reposo a - 20 ° C por 30 min, posteriormente se centrifugo a 14 000 r.p.m por 10 min; seguido se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavo 2 veces con 500  $\mu$ l de etanol al 70 % frío y una vez con etanol absoluto frío, centrifugando a 14 000 r.p.m. por 5 min, finalmente el ADN se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua Milli- Q (218, 220).

La extracción del ADN de las muestras de tejido se llevo a cabo homogeneizando un gramo de muestra en 9 ml de amortiguador TE, posteriormente se transfirieron 450  $\mu$ l del homogeneizado a un microtubo y se adicionó 50  $\mu$ l de lisozima e incubo a 37 ° C por una hora, después de este tiempo de incubación se agregó 100 $\mu$ l de SDS al 10 %

y 6  $\mu$ l de proteinasa K, incubando a 65 ° C por 10 min. El procedimiento a seguir a partir de este paso, fue similar al descrito anteriormente para las cepas micobacterianas.

La reacción de PCR se efectuó empleando 0.2 mM de dNTP, 1  $\mu$ M de oligonucleotidos, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1.25 U de la enzima Taq polimerasa. El programa establecido para la amplificación consistió de una fase inicial de precalentamiento a 94 ° C por 5 min, seguida de una fase de desnaturalización a 94 ° C por 30 seg, y de alineación e hibridación a 58 ° C por 3 min, y extensión a 75 ° C por 3 min, después de 40 ciclos de amplificación, siguió una fase de enfriamiento a 4° C por tiempo indefinido. Los productos de amplificación, se visualizaron por medio de luz ultravioleta en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio (221, 222, 223).

## **IX. ANALISIS DE INMUNOTRANSFERENCIA.**

Para el análisis de inmunotransferencia, se realizaron corrimientos electroforéticos de los CFPE en un sistema de geles de poliacrilamida discontinuo, utilizando un gel separador al 10 % y un gel concentrador al 3 % bajo condiciones no reductoras; después de la separación electroforética las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m (BA85R597 Schleicher and Schuell), de acuerdo a la metodología descrita por Towbin (224). Se utilizó un buffer de transferencia y se aplicó un voltaje constante de 60 V durante 90 minutos. Después de la transferencia, se bloquearon los sitios libre de la membrana incubándola con una solución de albúmina al 1 % a temperatura ambiente por espacio de una hora; posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos, con PBS-Tween 20 al 0.3 % pH 7.2. Se cortaron tiras de 5 mm de ancho de la membrana, para incubarlas con los sueros de los diferentes grupos de animales; los sueros se diluyeron 1:100 en PBS-Tween 20 al 0.3 %. Se incubaron tiras individuales con cada uno de los diferentes sueros diluidos a temperatura ambiente por espacio de una hora, y después de este tiempo las tiras se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.3 %, se adicionó una anti-IgG-bovino conjugada con peroxidasa, diluida 1:5000 y se incubó por dos horas a temperatura ambiente, seguido se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.3 % y se reveló añadiendo el sustrato de la enzima, 4-cloro 1 naftol - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (225).

## **X. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVO DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS, ESTIMULADOS CON FRACCIONES SEPARADAS POR ISOELECTROENFOQUE DEL CFPE DE *M. bovis*.**

Se realizaron varios ensayos para evaluar las diferentes fracciones separadas por isoelectroenfoque del CFPE, en su capacidad para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  en cultivo de sangre completa de bovinos fuertemente reactivos al PPD bovino, moderadamente reactivos y negativos a este.

En el primer ensayo, se trabajó con 9 animales del hato lechero localizado en el Municipio de Cuatitlán-Izcalli, los cuales se seleccionaron únicamente por el grado de reactividad que mostraron al PPD bovino; de estos tres fueron fuertemente reactivos, tres presentaron una respuesta moderada y tres se consideraron negativos a la prueba. Para este ensayo se obtuvo sangre heparinizada de los animales, la cual se trabajó dentro de las primeras 2 horas de haberse obtenido. La sangre se distribuyó en condiciones de esterilidad, en placas de 24 pozos a razón de 1.5 ml

de sangre por pozo, considerando once fracciones a evaluar, el CFPE crudo y los controles que en este caso fueron PPD de *M. bovis*, PPD de *M. avium*, lectina de *Canavalia eusiformis* y un pozo con sangre sin estimular. Se depositó en los diferentes pozos 10  $\mu$ l de la fracción correspondiente (2  $\mu$ g proteína en el volumen total del cultivo), 10  $\mu$ g de CFPE, 10  $\mu$ g de PPD de *M. bovis*, 10  $\mu$ g de PPD de *M. avium* y 5  $\mu$ g de lectina de *Canavalia eusiformis* (Sigma Chemical). Las placas se incubaron por 24 horas a 37 ° C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y después de este tiempo las placas se centrifugaron a 1500 r.p.m (Beckman. TJ-6) por 10 minutos. Se colectó el plasma de los diferentes pozos, los cuales se depositaron en crioviales que se mantuvieron a - 20 ° C, para posteriormente evaluar la producción de IFN- $\gamma$ , empleando un ensayo de ELISA.

En un segundo ensayo se trabajaron con cuatro animales de los cuales se conocía su reacción a la prueba intradérmica de la tuberculina, así como los niveles de secreción de IFN- $\gamma$  en cultivo de células de sangre periférica estimuladas *in vitro* con PPD de *M. bovis* y PPD de *M. avium*; y sus niveles de anticuerpos determinados por un ensayo de ELISA comparativo utilizando como antígeno PPD de *M. bovis* y PPD de *M. avium*. Antes de que estos animales se sacrificaron para evaluar el grado de lesiones tuberculosas que presentaban y llevar a cabo la comprobación de la infección micobacteriana por cultivo y prueba de PCR, se colectó sangre de los animales, para estimular sus células de sangre periférica con las veinte diferentes fracciones separadas por isoelectroenfoque en el rango de pH 3.0-10.0. La estimulación se efectuó como se indicó anteriormente, utilizando placas de 24 pozos y depositando 1.5 ml de sangre completa por pozo; se adicionó 10  $\mu$ l (2 $\mu$ g/ml de contenido proteico), de las diferentes fracciones a los pozos. Después del tiempo de incubación, se colectaron los plasmas y estos se mantuvieron a - 20 ° C, para posteriormente evaluar la producción de IFN- $\gamma$ .

En el tercer ensayo, se empleó un total de 40 animales, a los cuales se les practicó la prueba intradérmica de la tuberculina y determinó la relación de producción de IFN- $\gamma$  en cultivo de sangre completa estimulada con PPD de *M. bovis* y PPD de *M. avium*. Antes de que los animales se sacrificaran, para determinar y evaluar las lesiones tuberculosas que presentaban por inspección, se colectó sangre, con el propósito de estimular las células de sangre completa con las 20 diferentes fracciones separadas por isoelectroenfoque en el rango de pH 3.0-10.0. Después de haber determinado la presencia y grado de lesión al momento del sacrificio, fue posible agrupar a estos animales en 5 grupos, bajo los criterios de respuesta al PPD de *M. bovis*, presencia de lesiones y aislamiento micobacteriano. Los animales se agruparon como sigue: Grupo A (n=12) animales sanos, PPD negativos, sin lesiones y aislamiento negativo; Grupo B (n= 8) animales PPD positivos, sin lesiones aparentes y sin aislamiento; Grupo C (n=8) animales PPD positivos, con pocas lesiones y aislamiento positivo; Grupo D (n=8 animales PPD positivos con lesiones moderadas y aislamiento positivo; Grupo E (n=4) animales anérgicos, PPD negativos, con abundantes lesiones tuberculosas y aislamiento positivo.

## **XI. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS ESTIMULADOS CON PROTEÍNAS PURIFICADAS DEL CFPE DE *M. bovis*.**

Dos proteínas purificadas por refraccionamiento en el equipo de isoelectroenfoque, utilizando el mismo gradiente de pH de la misma muestra; fueron utilizadas para evaluar su capacidad para inducir la liberación de IFN- $\gamma$  en cultivo de sangre completa. Las proteínas exhiben un mismo peso molecular aparente, pero diferente punto isoelectrónico. Para este ensayo se trabajó con 5 animales reactivos al PPD bovino y 5 animales no reactivos. Los

cultivos se efectuaron como se indicó antes, empleando placas de 24 pozos y depositando 1.5 ml de sangre por pozo, 10  $\mu$ l de solución de las diferentes proteínas purificadas (2  $\mu$ g / ml), se depositaron en los pozos correspondientes, las placas se incubaron por 24 horas a 37 ° C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se colectaron los plasmas de los diferentes pozos, los cuales se almacenaron a - 20 ° C, hasta el momento de evaluar el IFN- $\gamma$ .

Por electroforesis de elución continua, también fue posible aislar 7 proteínas a partir de la fracción N° 4, obtenida por isoelectroenfoque empleando un rango de pH 3.0-10.0. Estas proteínas también fueron evaluadas en su capacidad para inducir la liberación de IFN- $\gamma$  en cultivo de sangre completa, empleando 5 animales reactivos positivos al PPD bovino y 5 animales no reactivos. Las condiciones de cultivo fueron similares a las previamente descritas y la estimulación antigénica se realizó adicionando 10  $\mu$ l (2  $\mu$ g / ml), de las diferentes proteínas. Después del tiempo de incubación los plasmas se colectaron y almacenaron a - 20 ° C. El IFN- $\gamma$  liberado, se evaluó mediante un ensayo inmunoenzimático.

## XII. ENSAYO DE IFN- $\gamma$ .

El IFN- $\gamma$  liberado en los plasmas sobrenadantes de los cultivos, se midió usando un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich (ELISA), descrito por Rothel y col. (226, 227). (Bovine  $\gamma$  interferon Test, Herd Check, IDEXX, USA); cuyo nivel de detección es de 25 pg / ml de IFN- $\gamma$  bovino recombinante. Se adicionaron 100  $\mu$ l de plasma a evaluar por pozo a las placas de microtitulación sensibilizadas con un primer anticuerpo monoclonal específico para el IFN- $\gamma$  bovino; después de una incubación de 60 minutos y un lavado exhaustivo, se adicionó un segundo anticuerpo monoclonal específico conjugado con peroxidasa y se incubó por una hora, posteriormente las placas se lavaron para eliminar el conjugado no ligado y finalmente se adicionó el sustrato enzimático (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el cromógeno tetrametilbencidina (TMB), incubándose por 30 minutos antes de detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector de ELISA marca Bio-Tek, empleando un filtro de 450 nm (228, 229, 230, 231). Los resultados se expresaron gráficamente, considerando los cambios en la densidad óptica a 450 nm (O.D.<sub>450</sub>), de los sobrenadantes de cultivo estimulados con los respectivos fracciones o antígenos purificados menos la O.D.<sub>450</sub> de los sobrenadantes de cultivo sin estimular en cada animal evaluado.

## XIII. DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4/CD8.

Después de la estimulación antigénica empleando las dos proteínas purificadas que presentaban el mismo peso molecular, pero diferente punto isoelectrónico, se realizó una lisis hipotónica de los glóbulos rojos, empleando una mezcla de NH<sub>4</sub> CL 0.16 M y Tris-HCl 0.17 M pH 7.6 (1:9), 750  $\mu$ l de esta mezcla se adicionó a 250  $\mu$ l de sangre obtenida de los pozos de las placas de cultivo; se mezcló suavemente y dejó reposar por 10 min., posteriormente se centrifugó a 2500 r.p.m., para recuperar las células y eliminar el sobrenadante. La molaridad se reconstituyó con PBS pH 7.0, agitando el volumen final de las células en 50  $\mu$ l. Se tomaron alícuotas de 15  $\mu$ l de la suspensión de células para extenderlas sobre un portaobjeto limpio y desengrasado, permitiendo secar a temperatura ambiente; posteriormente las células se fijaron con etanol al 70 %. Se realizaron 3 extensiones o frotis de las suspensiones de

células de cada uno de los diferentes pozos; de esta manera se tuvieron 3 lecturas por proteína evaluada y por animal (232).

El número de células Bo CD4 y Bo CD8, se evaluó mediante una técnica de inmunotinción, empleando anticuerpos monoclonales anti CD4 bovino, (Bo CD4, CC30 isotipo Ig G1) y anti CD8 bovino (Bo CD8, CC63 isotipo IgG 2a), adquiridos en la compañía Serotec. Kidington, Oxford, England (233, 234). Los anticuerpos fueron previamente titulados, para determinar la dilución óptima de trabajo; la cual fue de 1:80 para los dos diferentes reactivos. Las células se cubrieron con la dilución del anticuerpo por 15 minutos, posteriormente las laminillas se lavaron varias veces con PBS-Tween; enseguida se adiciono un segundo anticuerpo anti Ig G de ratón marcado con biotina; el exceso de reactivo no ligado se eliminó por lavados, posteriormente se adicionó streptavidina acoplada con peroxidasa incubándola por 60 minutos a 37 ° C, después de varios lavados con PBS-Tween, se agregó el sustrato diaminobencidina. Finalmente se hizo una observación directa al microscopio para determinar el número de células CD4 y CD8 (Fig. 8).



Fig. 8.- Observación microscópica de linfocitos T Bo CD4<sup>+</sup>, empleando anticuerpos monoclonales contra este fenotipo y usando un anticuerpo secundario biotilados específicos de isotipo. Las células fueron visualizadas por microscopia óptica (40 X) fueron contabilizadas en cada uno de los ensayos.

## RESULTADOS.

### I.- PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DEL FILTRADO DE CULTIVO OBTENIDOS A LA SEXTA Y DÉCIMA SEMANA

Las proteínas presentes en los extractos proteicos obtenidos del filtrado de cultivo de *M bovis* en los diferentes tiempos, fueron separadas electroforéticamente en SDS-PAGE. El análisis efectuado indico que existen diferencias en número y presencia de proteínas para los diferentes tiempos de cultivo. Sin embargo el análisis repetido de los CFPE mostró un perfil proteico definido para las diferentes semanas de cultivo evaluadas. En la Fig. 9, se presentan los corrimientos electroforéticos de los CFPE, obtenidos a partir de la sexta y décima semana de cultivo, bajo condiciones reductoras y no reductoras; los diferentes CFPE presentan una gran diversidad de proteínas comprendidas en el rango de 100 y 12 kDa, pero existen claras diferencias en cuando a la presencia de proteínas principales entre estas. Para el CFPE de la sexta semana de cultivo, se observan principalmente 12 proteínas con pesos moleculares, aparentes de 70, 50,46, 45, 38, 34, 24,23, 20, 18, 14 y 12 kDa; mientras que para el CFPE de la décima semana, se observaron 11 proteínas con pesos moleculares aparentes de 70, 52, 46, 45, 38, 34, 30, 23, 21, 18, y 14 kDa. Bajo condiciones reductoras el número de bandas proteicas para ambos CFPE fue mayor, lo cuál indica la existencia de proteínas constituidas por dos o más subunidades, las bandas principales que se observan para el CFPE de la sexta semana de cultivo en condiciones reductoras tienen pesos moleculares aparentes de 63, 54, 50, 46, 45, 42, 38, 34, 38, 24, 21, 20, 19 y 14 kDa; mientras que para el CFPE de la décima semana en condiciones reductoras las bandas proteicas presentan pesos moleculares aparentes de 63, 58, 54, 50, 45, 42, 38, 34, 28, 26, 23, 21, 18, y 14 kDa (Fig. 9).

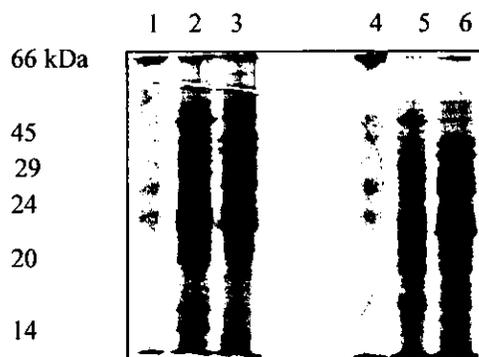


Fig. 9. Electrotresis de los CFPE's de *M bovis*, de la sexta y décima semana de cultivo en SDS-PAGE al 15 %; carriles 1 y 4 estándares de peso molecular; carriles 2 y 3, CFPE de la sexta y décima semana en condiciones naturales; carriles 5 y 6 corresponden a las mismas muestras bajo condiciones reductoras.

### II. FRACCIONAMIENTO DEL CFPE POR PRECIPITACIONES DIFERENCIALES CON $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ .

EL CFPE de la sexta semana de cultivo exhibe un patrón proteico bien definido y un mayor número de bandas proteicas, por lo cual se considero que este tiempo de cultivo era el adecuado para realizar nuestro estudio, con

este propósito primeramente se realizaron precipitaciones secuenciales con sulfato de amonio del sobrenadante de cultivo, empleando concentraciones finales de 30, 40, 50, 60 y 80 % de la sal mencionada. El análisis electroforético de los extractos obtenidos por precipitación secuencial indica diferencias en el número de proteínas presentes para los diferentes extractos (Fig. 10). La precipitación al 40 y 80 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , favoreció la recuperación de una gran cantidad de proteínas a partir del sobrenadante de cultivo de *M bovis*; no así las precipitaciones que se efectuaron a concentraciones del 30, 50 y 60 %. Sin embargo, se observa un mayor número de bandas, varias de ellas teñidas con más intensidad en el CFPE que se obtuvo empleando una concentración final de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80 %. Las principales bandas proteicas que se observan en este extracto, tienen pesos moleculares aparentes de 70, 63, 54, 50, 45, 42, 38, 34, 30, 28, 26, 23, 22, 19 y 14 kDa. Debido a que los extractos obtenidos empleando una concentración del 80 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , presenta una mayor cantidad de proteínas de secreción, estas fueron utilizadas para realizar estudios de inmunotransferencia y separación de proteínas por electroforesis preparativa.

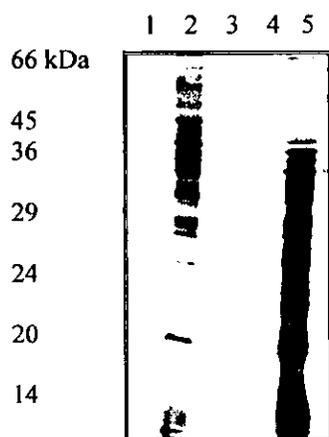


Fig. 10. Análisis electroforético de los CFPE's de cultivo de la sexta semana de *M bovis*, en SDS-PAGE al 15 %; obtenidos por precipitaciones secuenciales con sulfato de amonio. Carril 1, precipitado al 30 %; Carril 2, al 40 %; carril 3, al 50 %; carril 4, al 60 %; carril 5, al 80 %.

### III. RESPUESTA INMUNE HUMORAL A LOS CFPE OBTENIDOS A LA SEXTA SEMANA.

Para el análisis de inmunotransferencia se empleó CFPE, obtenido a partir de sobrenadantes de cultivo de seis semanas de incubación, precipitado al 80 %. El análisis individual del suero de un animal tuberculoso que fue positivo a la prueba de la tuberculina, con lesiones tuberculosas confirmadas por inspección y análisis histopatológico y del que además se recuperó *M bovis* y se determinó su presencia por PCR; mostró reconocimiento principalmente a proteínas de secreción de 60, 32, 22 y 14 kDa (Fig. 11); mientras que el suero de un animal negativo a la prueba de la tuberculina de la que no se observaron lesiones tuberculosas por inspección y que además fue negativo al aislamiento bacteriológico y PCR, reconoció proteínas en el rango 65-66, 32 y 14 kDa (Fig. 12).

Fig. 11. Análisis de inmunotransferencia de las proteínas del CFPE de *M. bovis* de la sexta semana, empleando suero de un bovino que mostró ser fuertemente reactivo al PPD bovino; el animal presentó lesiones tuberculosas y fue positivo al aislamiento de *M bovis* (diluciones dobles del suero desde 1:100 hasta 1:6 400).

Fig. 12. Análisis de inmunotransferencia de las proteínas de CFPE de *M bovis* de la sexta semana, empleando suero de un bovino PPD negativo, sin lesiones tuberculosas y aislamiento negativo a *M bovis* (diluciones dobles del suero 1:100 hasta 1:12 800).

#### IV. FRACCIONAMIENTO DEL CFPE POR ISOELECTROENFOQUE.

Las proteínas presentes en el CFPE fueron inicialmente electroenfocadas empleando un rango de pH de 2.5-8.0, bajo estas condiciones el análisis electroforético en SDS-PAGE de las diferentes fracciones, muestra la presencia de 3 a 6 proteínas para cada una de las diferentes fracciones; varias de ellas con proteínas de diferente peso molecular. Sin embargo, resulto relevante la presencia en todas las fracciones de dos bandas proteicas con movilidad relativa de 60 y 45 kDa pero el diferente pH que presentan las fracciones, permite considerar la existencia de más de dos proteínas de 60 y 45 kDa que pueden llegar a diferenciarse por su punto isoeléctrico. Fue claro también la presencia de bandas proteicas de 18 y 14.2 kDa en las fracciones comprendidas entre un pH de 5.0-7.0 (Fig. 13).

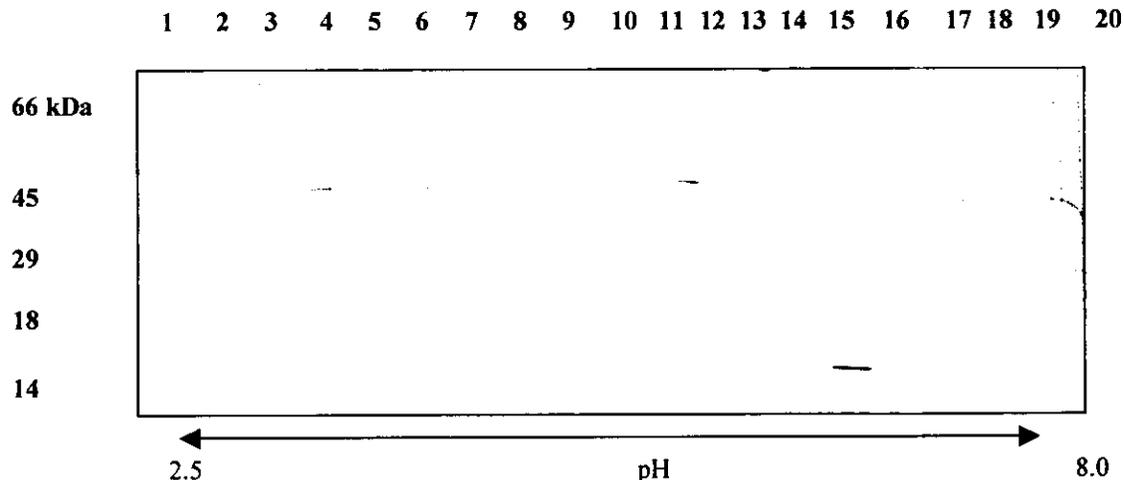


Fig. 13. Análisis electroforético de las proteínas presentes en las diferentes fracciones obtenidas por isoelectroenfoque del CFPE de *M bovis* de la sexta semana. La separación se efectuó estableciendo previamente un gradiente de pH de 2.5-8.0, empleando una solución de anfolitos de 2 % y depositando posteriormente 25 mg del CFPE (contenido proteico).

Debido al bajo rendimiento obtenido en la separación, se consideró necesario incrementar el contenido proteico del CFPE y ampliar el rango de pH de los anfolitos empleados en una segunda separación, para conseguir un mayor enriquecimiento de las proteínas en las diferentes fracciones.

## V. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR ISOELECTROENFOQUE.

El análisis electroforético muestra que la separación bajo estas condiciones fue óptimo, pues se observó un perfil electroforético característico que se repitió en las diferentes separaciones que se hicieron. El análisis mostró una mayor cantidad de bandas proteicas, en comparación con la separación anterior, localizadas dentro de las fracciones 2-8. Sin embargo, la mayoría de ellas se encuentra en las fracciones comprendidas en el rango de pH de 5-6 (Fig. 14); mientras que en las fracciones con pH extremos, se observaron un menor número de bandas proteicas. En las diferentes fracciones es evidente la presencia de una banda proteica ubicada a la altura de los 66 kDa, como en la separación anterior (Fig. 13), pero a diferencia de esta última, se apreciaron más intensamente teñidas. También se observa en las fracciones 12-16 un área sólida intensamente teñidas, localizada de los 24 kDa hacia abajo, sugiriendo la existencia de componentes de naturaleza lipídica en el CFPE.

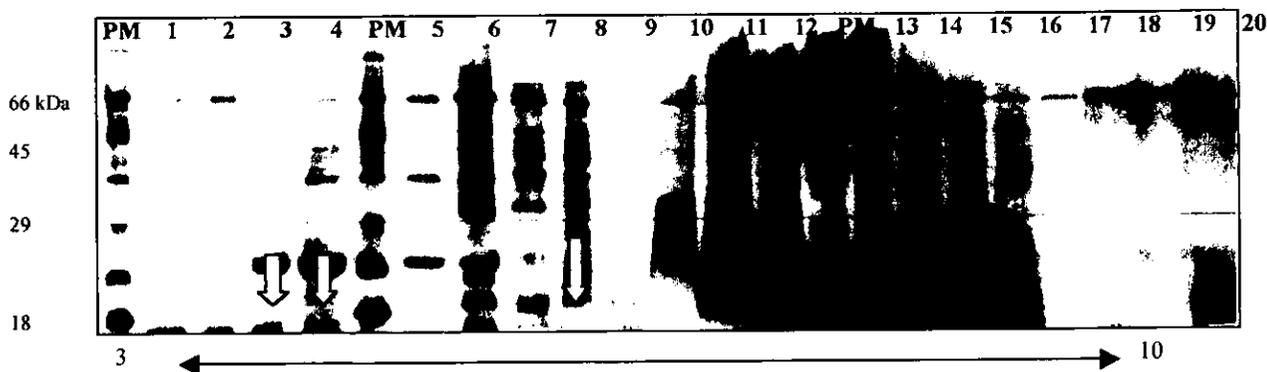


Fig. 14.- Las proteínas del CFPE de *M bovis* de la sexta semana, fueron separadas por isoelectroenfoque, después de haber realizado una precipitación secuencial al 80 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El rango de pH de la solución de anfólitos fue de 3.0-10.0.

Las fracciones obtenidas bajo estas condiciones se emplearon para los estudios de estimulación *in vitro* y para la purificación de varias proteínas que también se usaron con este propósito.

Así, a partir de las fracciones 3, 4 y 8 se intentó el aislamiento de 3 proteínas de 19 kDa, por refraccionamiento en el equipo de Rotofor, empleando un rango de pH más estrecho, este procedimiento permitiría, primero determinar si las proteínas eran diferentes de acuerdo a su punto isoeléctrico y dos, si las proteínas de 19 kDa presentes en las fracciones 3 y 4 eran la misma; pues existía la posibilidad de que esta hubiera difundido lateralmente durante la separación electroforética. El análisis electroforético en SDS-PAGE teñidos con plata mostró una sola banda proteica en las fracciones correspondientes (Fig. 15), sugiriendo con ello la pureza y aislamiento de las proteínas mencionadas. Las cuales se designaron arbitrariamente como Mb S-19/4 (indicando que es una proteína de secreción de *M bovis* con peso molecular de 19 kDa y con pI de 4.0), Mb S-19/4.5 y Mb S19/6.0. El análisis de la secuencia amino terminal practicado a las proteínas, mostró que la Mb S-19/6.0 tiene una homología del 100 % con la de una proteína hipotética de *M tuberculosis* conocida como Rv-1174c, cuya secuencia se conoció a partir de un banco genómico de *M. tuberculosis* cepa H37Rv ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)); mientras que la proteína Mb S-19/4.5 presenta una homología del 100 % con la MPB70. El análisis amino terminal de la proteína Mb S-19/4 indicó una homología del 100 % con la de la proteína Mb S 19/4.5, señalando con ello que estas proteínas son idénticas.

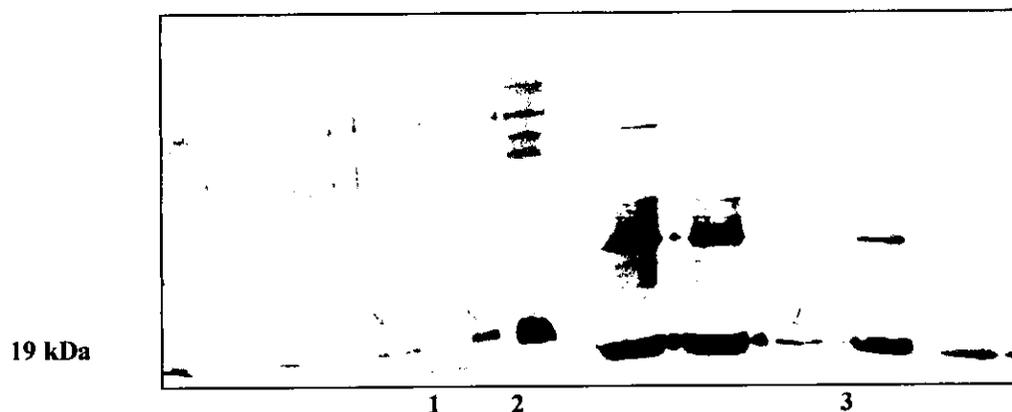


Fig. 15. Análisis electroforético de una separación por refraccionamiento de las fracciones obtenidas por isoelectroenfoque. Las flechas indican la posición de tres proteínas purificadas, identificadas como 1, 2 y 3 ( 1= Mb-S-19/4.0, 2= Mb-S-19/ 4.5 y 3= Mb-S-19/6.0).

## VI. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS DE ELUCIÓN CONTINUA.

Además de estas proteínas purificadas por isoelectroenfoque, se efectuó la separación de diferentes bandas proteicas presentes en la fracción 4, obtenida por isoelectroenfoque en el rango de pH de 3.0 a 10.0 (Fig. 14), mediante una electroforesis de elución continua. El monitoreo a 280 nm de las fracciones eluidas por este método registro 7 picos durante el proceso; los cuales fueron analizados electroforéticamente para determinar el número de proteínas presentes. En seis de los picos analizados se observó la presencia de una sola banda proteica; mientras que en el pico número tres se observó un doblete de bandas proteicas, cercanas a los 23 kDa (Fig. 16). Los picos uno y dos muestran la presencia de proteínas de 22 kDa, pero en este último la proteína presente se observa muy enriquecida. Las proteínas contenidas en las fracciones o picos restantes (picos 4 - 7) presentan un peso molecular aparente de 28 kDa y se desconoce si son diferentes. Las proteínas obtenidas por elución, también se evaluaron en estudios de estimulación *in vitro*; así como en su capacidad para inducir hipersensibilidad tardía en animales PPD positivos y PPD negativos.

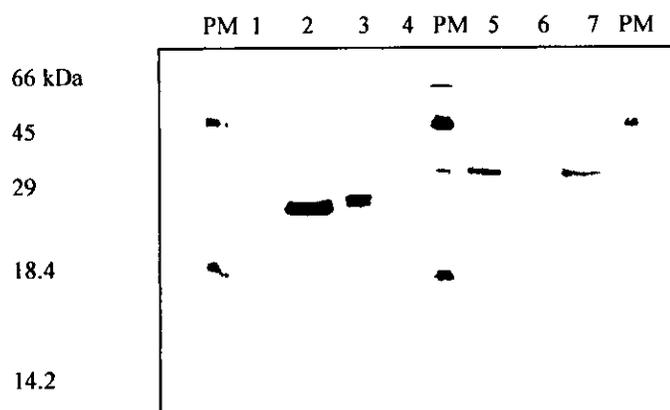


Fig. 16. Análisis electroforético en SDS-PAGE de siete picos, obtenidos mediante una electroforesis preparativa de elución continua de las proteínas presentes en la fracción 4 separada por isoelectroenfoque en el rango de pH 3.0 a 10.0.

### VII. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENTES FRACCIONES DEL CFPE DE *M. bovis* PARA INDUCIR LA SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE SANGRE COMPLETA DE BOVINOS.

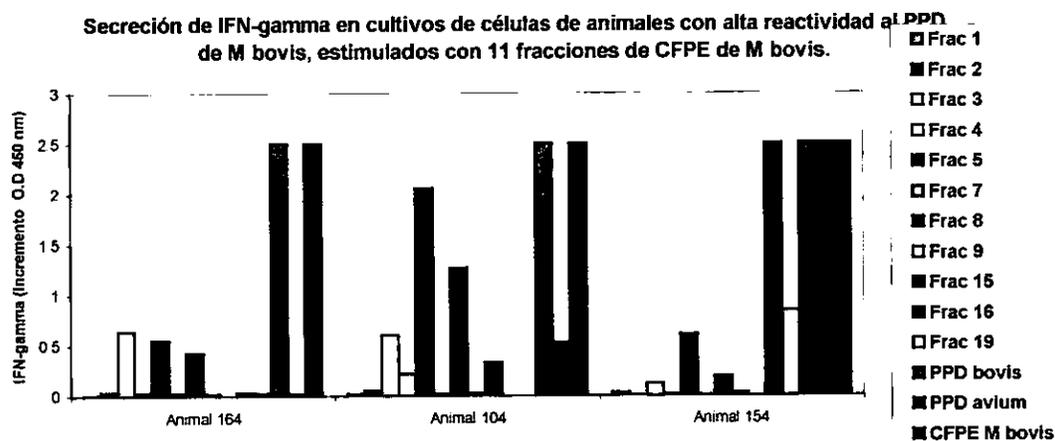
En un primer ensayo, once diferentes fracciones obtenidas por isoelectroenfoque se evaluaron para determinar su capacidad de inducir la secreción de IFN- $\gamma$  en cultivos de sangre completa de tres diferentes grupos de animales; animales fuertemente reactivos al PPD bovino, animales moderadamente reactivos y animales negativos, Cuadro 3.

Cuadro 3. - Selección de los animales de experimentación, de acuerdo a los resultados obtenidos al aplicar la prueba intradérmica doble comparativa.

Animal	Lectura Inicio PPD bovis/PPD avium	Incremento a 72 hrs	Diferencia	Resultado
1	10/8	12/11 = 2/3	0	Negativo
2	7/7	10/10 = 3/3	0	Negativo
3	8/8	9/7 = 1/1	0	Negativo
09	8/8	12/10 = 4/2	2	Sospechoso
21	8/7	13/10 = 5/3	2	Sospechoso
158	7/7	12/8 = 5/1	4	Sospechoso
104	6/6	41/12 = 35/6	29	Positivo
154	8/8	52/20 = 44/12	32	Positivo
164	8/7	70/12 = 62/5	57	Positivo

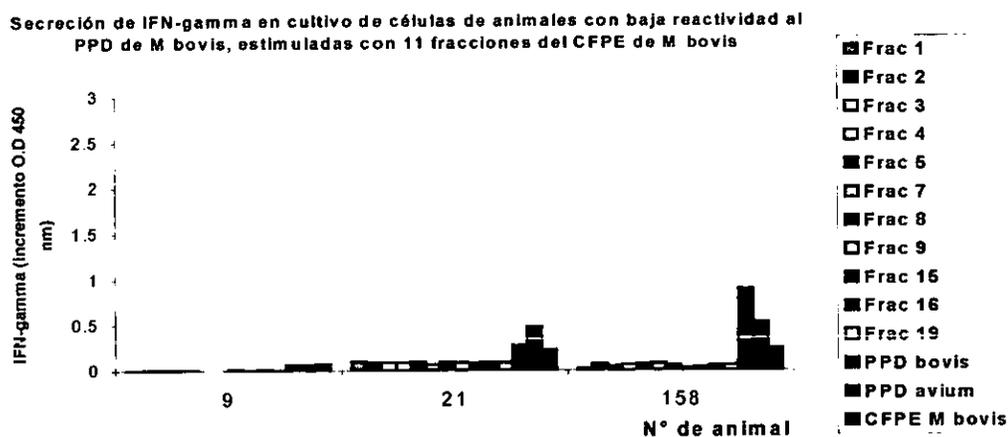
Las lecturas y consideraciones se hicieron de acuerdo a las normas establecidas por Sanidad Animal, dependencia de la SAGAR

En animales fuertemente reactivos a la tuberculina bovina, se observó que no todas las fracciones estudiadas fueron capaces de inducir la secreción de IFN- $\gamma$ . De estas solo las fracciones 3, 5 y 8 indujeron la secreción de esta citocina en los diferentes animales de este grupo, y solo en uno de ellos hubo una fuerte respuesta hacia las fracciones 16 y 19 (Gráfica 1). La respuesta en este grupo de animales hacia las fracciones, en general no es comparable con la que se observó en células estimuladas con el PPD bovino o el CFPE de *M. bovis* en los tres animales, a excepción solo de la fracción 19 en el animal 154. Las fracciones 3, 5 y 8 contienen proteínas en el rango de los 14 y 70 kDa con P.I comprendido entre 4.5 y 6.0; dentro de los cuales se encuentran las proteínas de 19 kDa, que fueron purificadas de las fracciones 3 y 8.

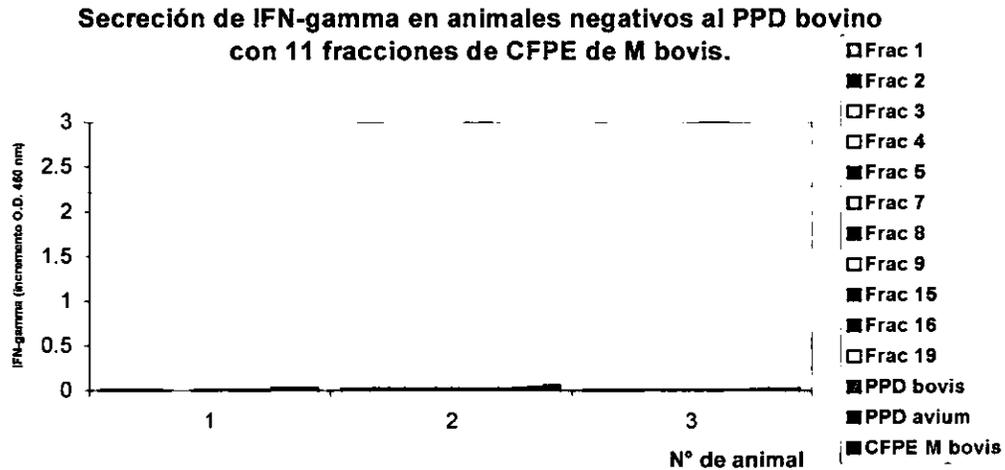


Gráfica 1. Evaluación de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de sangre completa obtenida de animales fuertemente reactivos a la prueba de la tuberculina. Los cultivos fueron estimulados con once diferentes fracciones obtenidas por isoelectroenfoque del CFPE de *M. bovis* de la sexta semana ( $2 \mu\text{g/ml}$ ); así como con PPD de *M. bovis*, PPD de *M. avium* y el CFPE de *M. bovis* crudo. Los valores graficados corresponden a la diferencia en la absorbancia (O.D.<sub>450</sub>) obtenida en los sobrenadantes de cultivo de células estimuladas menos la absorbancia de los sobrenadantes de cultivo de células sin estimular.

En animales con respuesta moderada al PPD bovino, la estimulación antigénica con las diferentes fracciones indujo una muy baja secreción de IFN- $\gamma$ ; sin que exista alguna diferencia entre ellos (Gráfica 2). La respuesta en estos animales hacia el PPD bovino y al CFPE, aunque fue más alta de lo que se observó con las fracciones, no fue comparable con la que exhibieron los animales fuertemente reactivos a la prueba de la tuberculina. En el animal 21 de este grupo se observó una respuesta ligeramente mayor de secreción de IFN- $\gamma$  en células estimuladas con PPD aviar más que con PPD bovino, sin embargo en la prueba intradérmica doble comparativa, la respuesta aunque baja se muestra preferentemente hacia el PPD bovino.



Gráfica 2. Evaluación del IFN- $\gamma$  en cultivo de células de sangre completa obtenida de animales con baja reactividad a la prueba intradérmica de la tuberculina bovina. Los cultivos fueron estimulados con once diferentes fracciones del CFPE de *M. bovis* de la sexta semana, separados por isoelectroenfoque; así como con PPD de *M. bovis*, PPD de *M. avium* y el CFPE de *M. bovis* crudo. Los valores corresponden a la diferencia en la absorbancia (O.D.<sub>450</sub>) de cultivos de células estimuladas menos la absorbancia de los sobrenadantes de células sin estimular.



Gráfica 3. Evaluación de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de sangre completa obtenida de animales negativos a la prueba intradérmica de la tuberculina bovina. Los cultivos se estimularon con once fracciones separadas por isoelectroenfoque del CFPE de la sexta semana; y con PPD de *M. bovis*, PPD de *M. avium* y el CFPE de *M. bovis* crudos. Los valores graficados son la diferencia en la absorbancia de cultivos de células estimuladas menos la absorbancia (O.D.<sub>450</sub>) de cultivos de células sin estimular.

En cultivo de células de animales negativos a la prueba de la tuberculina bovina, no hubo secreción de IFN- $\gamma$  con ninguna de las fracciones ensayadas, ni con ambos PPD's o el CFPE (Gráfica. 3). De manera general se observa que las células de animales fuertemente reactivas a la tuberculina bovina presentan una mayor capacidad para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  ante el estímulo antigénico micobacteriano *in vitro*; siendo esta respuesta mayor cuando las células se estimularon con mezclas antigénicas complejas como el PPD o el CFPE. La capacidad de respuesta parece estar relacionada con el grado de reactividad que exhiben los animales a la prueba intradérmica; sin embargo, es importante relacionar esta capacidad cuando se ha comprobado el grado de lesión o estatus inmune que guarda el animal hacia la enfermedad, además de su reactividad a la tuberculina, con este propósito se efectuaron los cultivos de células de sangre completa de cuatro animales de los cuales se había determinado su reacción a la tuberculina, niveles de anticuerpos y relación de producción de IFN- $\gamma$  empleando PPD bovino y PPD aviar (Cuadro 4). Los cultivos se estimularon con las 20 diferentes fracciones separadas por isoelectroenfoque (Fig. 14), observándose también diferente grado de respuesta en relación con su reactividad a la prueba de la tuberculina. Células de animal fuertemente reactivas presentaron mayor capacidad para inducir la secreción de IFN- $\gamma$ , cuando fueron estimulados con PPD de *M. bovis in vitro*, así como con varias de las fracciones que contienen proteínas ácidas (Gráfica 4, animal 848).

**Cuadro 4.- Antecedentes de animales.**

Nº animal	PPDbovis/aviar	Histopatológico	Aislamiento	PCR	ELISA
1685	-	Sin lesiones	-	+	-
144	+	III	-	+	-
66	-	I y III	-	-	+
848	+	I y II	+	-	-

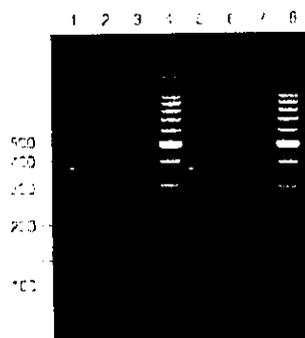
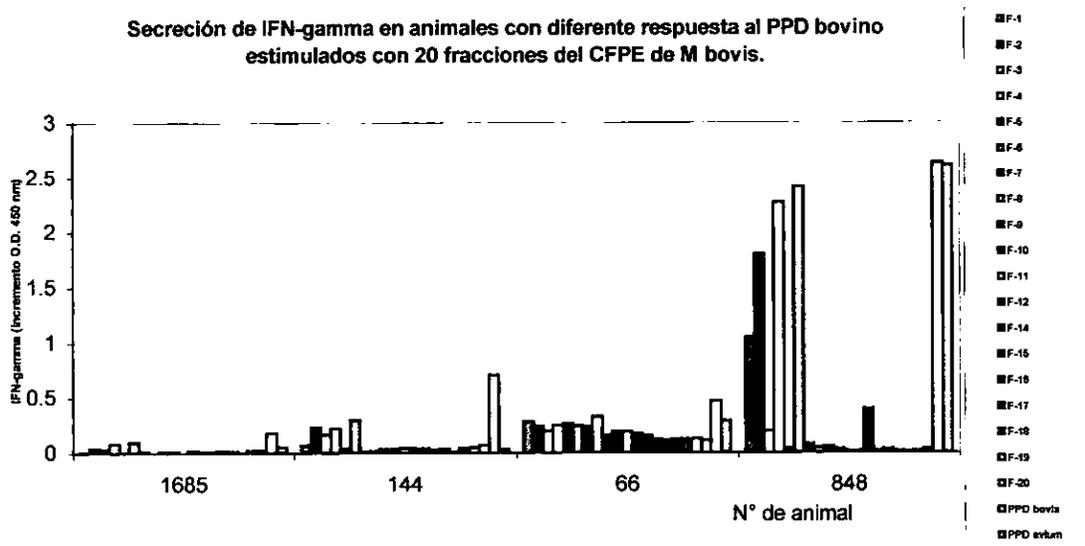


Fig. 17.- Demostración de los productos de amplificación de 372 pb del gen de la proteína MPB70 de *M. bovis*, obtenidos con los iniciadores TB1-A y TB1-B; carril 1, *M. bovis* AN5; carril 2, *M. tuberculosis* H36Rv; carril 3 DNA obtenido de muestras de tejido del animal N° 1685; carril 5, DNA obtenido de muestras de tejido del animal 144; carril 6, DNA de *M. avium* D4; carriles 4 y 8, marcadores de peso molecular; carril 7, control de agua.

### VIII. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE ANIMALES, ESTIMULADOS CON 20 FRACCIONES SEPARADAS POR ISOELECTROENFOQUE.

La inspección de los animales al momento del sacrificio, permitió determinar la presencia de lesiones tuberculosas y evaluar el daño histológico, al igual que comprobar la infección micobacteriana por cultivo y prueba de PCR (Fig. 17), con esta información junto con la evaluación de niveles de anticuerpos se considero que los animales presentaban diferentes estados inmunes hacia la enfermedad (Cuadro 4), lo cual se reflejó en su capacidad de respuesta a los diferentes antígenos micobacterianos ensayados. Se determinó que el animal 1685 que fue negativo a la prueba intradérmica, negativo al aislamiento y que no presentó lesiones tuberculosas, pero que fue positivo a la prueba de PCR estaba cursando por una fase inicial de la enfermedad en el cual todavía no se desarrollaba una respuesta celular significativa hacia los antígenos micobacterianos, como se refleja por la falta de reconocimiento hacia las fracciones separadas por isoelectroenfoque y al propio PPD. En relación al animal 144, que fue positivo a la tuberculina, negativo a la prueba de ELISA, con lesiones granulomatosas grado III y PCR positivo, se estimó como un animal que presentaba una infección

avanzada sin resolver. Las células mostraron una baja capacidad de respuesta a los antígenos micobacterianos *in vitro*. La respuesta, sin embargo, también parece estar dirigida a las fracciones que contienen proteínas ácidas. El animal 66 se considera un animal anérgico, no responsivo a la tuberculina, que presentó abundantes lesiones tuberculosas generalizadas; del cual sin embargo, no fue posible aislar la bacteria, ni determinar su presencia por PCR y a diferencia de los otros animales presentó niveles elevados de anticuerpos. La respuesta de secreción de IFN- $\gamma$  que se observó en este animal fue completamente diferente a la que se había encontrado con otros animales; al parecer la estimulación antigénica *in vitro*, empleando cualquiera de los antígenos micobacterianos ensayados indujo una baja secreción de la citocina, comparable entre las diferentes fracciones y el PPD en los cultivos de células del animal anérgico. Como se comentó antes, el animal 848 que fue un fuerte reactor a la tuberculina y cuyas células produjeron niveles altos de IFN- $\gamma$  con varias fracciones, se consideró un animal enfermo con lesiones moderadas de tuberculosis y un estado inmune comprometido en resolver la infección. Los resultados observados en este experimento, aunque no suficientes, sugiere una relación directa entre la secreción de IFN- $\gamma$  y reducción en la severidad de las lesiones tuberculosas en los animales.



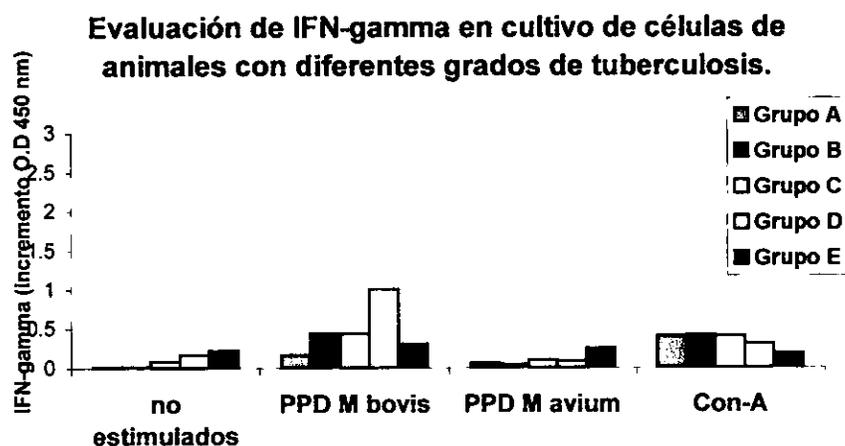
Gráfica 4. Evaluación de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de sangre completa, obtenida de animales con diferentes grado de hipersensibilidad tardía al PPD de *M. bovis*. Los cultivos se estimularon con veinte diferentes fracciones obtenidas por isoelectroenfoque del CFPE de *M. bovis* de la sexta semana. Los animales presentaban diferentes status inmune hacia la enfermedad determinando por su reactividad al PPD, lesiones macro y microscópicas, aislamiento bacteriológico y PCR.

## IX. EVALUACIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE ANIMALES CON DIFERENTE GRADO DE TUBERCULOSIS BOVINA.

Con la finalidad de confirmar estas observaciones y determinar si existen variaciones del status inmune de los animales durante el proceso infeccioso, se trabajó con 40 animales naturalmente infectados, a los cuales

primeramente se les practicó la prueba de la tuberculina y evaluó la producción de IFN- $\gamma$  con PPD de *M. bovis* y PPD de *M. avium*; posteriormente cultivos de sangre completa de los animales se estimularon con las 20 fracciones separadas por isoelectroenfoque para evaluar la secreción de IFN- $\gamma$  y finalmente se determinó el grado de lesiones que presentaban los animales, e intentó el aislamiento de la micobacteria, con esta información los animales se distribuyeron en cinco grupos; grupo A, animales PPD negativos, aislamiento negativo y sin lesiones en rastro; grupo B, animales positivos sin lesiones y aislamiento negativo; grupo C animales PPD positivos con pocas lesiones y aislamiento positivo; grupo D, animales PPD positivos con lesiones moderadas y aislamiento positivo; grupo E, animales PPD negativos (anérgicos), con abundantes lesiones y aislamiento positivo.

Debido a que existen grandes variaciones en la respuesta inmune, entre especie y aún para un mismo animal conforme progresa la enfermedad, se decidió evaluar la respuesta a PPD bovino, PPD aviar, Con A, así como a las 20 fracciones obtenidos de CFPE, en animales infectados naturalmente con *M. bovis*.

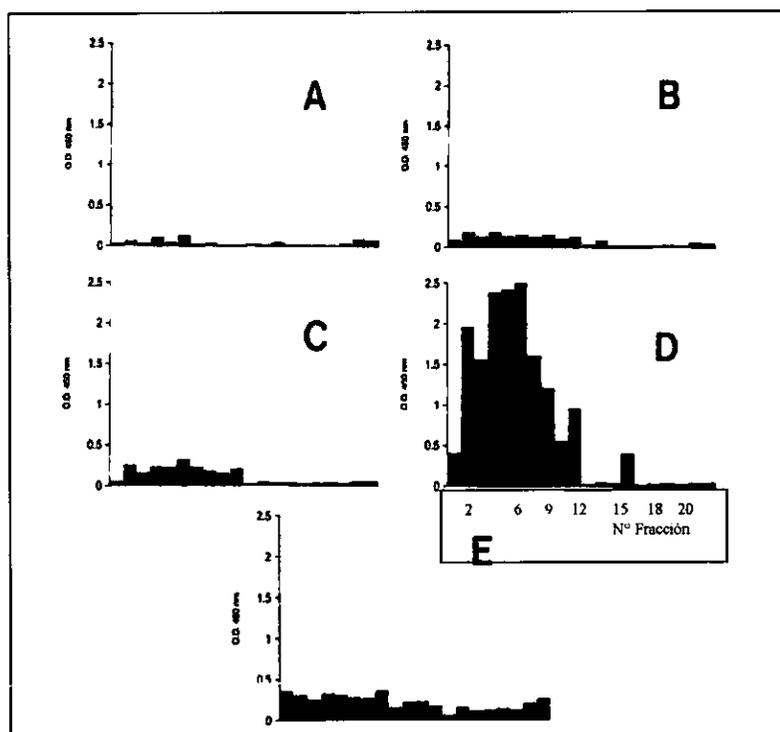


Gráfica 5. Producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de sangre completa obtenidas de animales con diferentes grados de tuberculosis. Los cultivos fueron estimulados con PPD de *M. bovis*, PPD de *M. avium* y Con - A; los valores graficados corresponden al valor promedio de la O.D.<sub>450 nm</sub> determinada a partir de las lecturas individuales de cada uno de los animales en los diferentes grupos. Grupo A, animales sanos; Grupo B, animales PPD +, sin lesiones; Grupo C, animales PPD + con pocas lesiones; Grupo D, animales PPD + con lesiones moderadas y Grupo E animales PPD -, con lesiones abundantes (anérgicos).

Los resultados de producción de IFN- $\gamma$  en los cultivos de sangre de los diferentes grupos de animales estimulados con PPD de *M. bovis* muestran que los grupos de animales reactivos a la tuberculina producen cantidades significativas de IFN- $\gamma$  a diferencia del grupo de animales PPD negativos y del grupo de animales anérgicos, la producción de esta citocina sin embargo es bastante más alta en el grupo D ( $OD = 0.994 \pm .36$ ), comparada con la de los grupos B y C de reactivos positivos ( $O.D. = 0.460 \pm .14$  y  $0.447 \pm .15$  respectivamente), gráfica 5. La respuesta de producción muestra ser más específica hacia los antígenos de *M. bovis* que a los antígenos de *M. avium*, como lo indica los bajos niveles de IFN- $\gamma$  determinados en los cultivos de células estimuladas con PPD de *M. avium*.

Para correlacionar la producción de IFN- $\gamma$  con la capacidad de las células a responder al PPD de *M. bovis*, se determinaron los índices de estimulación en los diferentes grupos; encontrándose un decremento progresivo de los valores (15.77, 14.83, 8.27, 7.20 y 1.51) para los grupos A, B, C, D y E; indicando con ello que, la capacidad de respuesta parece disminuir conforme progresa la enfermedad. La respuesta que se observa a la estimulación con el mitógeno en los diferentes grupos muestra también una tendencia a disminuir conforme progresa la enfermedad, al igual a lo que se observa con el PPD de *M. bovis*. En animales anérgicos los valores de secreción de IFN- $\gamma$  determinados en células estimuladas con los diferentes antígenos micobacterianos y el valor obtenido en células estimuladas con Con -- A, no muestra diferencias significativas con el que se registro para células sin estimular; lo cual indica la incapacidad de respuesta que exhiben las células de los animales anérgicos ante el estímulo antigénico y hacia el mitógeno. Es interesante notar que este grupo de animales presenta el valor más alto de IFN- $\gamma$  en cultivos sin estimular de los diferentes grupos, lo que hace suponer que hay una producción espontánea de la citocina en células que provienen de animales anérgicos.

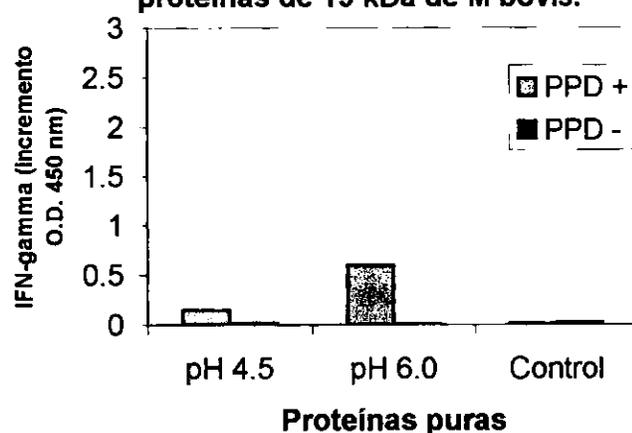
**PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$  EN CULTIVO DE CÉLULAS DE ANIMALES CON DIFERENTES GRADOS DE TUBERCULOSIS ESTIMULADOS CON 20 FRACCIONES OBTENIDAS DEL CFPE DE *M. bovis*.**



Gráfica 6. - Producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de sangre completa estimulados con veinte diferentes fracciones obtenidas por isoelectroenfoque. Los valores graficados corresponden al valor promedio de la D.O.<sub>450</sub> de las lecturas de cada uno de los animales en los diferentes grupos. El grupo A (n=12), animales sanos; el grupo B (n=8), animales PPD +, sin lesiones y aislamiento negativo; grupo C (n=8), animales PPD +, con pocas lesiones y aislamiento positivo; grupo D (n=8), animales PPD +, con moderadas lesiones y aislamiento positivo y; grupo E (n=4), animales PPD - (anérgicos), con abundantes lesiones y con aislamiento positivo.

La capacidad de respuesta en cultivo de células provenientes de los diferentes grupos de animales, hacia las 20 fracciones separadas por isoelectroenfoque en el rango de pH 3.0-10.0, fue evaluada e indica que las células de animales PPD negativos pertenecientes al grupo A no fueron estimulados significativamente con alguna de las fracciones, lo que se refleja en la prácticamente nula producción de IFN- $\gamma$  (Gráfica 6). En el grupo B la respuesta fue pobre, pero más uniforme hacia las fracciones 1-10. En el grupo C la secreción de IFN- $\gamma$  fue moderada y dirigida también hacia proteínas ácidas (fracciones 2-10), observándose un comportamiento similar al del grupo B. Mientras que en el grupo D, la respuesta hacia las fracciones 2-10 fue bastante más alta a la que se observó en los grupos B y C; las fracciones 1 y 14 también estimularon la secreción de IFN- $\gamma$  en este grupo de animales pero su producción fue menor que con las fracciones antes mencionadas. En el grupo de animales anérgicos (grupo E) se observó una respuesta uniforme hacia prácticamente todas las fracciones evaluadas; la respuesta sin embargo es bastante más pobre en relación al grupo D. Estas observaciones indican nuevamente diferencias en la capacidad de respuesta en los diferentes grupos animales, tanto al PPD bovino como a las diferentes fracciones separadas del CFPE.

**Secreción de IFN-gamma en cultivos de células de bovinos PPD + y PPD -, estimulados con dos proteínas de 19 kDa de *M. bovis*.**



Gráfica 7. Valores promedio de producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de sangre completa de bovinos PPD + y PPD - (5 animales por grupo) estimulados con dos diferentes proteínas de 19 kDa de *M. bovis*.

#### **X. SECRECIÓN DE IFN- $\gamma$ EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE BOVINOS PPD POSITIVOS Y PPD NEGATIVOS CON LAS PROTEÍNAS MPB70 Y Rv-1174c DE *M. bovis*.**

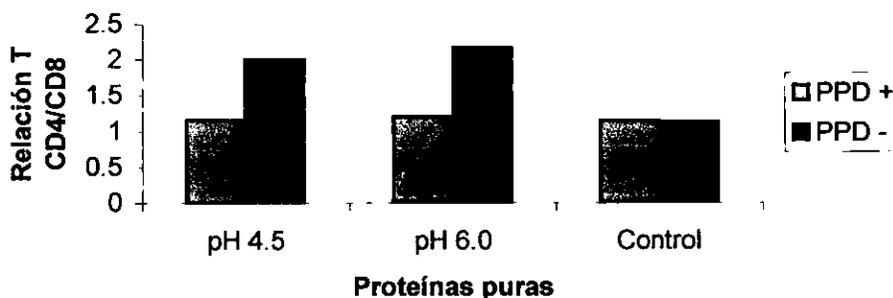
Debido a que la respuesta de producción de IFN- $\gamma$  preferencialmente se ve estimulada con fracciones que contienen proteínas ácidas, se evaluaron en su capacidad de inducción de esta citocina, dos proteínas previamente purificadas que mostraron estar en buena concentración en las fracciones. Las proteínas ambas de 19 kDa con P.I de 4.5 y 6.0 se evaluaron en cultivos de células de 5 animales PPD positivos y 5 animales PPD negativos. La proteína Mb-S-19/4.0 no se empleó en este estudio, pues se encontró que era idéntica a la Mb -S-19/4.5.

Se encontró que ambas proteínas favorecen la secreción de IFN- $\gamma$  en el grupo de animales reactivos positivos, sin embargo existió una mayor producción de la citocina en los cultivos estimulados con la Mb-S-19/6.0. En animales PPD negativos, no se observó ningún cambio significativo (Gráfica 7).

### XI. RELACIÓN DE LINFOCITOS T CD4/CD8 EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE BOVINO PPD POSITIVOS Y PPD NEGATIVOS ESTIMULADOS CON LAS PROTEÍNAS MPB70 Y Rv-1174c DE *M. bovis*.

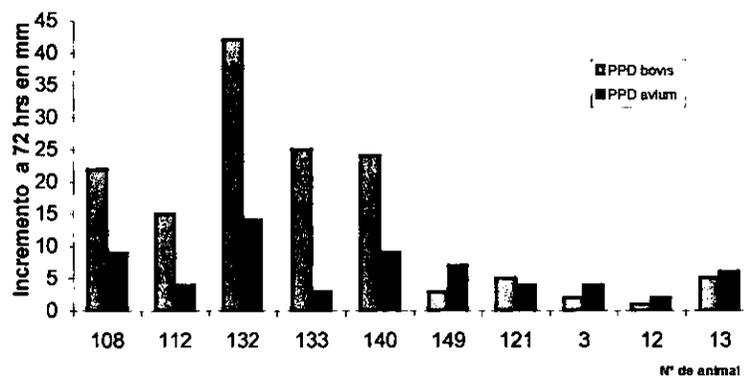
Con la finalidad de determinar si la proporción Bo CD4/Bo CD8, se encontraba alterada en los animales PPD positivos en relación con la de animales PPD negativos, y si esta no se veía afectada por la estimulación *in vitro* con las proteínas purificadas se cuantificó el número de Bo CD4 y Bo CD8 mediante una técnica de inmunotinción. Se encontró que la proporción Bo CD 4/Bo CD 8 en animales PPD positivos no muestra ninguna diferencia con respecto al grupo de animales PPD negativos, gráfica 8. La estimulación con las proteínas causó sin embargo, alteraciones en la proporción de estas células en animales PPD negativos, mientras que la relación en animales reactivos al PPD no se vio afectada.

#### Variación en la relación de linfocitos T CD4/CD8 en cultivos de células de bovinos PPD+ y PPD-, estimulados con dos proteínas de 19 kDa de *M bovis*.



Gráfica 8.- Valores promedio de la relación linfocitos T CD4/ CD8, en cultivos de células de sangre completa de animales PPD + y bovinos PPD - (5 animales por grupo); obtenidos después de la estimulación con dos proteínas de 19 kDa de *M. bovis*. El número de células se determinó mediante una técnica de inmunotinción empleando anticuerpos monoclonales anti CD4 bovino anti CD8 bovino.

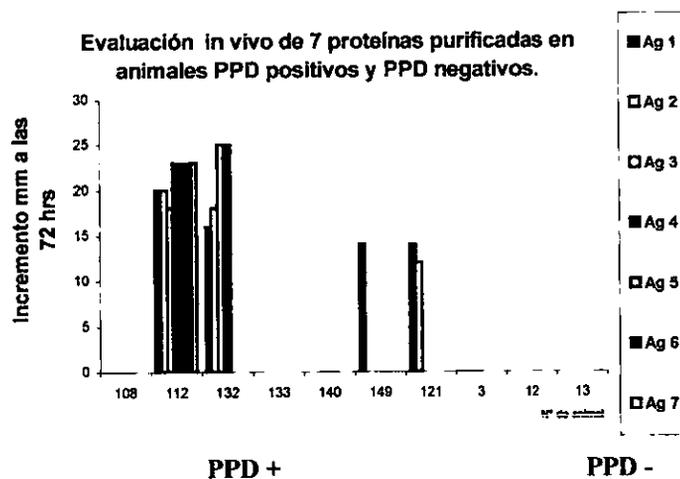
### Respuesta intradérmica a la tuberculina bovina y aviar en animales seleccionados.



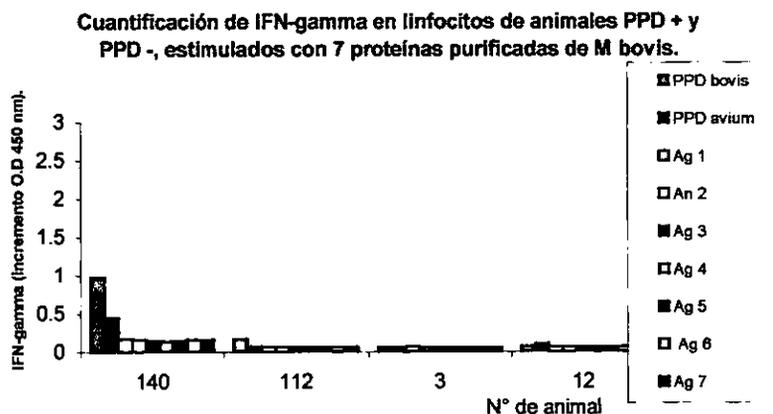
Gráfica 9. Respuesta intradérmica a la prueba de la tuberculina doble comparativa en animales seleccionados y considerados PPD + (108, 112, 132, 133 y 140) y PPD - (149, 121, 3, 12 y 13) de acuerdo a las normas establecidas por la campaña nacional de tuberculosis bovina (CANATB).

## XII. EVALUACIÓN DE SIETE PROTEÍNAS PURIFICADAS EN ANIMALES PPD POSITIVOS Y PPD NEGATIVOS.

Debido a que la fracción 4 obtenida por isoelectroenfoque (Fig. 14), fue una de las fracciones que indujo una mayor secreción de IFN- $\gamma$  en animales reactivos positivos (Gráfica 6, grupo D), se procedió a purificar varias de las proteínas presentes en esta fracción por electroforesis de elución continua. Una de las proteínas aisladas por este método corresponde con la Mb-S-19/4.5 evaluada en el ensayo anterior donde mostró ser capaz de inducir la secreción de IFN- $\gamma$  en bajas cantidades *in vitro*. Con la finalidad de determinar si esta proteína y las otras proteínas separadas de la fracción 4 tenían la capacidad de inducir una respuesta de hipersensibilidad tardía, se inocularon intradérmicamente animales reactivos a la tuberculina y animales negativos (cinco animales por grupo). Se observó una respuesta heterogénea de H.T hacia las proteínas principalmente en animales reactivos; mientras que dos de los cinco animales respondieron a la mayoría de los antígenos evaluados, tres no mostraron reactividad hacia alguno de estos. La respuesta que se observó en uno de los animales positivos (animal 112), estuvo dirigida hacia los siete antígenos y fue superior a la que se desarrolló aún con el propio PPD bovino, gráfica 9 y 10. El otro animal positivo reconoció cuatro de los siete antígenos y aunque en este caso la reacción hacia ellos fue alta, no superó la que se observó con los diferentes PPD's evaluados; ambos animales respondieron bien a la proteína Mb-S-19/4.5 representada por el antígeno 2. Dos de los cinco animales negativos a la prueba de la tuberculina reaccionaron solamente con una o dos proteínas; así, el animal 149 reaccionó con el antígeno 1 y el animal 121 reaccionó con los antígenos 1 y 2; la induración que se desarrolló en estos animales empleando los antígenos mencionados fue superior a la que se observó con los diferentes PPD's.



Gráfica 10.- Respuesta intradérmica, determinada midiendo el diámetro de induración (mm) desarrollado por la inoculación de siete proteínas purificadas de *M. bovis*, en animales PPD positivos. Cada valor graficado es el promedio de tres mediciones y las desviaciones entre ellas no fueron mayores de  $\pm 0.5$  mm.



Gráfica 11.- Secreción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de sangre completa de dos animales reactivos al PPD (112 y 140) y dos animales negativos al PPD (3 y 12), después de la estimulación con 7 proteínas de *M. bovis*, PPD bovino y PPD aviar. Se empleó 10  $\mu$ l de cada proteína purificada (2  $\mu$ g en el volumen total) y 10  $\mu$ g de PPD bovis o PPD aviar. Cada valor graficado representa la densidad óptica a 450 nm del promedio de 3 observaciones de los cultivos de cada animal.

Posteriormente, con el propósito de correlacionar la respuesta H.T que se había observado en los diferentes grupos, hacia las proteínas con la producción de IFN- $\gamma$  inducida por la estimulación antigénica *in vitro*, se seleccionaron dos animales PPD positivos (animales 112 y 140) y dos animales PPD negativos (animales 3 y 12). La selección se hizo bajo el criterio de evaluar animales PPD positivos, que difirieran en la respuesta intradérmica, uno con un reconocimiento total hacia las 7 proteínas (animal 112) y el otro sin que hubiera mostrado reconocimiento alguno hacia ellas (animal 140). En el caso de animales PPD negativos, el criterio que se utilizó, fue que no hubiera habido reconocimiento hacia alguno de los antígenos por intradermorreacción. La estimulación *in vitro* de células de animales PPD positivos con los diferentes antígenos no muestra diferencias claras entre animales evaluados; mientras que en los cultivos del animal 140 se favoreció una producción baja de la citocina con los diferentes antígenos, en el animal 112 no hubo niveles apreciables de ella, pese a que este animal exhibió una fuerte respuesta de H.T con los diferentes antígenos y el 140 no desarrollo respuesta intradérmica alguna. En células de animales PPD negativos no hubo producción de IFN- $\gamma$  después de la estimulación antigénica con alguno de los antígenos, ni con los diferentes PPD's.

## DISCUSIÓN

Existe interés en el área de la tuberculosis bovina por lograr identificar los antígenos con uso potencial para aplicarse tanto en el desarrollo de mejores inmunógenos como en la elaboración de reactivos específicos para el diagnóstico de la enfermedad. Lo cual implica tanto el aislamiento y caracterización de dichos antígenos, como el conocimiento de los efectos que tienen estas moléculas sobre las células del hospedero, principalmente aquellas involucradas en la respuesta inmune. Se dice que la tuberculosis bovina al igual que la del humano progresa de manera muy similar y que la protección o control de la infección puede atribuirse casi exclusivamente a una respuesta inmune celular. La información que se tiene al respecto y que se ha generado gracias a los trabajos de investigación sobre *M. tuberculosis* y la cepa vacunal de *M. bovis* BCG pone de manifiesto la importancia de las proteínas de secreción en el desarrollo de una inmunidad protectora fundamentalmente dirigida por células T CD4, productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2; aunado a este hecho, existe evidencia de que las proteínas de secreción son fuertemente reconocidas por las células de memoria de personas o animales infectados. En tuberculosis bovina poca investigación se ha realizado para identificar aquellos antígenos de secreción que puedan favorecer una respuesta inmune celular; así, el propósito que tuvo este trabajo fue aislar y caracterizar algunas de estos antígenos, para posteriormente evaluar su capacidad de inducir la secreción de IFN- $\gamma$  en cultivo de células de animales infectados.

Para lograr estos objetivos fue primero necesario, establecer el tiempo óptimo de cultivo de la bacteria al cual se observa una mayor expresión de proteínas de secreción. La evaluación se realizó mediante análisis electroforéticos de los extractos proteicos del filtrado de cultivo (CFPE), obtenidos de las diferentes semanas de cultivo de *M. bovis*. Los análisis efectuados muestran diferencias en número y presencia de proteínas en los diferentes tiempos de cultivo. Estas diferencias, sin embargo no son reflejo de variables como temperatura, agitación o elementos nutricionales; factores que tienen gran influencia en la composición proteica de los CFPE de *M. bovis* (235), lo cual se ha demostrado para varios antígenos de secreción de *M. tuberculosis*, incluyendo entre ellos el complejo antigénico 85 involucrado en la virulencia de la bacteria (236, 237). De los resultados observados, se consideró que el tiempo adecuado para la obtención del mayor número posible de proteínas de secreción fue la sexta semana de cultivo. Los análisis electroforéticos correspondientes a este tiempo, tanto en condiciones naturales como reductoras muestran de 12-16 bandas principales comprendidas en el rango de los 100 y 12 kDa, con un gran número de bandas menores en geles teñidos con Coomassie; así, los CFPE utilizados tanto para la separación por isoelectroenfoco de las proteínas como en otros ensayos se obtuvieron al término de este tiempo. Definido el tiempo de cultivo para la obtención de los CFPE's, también fue necesario determinar las condiciones de precipitación con el fin de recuperar de los sobrenadantes la mayor cantidad posible de proteínas. La precipitación con sulfato de amonio a una concentración final del 80 %, favoreció este propósito; el análisis electroforético del CFPE obtenido bajo estas condiciones mostró cerca de 35 bandas proteicas principales en geles teñidos con nitrato de plata. El CFPE, se dice es una mezcla compleja constituida por un gran número de componentes presentes en diferentes concentraciones, de las cuales cerca de 150 proteínas se han caracterizado por electroforesis en

dos dimensiones (2-D) (178), lo cual indica la necesidad de utilizar métodos analíticos más sensibles que permitan separar los diferentes componentes de los extractos.

La estrategia que se empleó para la purificación de los antígenos del CFPE, se fundamenta en la separación de las proteínas de acuerdo a las características de su punto isoeléctrico mediante el isoelectroenfoque en solución. Inicialmente, las proteínas del CFPE se separaron bajo este sistema empleando un gradiente de pH con rango amplio (3-10), dentro del cual las proteínas con pI similar se localizaron en la fracción con pH correspondiente. El análisis de las diferentes fracciones así obtenidas, mostró numerosas bandas proteicas comprendidas entre 14 y 75 kDa, distribuidas principalmente dentro de las fracciones 2-8, la mayoría de ellas, sin embargo se ubican en el rango de pH de 5 a 6. Las observaciones e interpretaciones que se hicieron del análisis concuerdan con lo que han encontrado otros investigadores empleando metodologías como el análisis electroforético en 2-D (238), quienes señalan; que prácticamente el 90 % de las proteínas presentes en el filtrado de cultivo son proteínas ácidas de las cuales, la mayoría presentan un pI comprendido en el rango de una unidad de pH (4.8-5.8).

El análisis de las fracciones, también mostró algunas bandas proteicas ubicadas a la misma altura en varias de las fracciones, indicando con ello la separación de proteínas del mismo tamaño mediante este procedimiento. Es importante señalar que varias de las bandas proteicas que se observan en los análisis electroforéticos (SDS-PAGE) del filtrado de cultivo de *M. bovis* contiene proteínas del mismo peso molecular, que exhiben propiedades fisicoquímicas distintas, como puede ser el pI. Es así que el isoelectroenfoque brinda, la oportunidad de separarlas confinándolas al pH más cercano a su pI, cuando se utilizan gradientes de pH apropiados. Posteriormente las proteínas de las diferentes fracciones pueden aislarse bajo la misma metodología, empleando rangos de pH más estrechos, o bien por electroforesis preparativa de elución continua; ambas alternativas se emplearon en este trabajo para aislar algunas proteínas de las fracciones.

Por isoelectroenfoque empleando un rango de pH de 3-5, se purificaron tres proteínas de 19 kDa a partir de las fracciones 3, 4 y 8; el análisis electroforético y de secuencia amino terminal permitió determinar que dos de ellas son isoformas de la misma proteína, que muestra ser homóloga con la proteína de secreción MPB70, de la que se sabe existe en múltiples formas debidas principalmente a modificaciones postranscripcionales, y de la que se ha indicado es altamente específica para *M. bovis* (133). Mientras que la otra proteína presenta una secuencia homóloga con una proteína hipotética de *M. tuberculosis* identificada como Rv-1174c ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)). Por electroforesis de elución continua de la fracción 4 obtenida por isoelectroenfoque fue posible aislar 7 proteínas, cuatro de las cuales tienen un peso molecular aparente de 28 kDa, dos de 22 kDa y una es un doblete de 23 kDa; no fue posible realizar una mayor caracterización de ellas y por lo pronto desconocemos si representan proteínas iguales o diferentes; sin embargo, se utilizaron en los ensayos de estimulación *in vitro*, junto con las proteínas purificadas antes mencionadas y las fracciones separadas por isoelectroenfoque.

Consideramos que la combinación de las técnicas de electroforesis preparativa por isoelectroenfoque y de elución continua brinda una buena oportunidad para el aislamiento y caracterización de los antígenos proteicos micobacterianos, facilitando su estudio individual en los mecanismos de patógenia, desarrollo de inmunidad protectora, selección de antígenos de utilidad diagnóstica y evaluación de nuevas vacunas. Cabe

mencionar que el isoelectroenfoco en si ha tenido amplias aplicaciones en la purificación no solo de antígenos micobacterianos, sino también en la purificación de proteínas receptoras de membrana, proteínas transmembranales, enzimas de secreción, factores quimiotácticos leucocitarios y proteínas de fusión (212). Tanto en tuberculosis bovina como en la del humano se ha determinado que, la mayoría de las infecciones pueden controlarse mediante una inmunidad celular protectora, sin que la respuesta humoral, normalmente baja en la mayoría de los casos juegue un papel significativo; en estos casos, la infección normalmente puede diagnosticarse empleando pruebas que evalúan la inmunidad celular. Sin embargo, en animales que presentan etapas avanzadas de la enfermedad la respuesta celular puede encontrarse disminuida o estar prácticamente ausente, mientras que, la respuesta humoral se incrementa significativamente (239). Es así, que en el diagnóstico de la enfermedad es necesario considerar tanto una prueba serológica sensible y específica, como una prueba que permita evaluar la inmunidad celular apropiadamente, con el fin de conseguir un mayor grado de exactitud en el diagnóstico de la enfermedad. Varios tipos de pruebas serológicas se han desarrollado, algunas de ellas utilizando antígenos crudos, pero tienen el inconveniente de ser poco sensibles y específicas (240, 241); lo cual han generado que la investigación en el campo se centre en la búsqueda y selección de antígenos inmunológicamente importantes. Uno de los objetivos particulares del trabajo fue determinar el reconocimiento antigénico que exhiben los sueros de animales PPD positivos al CFPE de *M. bovis*, y compararlo con el que muestra los sueros de animales PPD negativos. En términos generales, el análisis de inmunotransferencia muestra claras diferencias en el perfil de reconocimiento antigénico hacia las proteínas del CFPE que exhiben ambos grupos de animales.

Estas observaciones señalan las bajas posibilidades que existen para identificar un animal tuberculoso empleando uno o un número reducido de antígenos purificados, en cualquier tipo de prueba serológica, dado que la sensibilidad se reduce considerablemente; situación que fue demostrada por Fifis y col (121) quienes evaluaron la reactividad serológica a varios antígenos purificados, incluyendo las proteínas MPB70 y MPB64 conocidas como altamente específicas para *M. bovis*, en sueros de animales infectados, las sensibilidades que se determinaron para estos antígenos fue del 60 y 50 %. Fifis y col (242), consideran además, que las sensibilidades de las pruebas serológicas se pueden incrementar seleccionando epitopos específicos de los antígenos purificados y eliminando aquellos epitopos de reacción cruzada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la respuesta hacia los determinantes antigénicos esta bajo control genético y por lo tanto varia ampliamente entre las poblaciones. El desarrollo de una prueba serológica con estas características por el momento sería poco probable y demasiado costosa para aplicarse a nivel de campo; mientras tanto hay que seguir optando por desarrollar una prueba serológica que incluya varios antígenos purificados específicos, que junto con una prueba adecuada para evaluar la inmunidad celular permita identificar los bovinos tuberculosos. La prueba intradérmica de la tuberculina, es la más ampliamente utilizada por el momento para este propósito, pero tiene la limitante de carecer de sensibilidad y especificidad. Considerando los inconvenientes de la prueba intradérmica, Rothel y col (229) desarrollaron una prueba de ensayo celular *in vitro*, que se basa en la evaluación de IFN- $\gamma$ , producido en cultivos de sangre completa de animales infectados, estimulados con PPD bovino; la prueba se ha aplicado en varios ensayos a nivel de campo y muestra ser más sensible y específica

que la prueba de la tuberculina (156, 230). Sin embargo, se considera que la especificidad se puede incrementar si se utilizan antígenos purificados en lugar del PPD. La prueba sirvió de herramienta para evaluar la capacidad de los diferentes antígenos que se aislaron del CFPE de *M. bovis* para inducir la producción de IFN- $\gamma$ .

Se realizaron varios ensayos para evaluar la capacidad de respuesta de las células de animales PPD positivos y PPD negativos a las diferentes fracciones del CFPE. En un primer ensayo se observó que la capacidad para producir INF- $\gamma$ , en animales seleccionados básicamente por el grado de reactividad a la tuberculina, varía entre los diferentes grupos evaluados. De manera general, se observó una mayor producción de IFN- $\gamma$  en los cultivos de animales fuertemente reactivos cuando estas fueron estimuladas con fracciones ácidas del CFPE; la producción sin embargo, fue más alta en presencia de mezclas antigénicas más complejas como el PPD o el CFPE. En los cultivos de animales moderadamente reactivos a la tuberculina se observó una menor producción con las fracciones mencionadas, la producción en presencia del PPD o del CFPE también fue alta para este grupo. A diferencia de animales reactivos, las células de animales PPD negativos no respondieron a ninguno de los antígenos evaluados. La producción de la citocina en cultivos de animales reactivos se favoreció principalmente con fracciones que contenían proteínas con PI ácido más que con cualquier otro tipo de fracciones. De acuerdo con estas observaciones se puede considerar que la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro*, parece estar relacionada con el grado de reactividad que exhiben los animales a la prueba intradérmica. Para nosotros era importante, relacionar esta capacidad con el grado de lesión o estatus inmune que guarda el animal hacia la enfermedad, además de conocer su reactividad a la tuberculina, lo cual fue posible determinar en ensayos posteriores con el seguimiento e inspección de los animales a rastro, a fin de evaluar el grado y tipo de lesiones tuberculosas que presentaban, al igual que comprobar la infección micobacteriana por cultivo; en uno de los ensayos fue posible tener además de esta información, resultados de PCR para determinar la presencia de la bacteria, así como resultados de la evaluación de anticuerpos mediante un ensayo de ELISA, lo que permitió identificar aquellos animales anérgicos de los grupos en estudio.

La información obtenida, permitió relacionar el estado de la enfermedad con los niveles de producción de IFN- $\gamma$  ante un estímulo antigénico micobacteriano *in vitro*. Los resultados indican que la producción es significativa en cultivos estimulados con PPD de *M. bovis* para los diferentes grupos de animales reactivos, tal como se había observado previamente; de igual modo, la producción fue más alta en animales fuertemente reactivos más que en aquellos que desarrollan una reacción intradérmica moderada. Considerando la presencia y grado de lesiones tuberculosas que presentaban los diferentes grupos de animales, los resultados también indican un aparente incremento en la secreción de la citocina según evoluciona la enfermedad. Sin embargo, al correlacionar la producción de la citocina con la capacidad de las células para responder al PPD de *M. bovis*, determinando los índices de estimulación se encontró un decremento progresivo en proporción a la evolución de la enfermedad. Esta tendencia se observó no solo con los antígenos micobacterianos, sino también cuando las células de los diferentes grupos se estimularon con el mitógeno Con-A. Los índices más bajos de estimulación micobacteriana o mitogénica se observaron en los cultivos de animales anérgicos, indicando la capacidad reducida de los linfocitos T de estos animales para responder eficientemente no solo

hacia el PPD de *M. bovis*, sino también al mitógeno. Llama la atención el hecho de que los cultivos sin estimular de este grupo de animales presentan el nivel más alto de IFN- $\gamma$  y de que el nivel no se afecte en presencia del antígeno o del mitógeno; indicando con ello una producción espontánea de la citocina, consecuencia de un desbalance en su regulación, en el cual las células TH 1 alcanzan un estado anérgico, que se manifiesta por una bajo pero continua producción de IFN- $\gamma$  (243, 244). La producción inespecífica de este importante mediador de la inmunidad protectora hacia la bacteria es un factor que puede contribuir con el estado de anérgia y desarrollo de las formas activas de la enfermedad.

El estado de anérgia se acompaña de una reducción de la hipersensibilidad tardía y de una baja respuesta linfoproliferativa a los antígenos micobacterianos que correlacionan bien con la tuberculosis diseminada o pulmonar (245). Se ha propuesto varios mecanismos para explicar el fenómeno de anérgia considerando tanto las interrelaciones que se establecen entre las diferentes poblaciones celulares que participan en la inmunidad y en el proceso inflamatorio a través de sus redes reguladoras y dinámicas de citocinas y quimiocinas producidas, como la modulación de estas interrelaciones por los componentes o productos secretados por la bacteria. Además, también existen factores genéticos asociados con las moléculas clase II del MHC ligadas a la baja inmunoreactividad hacia la bacteria (246). La anérgia se ha tratado de explicar a través del reclutamiento de monocitos y células T específicas productoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  en el sitio de la enfermedad, en contraste a nivel periférico se ha encontrado que las concentraciones de estas citocinas son bajas, mientras que hay una sobreexpresión de citocinas tipo TH 2, lo cual puede explicar en cierta medida la reducción en la reacción de hipersensibilidad tardía. A nivel local también se han encontrado cantidades significativas de IL-10 y de TGF- $\beta$ , citocinas antagonistas a las funciones del IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, que pueden limitar la respuesta de las células T en el sitio de la enfermedad. Entre otros efectos el TGF- $\beta$  producido por los monocitos inhibe la síntesis de algunas citocinas por parte de los macrófagos y disminuye la expresión de las moléculas clase II del MHC en estas células; inhibe la proliferación de células T dependiente de IL-2 y la expresión de sus receptores en ellas (247, 248, 249). Por otro lado, se ha determinado que los monocitos de pacientes tuberculosos producen constitutivamente TGF- $\beta$ , al igual que las células gigantes Langhans y las células epitelioides de los granulomas sugiriendo que la producción de este mediador resulta en la inactivación de los macrófagos y en el proceso inmunopatológico: Estos eventos señalan que el TGF- $\beta$  es el responsable de inhibir los mecanismos antimicobacterianos y favorecer la sobrevivencia de la bacteria (250, 251).

Se ha tratado de explicar la reducción del tamaño de la reacción de hipersensibilidad tardía que se observa en pacientes anérgicos en el sitio de inoculación de la tuberculina a través de la presencia de monocitos comprometidos en la producción de TGF- $\beta$ , asegurando la amplificación de las funciones de la citocina en el sitio, principalmente limitando la proliferación de las células T específicas y contrarrestando los efectos de las citocinas proinflamatorias (252, 253, 254). Los eventos inmunológicos que se han descrito para explicar el fenómeno de anérgia se han estudiado básicamente en tuberculosis humana y poco se sabe de los mecanismos que pueden estar operando en la tuberculosis bovina; sin embargo, muy probablemente varios de los mecanismos que actúan son los mismos, dadas las similitudes en el desarrollo de estas enfermedades.

Al evaluar la capacidad de respuesta de las células de los bovinos en diferentes fases de la enfermedad hacia las fracciones separadas por isoelectroenfoque, se observó un patrón de secreción de IFN- $\gamma$  similar al que se encontró cuando las células de los diferentes grupos se estimularon con el PPD bovino. Células de animales no infectados respondieron pobremente a algunas fracciones ácidas, específicamente a aquellas que contienen proteínas con PI entre 3 y 4.5; mientras que en los animales que presentaban fases iniciales o subclínicas de la enfermedad la producción fue significativa con un mayor número de fracciones ácidas que contienen proteínas con PI comprendido en el rango de 3-6. En animales severamente afectados la respuesta fue mucho más alta con estas mismas fracciones y hubo además, otra fracción con capacidad de inducir la producción de IFN- $\gamma$ , fracción 14 que presenta constituyentes con PI de 7.5. En animales anérgicos, se encontraron niveles bajos de IFN- $\gamma$  comparables tanto para células sin estimular como con células estimuladas con las diferentes fracciones; igual como se observó cuando las células de estas se pusieron en contacto con el PPD de *M. bovis* o el mitógeno.

Debido a que la respuesta de producción de la citocina preferentemente se ve estimulada con fracciones que contienen proteínas ácidas, se evaluó la capacidad de inducción de la citocina de dos proteínas purificadas y caracterizadas a partir de la fracción tres, cuatro y ocho, fracciones que fueron buenas inductoras. Las proteínas, ambas de 19 kDa y pI de 4.5 y 6.0 respectivamente, se evaluaron en cultivos de células de animales PPD positivos y PPD negativos. Ambas proteínas favorecieron la secreción de IFN- $\gamma$  en el grupo de animales reactivos, pero la producción fue mayor con la segunda proteína; en animales PPD negativos no hubo estimulación con ninguno de ellos.

Como se comentó antes, el análisis de secuencia aminoterminal de las proteínas permitió identificar que la proteína con PI 4.5, corresponden a la proteína específica MPB70 de *M. bovis*, de la que se sabe es uno de los componentes más activos del PPD, con elevada capacidad para inducir la hipersensibilidad tardía, estimular una respuesta linfoproliferativa y la producción de anticuerpos en animales infectados, lo que la coloca como uno de los antígenos inmunodominantes de la bacteria. La proteína puede encontrarse en una multitud de formas consecuencia de cambios postranscripcionales que se reflejan en sus propiedades y en su peso molecular, hecho que puede explicar la diferencia en el tamaño que han encontrado otros investigadores con el que observamos (133, 153).

El número de células Bo CD4/Bo CD8 se cuantificó en cultivos de los animales en estudio para determinar si la relación no se afectaba por la estimulación *in vitro* con estas proteínas, se observó que la proporción de ambos tipos de células no se afectó en el grupo de animales PPD positivos, mientras que en el grupo de animales PPD negativos la relación aumenta, lo que significa que hay un incremento en el número de células CD 4, tal suceso resulta difícil de explicar, y puede deberse a una disminución en el número de células CD8, más que a una proliferación de células CD 4.

Por otro lado, se evaluó la reactividad de las siete proteínas separadas por electroforesis de elución continua, para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía en animales reactivos a la tuberculina y en animales negativos; la respuesta que se observó en el grupo de animales reactivos fue heterogénea, mientras que algunos respondieron fuertemente a las diferentes antígenos, otros no desarrollaron algún grado de

reactividad. En el grupo de animales PPD negativos dos animales presentaron una reacción de hipersensibilidad tardía hacia una de las proteínas de 22 kDa, y uno de estos dos, además presentó reacción con otra proteína del mismo peso. La respuesta en estos animales hacia las dos proteínas pueden representar una respuesta de memoria por un contacto previo con la bacteria o bacterias relacionadas.

Al evaluar la capacidad de las proteínas para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  *in vitro*, se encontraron resultados contradictorios para uno de los animales reactivos, que había mostrado buena respuesta de hipersensibilidad tardía a las diferentes proteínas, la estimulación *in vitro* de sus células con estos antígenos no favoreció la secreción de la citocina; en contraste, la estimulación con el PPD de *M. bovis* indujo niveles detectables de la citocina. En los cultivos del otro animal reactivo al PPD, el cual no presentó reacciones de hipersensibilidad tardía con ninguna de las proteínas, se determinaron niveles bajos y comparables de la citocina con cualquiera de las proteínas evaluadas, indicando para este animal una correlación entre las reacciones de hipersensibilidad tardía y la producción de IFN- $\gamma$ . Los resultados de producción en presencia del PPD de *M. bovis* correlacionaron bien con una buena respuesta de hipersensibilidad tardía hacia esta mezcla antigénica en los animales reactivos, al igual que para los animales PPD negativos hubo correlación con la respuesta de hipersensibilidad tardía negativa y producción no detectable de IFN- $\gamma$ . La prácticamente nula producción de IFN- $\gamma$  *in vitro* que se observó en los cultivos de uno de los animales reactivos, creemos puede deberse a la presencia de citocinas inhibitorias o al bajo número de células T específicas productoras de IFN- $\gamma$ , presentes en la sangre. En comparación la inoculación intradérmica de las proteínas pudo haber favorecido el reclutamiento y proliferación de células Th1 específicas en el sitio, donde los mediadores antagonistas de estas células probablemente se encontraban reducidos. Sin embargo, estas hipótesis no fueron mayormente aclaradas. En general, casi siempre existe una buena correlación con resultados positivos de hipersensibilidad tardía a los antígenos micobacterianos y producción de IFN- $\gamma$ , y raramente se llega a observar una producción baja de la citocina, o una respuesta linfoproliferativa disminuida con reacciones positivas de hipersensibilidad tardía.

Los resultados en general, indican variabilidad en la capacidad de respuesta de los animales, la cual guarda relación con la exposición previa con la bacteria o bacterias relacionadas, número de exposiciones, estado de la enfermedad y muy probablemente a diferencias genéticas entre los animales. La variación se refleja mayormente hacia antígenos individuales más que a mezclas un poco más complejas como las fracciones separadas por isoelectroenfoque o al propio PPD. Sin embargo, hay que recordar que el PPD contiene muchos antígenos de reacción cruzada que contribuyen con la carencia de especificidad y que el aislamiento y caracterización de los antígenos permite definir, no solo cuáles de ellos son especie-específicos, sino también cuáles son inmunodominantes.

Una evaluación de la cinética de respuesta inmune celular y humoral hacia diferentes antígenos purificados de *M. bovis* en bovinos infectados experimentalmente mostró que la respuesta hacia antígenos individuales varía en magnitud e inicio entre animales infectados, debido a las diferencias genéticas entre ellos, lo que se refleja en la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. El estudio muestra, también, que la respuesta celular hacia un antígeno en particular cambia durante el curso de la infección y que el cambio para algunos

de ellos es drástico, desde observarse en algún momento una fuerte respuesta hasta poco después ser casi indetectable, lo que provoca que el perfil de reconocimiento antigénico sea variable aún para un mismo animal durante el progreso de la enfermedad (182).

Estas observaciones apoyan nuestros resultados y confirman la necesidad de realizar mayor investigación enfocada principalmente en determinar la dinámica de la respuesta inmune hacia los antígenos micobacterianos en las diferentes etapas de la infección, con la finalidad de discernir cuales son los mecanismos que permiten modificar la cinética de reconocimiento antigénico y que modulan la interacción de las células inmunes con el microorganismo que pueden conducir a la eliminación propia del microorganismo como a las formas graves de la enfermedad que conducen al estado de anergia; sobre este en particular es un área escasamente explorada en tuberculosis bovina, a la cual se le debe poner mayor atención, debido entre otras causas a la dificultad para identificar los animales anérgicos, empleando los métodos de diagnóstico convencionales y al peligro potencial que representan como fuente diseminadora de la enfermedad.

Los futuros estudio, deben también ser extensamente aprovechables con el fin de obtener la mayor información posible de los eventos que acontecen, no solo en el sitio de infección, sino también en su periferia, debido a que mucha de la información que se tiene se ha generado por los trabajos de investigación en el área de tuberculosis humana. Tampoco hay que dejar de lado la modulación que pueden ejercer los componentes micobacterianos sobre la capacidad de los leucocitos y las células de los tejidos para producir mediadores seleccionados que le permitan evadir los mecanismos protectivos desarrollados por el hospedero.

## CONCLUSIONES

- ❖ La producción de IFN- $\gamma$  por células de memoria presentes en sangre periférica de los bovinos estimuladas *in vitro*, guarda relación con el número de exposiciones al que el sistema inmune del bovino ha estado expuesto.
- ❖ Las fracciones proteicas con puntos isoelectricos ácidos, indujeron la producción de IFN- $\gamma$ , no así las fracciones con punto isoelectrico superior a seis.
- ❖ Las células de animales tuberculosos anérgicos no produjeron IFN- $\gamma$  ante el estímulo antigénico micobacteriano *in vitro*, ni en presencia del mitógeno Concanavalina-A.
- ❖ La técnica de isoelectroenfoque permitió la separación del extracto proteico del filtrado de cultivo con un buen rendimiento, lo que facilitará su estudio en la participación de la patogenia o su evolución en la capacidad para inducir una inmunidad celular protectora a la tuberculosis bovina

## INFERENCIAS

- ❖ Las proteínas del CFPE son antígenos importantes que favorecen la inmunidad celular contra la enfermedad, al inducir la expresión de IFN- $\gamma$ , citocina que juega un papel central en la activación del macrófago al incrementar su actividad fagocítica y su capacidad para destruir las micobacterias. La separación de las diferentes proteínas permitirá determinar cuáles de estas son las más importantes para tal efecto.

## IMPLICACIONES

- ❖ La caracterización antigénica de las proteínas del CFPE y el análisis individual de la expresión de citocinas que son inducidas por ellas, ayudara a definir los antígenos que en su momento serán de utilidad diagnóstica y aquellos que deban considerarse para el desarrollo de mejores vacunas contra la tuberculosis bovina

## ANEXO DE REACTIVOS

### MEDIO DE MANTENIMIENTO DE *M. bovis*

**(Medio UTI: Lowestein-Jensen Modificado).**

#### CANTIDADES

Fosfato monopotásico (PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K)	2.4 g
Sulfato de magnesio	0.24 g
Citrato de magnesio	0.6 g
Asparagina	3.6 g
Glicerina (Bidestilada)	12.0 ml
Verde malaquita al 2 %	20.0 ml
Agua destilada	600.0 ml
Esterilizar a 121 ° C en autoclave a 15 min.	
Huevos enteros	1000 ml

#### Mezcla de Huevos

Deben usarse huevos frescos y de granjas libre de suplementación con antibióticos. Lávense con abundante agua, usando gasa o cepillo suave. Sumergirlos en alcohol al 70 % por 15 minutos y secar.

Romper los huevos asépticamente y depositar clara y yema en un frasco estéril.

#### Elaboración del medio.

Después de terminar la solución, mézclese homogéneamente

#### CANTIDAD

Solución salina	600 ml
Huevos homogeneizados	1000 ml

Distribuir en tubos de rosca y coagular en horno de tiro de aire forzado, durante 50 minutos a 85 ° C, inclinándose los tubos con tapa de rosca. Dejar enfriar en el mismo coagulador y ajustar las tapas antes de guardar.

### MEDIO DE Stonebrink.

#### Cantidad

PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub>	0.7 g
PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> H. H <sub>2</sub> O	0.4 g
Ácido pirúvico (ó piruvato de Na )	1.0 ml (ó 1.5 gr.)
Agua destilada	100 ml

Ajustar el pH 6.5 con NaOH 1.0 N.

#### Cantidad

Verde Malaquita al 2 %	5 ml
------------------------	------

Esterilizar en autoclave a 110° C durante 115 minutos. Dejar enfriar.

Añadir huevo	200 ml
--------------	--------

Coagular a 85 ° C, durante 10 minutos. En vez del medio Stonebrink puede usarse el medio UTT con piruvato añadiendo 0.5 % de piruvato de sodio a la formula normal.

## MEDIO DE CULTIVO DORSER-HENLEY

El medio empleado es una modificación del medio sintético de Dorser-Henley (Lesslie et al. , 1972).

Un litro de medio contiene los siguientes ingredientes:

L-Asparagina (natural)	12.00 g
Fosfato monopotasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , anhidro) p.a.	1.08 g
Citrato de sodio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> . 2H <sub>2</sub> O) p.a.	0.9 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O p.a	1.5 g
Citrato férrico (FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> . 5H <sub>2</sub> O) B.P. escamas	0.3 g
Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O) p.a.	0.0267 g
Sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O) p.a.	0.00267 g
Nitrato de cobalto [Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O] p.a	0.00134 g
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> , anhidro) p.a	0.0667 g
Glucosa (monohidrato de dextrosa) B.P.	10.0 g
Glicerol B.P.	100.0 ml
Agua destilada c.s.p.	1000.0 ml

Añadir hidróxido de potasio (KOH) hasta obtener pH de 6.8 (aproximadamente un ml de una solución al 50 %) ( Nota técnica N° 17).

1. - Preparación y estandarización del derivado proteico purificado (PPD) de la tuberculina. 1972. Centro Panamericano de Zoonosis. Tuberculosis- Nota Técnica N° 17. Organización Mundial de la Salud. Proyecto asistido por los Países Americanos y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo.

## DESARROLLO PARA LA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE MICOBACTERIAS

Las observaciones de las colonias aisladas se determino su morfología y la presencia o ausencia de pigmentos en oscuridad o con luz. En el caso de *M. bovis* en medio de Lowestein-Jensen, se observan colonias de color crema y en el medio de Stonebrink son blancas y en ambas de forma convexa.

Para la prueba de la niacina:

1. Adicionar 2 ml de agua destilada estéril a un cultivo de 4 semanas.
2. Incubar a 37 °C por 30 min.
3. Colocar 0.5 ml de extracto a un tubo de ensayo.
4. Añadir 0.5 ml de bencidina.

5. Añadir 0.5 ml de bromuro de cianógeno. La positividad en la prueba es cuando da una coloración rosa pálido.
6. Al finalizar la reacción, añadir solución de hidróxido de sodio, para evitar la formación de ácido cianhídrico.

Reactivo para la prueba de la Niacina

Solución de bromuro de cianógeno

Bromuro de cianógeno	10 grs.
Agua destilada	90 ml
Solución de anilina etílica	4.0 ml
Alcohol etílico al 95 %	96.0 ml

Prueba de Nitratos

1. Colocar 4 gotas de agua destilada estéril en un tubo de ensayo.
2. Emulsificar una asada de cultivo de 4 semanas (no más de 30 días)
3. añadir 2 ml de solución de buffer de nitratos e incubar a 37 ° C por 2 horas
4. Añadir 2 gotas de sulfanilamida
5. Añadir 2 gotas de N-naftilandiamina. Una prueba positivo es cuando existe la reacción de un color rojo entre 30-60 segundos.

Prueba de Catalasa

1. Colocar 0.5 ml de buffer de fosfatos estéril en un tubo de ensayo y emulsificar una asada de colonias del cultivo bacteriano.
2. Colocar a baño María a 68° C por 20 minutos
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir 0.5 ml de mezcla Tween-peroxido. Observar si hay desprendimiento de gas y no descartar hasta después de 20 minutos

## Soluciones para electroforesis SDS-PAGE.

La cantidad de reactivos preparados puede ser modificada de acuerdo a las características de los aparatos disponibles. Para proteínas de subunidades de pesos moleculares entre 15 000 – 200 000 kDa, se emplean geles de 10 % como óptimo.

Soluciones.

- A. Acrilamida (manejar con precaución, tóxica, usar guantes): 30 de acrilamida, 0.8 de N.N' methylen bis acrilamida. Para hacer una solución pesar 60 g de acrilamida y 1.6 g de bis para 200 ml. Calentar para disolver. Mantener en frasco ámbar.
- B. Buffer del gel de separación: 1,5 M Tris.HCl, pH 8.8, 0.4 % de SDS. Disolver 45.42 g de TRIS base y 1.0 g de SDS en 150 ml de H<sub>2</sub>O. Llevar el pH a 8.8 (aproximadamente 80 ml de HCl a 1 M). Aforar a 250 ml.

- C. Buffer del gel concentrador: 0.5 M de TRIS-HCl, pH 6.8, 0.4 % de SDS. Disolver 6.0 g de TRIS-Base y 0.4 g de SDS en 80 ml de H<sub>2</sub>O. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado y ajustar el volumen a 100 ml.
- D. Persulfato de amonio (10 %). Disolver 0.5 g de persulfato de amonio en 5 ml de H<sub>2</sub>O. Hacer este reactivo cada semana.
- E. TEMED: N,N,N',N'' diamina-tetrametilenthylene.

## **BUFFER DE CORRIDA.**

Existen 2 buffer's de corrida el de más uso es el N° 2.

1. 25 mM Tris, 192mM glicina, 0.1 % SDS; 6.05 g de Tris base más 28.8 de glicina más 2.0 g de SDS y aforar a 2000 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
2. 188 mM Tris, 188mM glicina, 0.1 % de SDS; pesar 22,75 g Tris base, mas 14.11 de glicina más 1.0 g de SDS y aforar a 1000 ml.

## **Buffer para las muestras (cóctel).**

Mezclar 2.5 ml del buffer del concentrador (reactivo C) más 0.2 g de SDS más 2 ml de glicerol más 0.1 ml de azul de bromofenol al 0.1 % más 1.0 de β-mercaptoetanol (sí las muestras de proteínas desean ser corridas en condiciones reductoras) más 4.2 ml de H<sub>2</sub>O. Volumen final de 10 ml. Mezclar en una relación de 1:1. Buffer de corrida más muestra.

Nota: Calentar las muestras con el buffer de corrida a 85 °C por 10 min. si las muestras fueran tratadas bajo condiciones reductoras.

## **TINCIONES.**

Azul Brillante de Coomasie R-250.

Disolver 2.5 g de azul de brillante de Coomasie R-250 en 500 ml de metanol (o etanol). Después agregar 500 ml de H<sub>2</sub>O y 100 ml de ácido acético glacial. Mezclar por 2 horas y filtrar si es necesario.

Solución para desteñir.

10 % isopropanol / 10 % ácido acético ó 10 % metanol / ácido acético.

Para mantenimiento de los geles desteñidos emplear ácido acético al 7 %.

## **Tinción de Plata**

1. Metanol 50 % / ácido acético 10 % por 30 min.
2. Glutaraldehido 8 % en H<sub>2</sub>O 45 min. Almacenar en botellas color oscuro o ámbar a 4 °C, esta solución se puede reutilizar hasta cuando tenga una coloración amarilla claro o cuando se pone amarillo oscuro o café se desecha.
3. Lavar con H<sub>2</sub>O 3 veces 10 min. C/U.
4. Mezclar :

69.1 ml de H<sub>2</sub>O

a. ml de Ag NO<sub>3</sub> (20%)

6.0 ml de NH<sub>4</sub> OH (28-30 %)

21.0 ml de NaOH (0.36 %)

Mezclar en este orden y tener cuidado cuando se agrega el Ag NO<sub>3</sub> debe ser gota a gota. Incubar el gel por 5 a 30 min.

6. Usar nuevo recipiente, moviendo el gel lavándolo con H<sub>2</sub>O 2 veces 2 min. c/u.
7. Mezclar 250 µl de ácido cítrico al 5 % con 140 ml de formaldehído (37 % botella) ajustar el volumen a 250 ml totales de H<sub>2</sub>O. Incubar hasta desarrollar color.
8. Detener la reacción con H<sub>2</sub>O y lavar por 5 min. Con ácido cítrico 7.5 % (18.75 ml ácido cítrico a 250 ml de H<sub>2</sub>O por 5 min).
9. Almacenar en H<sub>2</sub>O con un poco de glicerol (2ml/ 200 ml de H<sub>2</sub>O)
10. La sensibilidad de la prueba es de 1.5 ng de proteína.

## REACTIVOS DE INMUNOTRANSFERENCIA.

Buffer de Transferencia: 25 mM Tris (3.03 g/l), 192 mM Glicina (14.42 g/l) y metanol 10 % v/v.

Papel filtro; Whatman 3MM

Esponjas

Cámara de electrotransferencia

Fuente de poder (BIO-RAD) Power /Pac 300

Membranas de nitrocelulosa.

## Formula para reducir el alto contraste en tinciones negativas o positivas.

Se empleo la siguiente formula:

Solución A.- Para 300 cc de H<sub>2</sub>O destilada disolver 3 gramos de ferricianuro de potasio (solución concentrada).

Solución B.- Luego de disolver 30 gr de tiosulfato de sodio. Poner 300 cc de H<sub>2</sub>O destilada en un matraz.

Agregar 100 cc de sol. A y 100 c.c. de sol. B.

Sumergir la diapositiva o el negativo (geles) previamente mojadas al fondo agitando continuamente hasta obtener el aclaramiento deseado. Lavar inmediatamente en H<sub>2</sub>O.

## Determinación de proteína por el método de Bradford.

100 mg de azul brillante de Coomassie G.

50 ml de etanol al 95 %.

100 ml de ácido fosfórico al 85 %

1000 ml aforado con H<sub>2</sub>O. Filtrar y guardar en frasco ámbar

Macrométodo en tubo.

Tomar 100  $\mu\text{l}$  de muestra más 5 ml de reactivo.

En placa

10  $\mu\text{l}$  de muestra más 200  $\mu\text{l}$  de reactivo.

Micrométodo en tubo.

Tomar 100  $\mu\text{l}$  de muestra más 1 ml de reactivo.

En placa

160  $\mu\text{l}$  de muestra más 40  $\mu\text{l}$  de reactivo

La longitud de onda es de 596 nm

La detección del método es.

Macrométodo en tubo es de 0.2 - 1.4 mg/ml de proteína

Placa es de 0.05 - 0.5 mg/ml de proteína.

Micrométodo.

En tubo 1.25 - 25  $\mu\text{g}$ / ml de proteína

En placa 8.0 - 80  $\mu\text{g}$ / ml de proteína.

## **Condiciones de la separación de proteínas de *M. bovis* por medio de las características del punto isoelectrico.**

Se prepararon soluciones para ser empleadas en el rotofor.

El electrolito empleado para el cátodo fue el hidróxido de sodio (0.1 M)

NaOH P.M.: 40.0

1 gr en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  dando una molaridad de 0.1 M

El electrolito empleado para el ánodo fue el ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

Para preparar el ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0.1 M

Se observó su P.M del ácido fosfórico P.M.: 98.0

Pureza 86.3 %

Densidad 1.71 Kg densidad M/V.

0.1 M -250 ml

98 g -- 1000 ml 1 M

X g 1000 ml 0.1 M

9.8 g - 1000 ml

X -- 250 ml

X= 2.45 g.

V= 2.45 ml / 1.71 = 1.43

100 ml--- 86.3 ml

X --- 1.43

X = 1.66 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aforar a 250 ml.

## **Soluciones para lisis de glóbulos rojos de bovino.**

Buffer de lisis.

50 mM TRIS-Cl (pH 8.0) Se toman 302.0 mg para 50 ml.

1 mM EDTA Se puede tomar 50 µl de la sol 1 M y se agrega a la solución

100 mM NaCl. Se toman 290 mg para 50 ml. Se ajusta el pH ácido clorhídrico a pH 8.0 y se afora a 100 ml.

## **Anticuerpos monoclonales de ratón para linfocitos T bovinos.**

1. CD2 clona CC42 procesado en líquido ascítico en PBS isotipo IgG1 (ratón).
2. CD8 clona CC63 procesado en líquido ascítico en PBS, isotipo IgG2a (ratón).
3. CD4 clona CC30 procesado en líquido ascítico en PBS, isotipo IgG1 (ratón).

Todos los monoclonales tenían como conservador azida de sodio al 0.1 %

El monoclonal CD2 reconoce linfocitos T de bovino, caprino y humano. El CC42 es una molécula que inmunoprecipita como una molécula de 58-62 kDa.

El CD8 reacciona con antígenos expresados sobre los antígenos MHC clase I de subpoblaciones de linfocitos T para bovinos, borregos y en tejido de cabras. Este monoclonal tiene aproximadamente 34 kDa a 38 kDa bajo condiciones reductoras.

El CC30 es una molécula de aproximadamente 50 kDa y es considerada en bovinos como el homólogo para CD4 en humanos. El fenotipo, la distribución en tejido y las funciones de las células T expresado sobre los antígenos de CD4 bovinos son similares en otras especies. Sin embargo, la expresión sobre macrófagos no ha sido demostrada.

## **Reactivos para la detección del Interferón-gamma bovino.**

1. PPD de *M. bovis*.
2. PPD de *M. avium*.
3. Placas recubiertas con anticuerpos contra IFN-γ bovino.
4. Control positivo de IFN-γ liofilizado en tampón con estabilizantes proteicos.
5. Control negativo no reactivo a el IFN-γ bovino.
6. Concentrado de lavado (10x) conservado con gentamicina.
7. Conjugado peroxidasa de rábano (HRPO): anticuerpo contra el IFN-γ bovino en tampón con estabilizantes proteicos.
8. Concentrado de TMB.
9. Diluyente para TMB- tampón citrato-fosfato que contiene agua oxigenada.
10. Solución de paro ácido fluorhídrico diluido.

**Buffer salino de fosfatos (PBS)**

cantidades

Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 gr.
Cloruro de potasio (KCl)	0.200 gr
Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.40 gr
Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.20 gr
Agua deionizada	1 lt
Ajustar pH 7.2	
Esterilizar en autoclave (15 libras de presión por 20 min.).	

## BIBLIOGRAFÍA

### I. INTRODUCCIÓN.

1. Grange, J.M. 1995. Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Part I. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Pp 29-46. Thoen, O.C., Steele, H.J. Iowa State University Press/ Ames.

### II.- DEFINICIÓN DE LA TUBERCULOSIS.

2. Smith, P.G., Moos, A.R. 1994. Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. Epidemiology of tuberculosis. Pp 47-62. Bloom, B.R. Asm Press. Washington, DC.
3. Neill, S.D., Hanna, S.D., O' Brien. J.J. 1989. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle. Vet. Rec. 124, 340-347.
4. Neill, S.D., O' Brien, J.J., Hanna, J.A. 1991. Mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculosis cattle. Vet. Rec. 124, 269-275.
5. Grange, J.M. 1995. Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Part I. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Pp 29-46. Thoen, O.C., Steele, H.J. Iowa State University Press/ Ames.

### III.- HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS.

6. Tuberculosis. 1994. Pathogenesis, Protection, and Control. Bloom, B.R. ASM. Press Washintongton D.C.
7. Mederos, C.L.M. 1997. Componentes de la envoltura celular micobacteriana. Aplicaciones de técnicas cromatográficas para su análisis. Laboratorio Nacional de referencias e Investigaciones de Micobacterias y tuberculosis. Instituto de Medicina Tropical " Pedro Kourf". IPK. Cuba.
8. Chaussé, P. 1913. Des méthodes á employer pour réaliser la tuberculose expérimentale par inhalation. Bull. Soc. Med. Vet. 31, 267-274.
9. Sttele, J.H., Ranney, A.F. 1958. Animal tuberculosis. Am. Rev. Tuber. 77, 908-922.
10. Francis, J. 1958. Tuberculosis in animals and man. Cassell and Comp., Ltd. London. Pp. 70-82.
11. Collins, C.H. Grange, J.M. 1983. A review. The bovine tubercle bacillus. J. Appl. Bacteriol.. 55, 13-59.

### IV.- PRESENCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN MÉXICO.

12. Kantor, I.N., Ritacco, V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin American and the Caribbean: current status, control and eradication programs. Vet Microbiol. 40, 5-14
13. Organización Panamericana de la Salud. 1991 VII Reunión Interamericana de la Salud Animal a Nivel Ministerial. Estrategias y plan de acción para la erradicación de la tuberculosis bovina en las Américas. Washington, D.C., EUA, 30 abril-2 mayo.
14. Gurría, T.F. 1994. Situación actual de la campaña contra la tuberculosis y brucelosis en México. México Ganadero. 385, 21-28

15. Ante proyecto de Norma Oficial NOM-031-200-1995 de la campaña contra la tuberculosis bovina de la SAGAR.
16. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. 1997. Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina. SAGAR.

#### V.- IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN LA SALUD PUBLICA.

17. Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F.A.K., Kantor, I., Meslin, F.-X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*. 4, 1-16. <http://www/cdc.gov/ncidod/EID/vol4no1/cosivi.htm>.
18. Grange, J.M., Yates, M.D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* 40, 137-157.
19. Daborn, C.J., Grange, J.M. 1993. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br. Vet. J.* 149, 405-417.
20. Grange, J.M. 1995. Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Thoen, C.O., Steele, H.J. Iowa state University Press, Ames. First edition. Part 3. P.p. 29-46.
21. Raviglione, M.C., Snider, D.E., Kochi, A. 1995. Global Epidemiology of tuberculosis. *JAMA*. 273, 220-226.
22. Ellner, J.J 1994. Review Articles: Current issues in tuberculosis. *J. Lab. Clin. Med.* 123, 478-484.
23. Casal, R.M 1998. Tuberculosis. Enfermedad reemergente. *Ciencia e Investigación* N° 265. Pp. 33-34 Octubre. Edición española de Scientific American.
24. Bloom, B.R., Murray. C.J.L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 257, 1055-1064.
25. Kochi, A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tuber.* 72. 1-6.
26. Edwards. D., Kirkpatrick. H.C. 1986. The immunology of mycobacterium diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 1062-1071.
27. Murray. C.J.L., Styblo. K., Rovillon. A. 1990. Tuberculosis in developing countries burden, intervention and cost. *Bull. Int. Union Tuber. Lung Dis.* 65, 6-24.
28. Bloom. R.B. 1994. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Ed. American Society for Microbiology Press. Pp.1-2 Washington D.C.
29. Gurria. T.L. 1993. Introducción general y situación actual de la tuberculosis y brucelosis en México.
30. Karlson, AG., Carr, D.T. 1970. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Ann Intern Med.* 72, 979-983.
31. Valdespino, O.J.R., Dosseti, D.J.G., Batalla, C.D. 1995. Incidencia de la tuberculosis bovina, durante once años en establos de una cuenca lechera, con un programa de control. *Vet. Méx.* 26. Supl. 2:35-42.

32. Daborn, C.J., Grange, J.M., Kazwala, R.R. 1996. The bovine tuberculosis cycle- an African perspective. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 27S-32S.

#### VI.- IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS EN SALUD ANIMAL.

33. OPS/OMS. Guía para proyectos de tuberculosis bovina. Nota Técnica. N° 15, Rev. 1. CEPANZO, Martínez, Argentina, 1989.
34. Nader, A., Husberg, H. 1988. Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. *Rev. Med. Vet. (B. Aires)*, 69, 36-40.
35. Myers, J.A., Steele, J.H. 1969. Bovine tuberculosis control in man and animals. Warren H. Green, Inc. 1969. Pp 125-135.
36. Organización Panamericana de la Salud. 1991 VII Reunión Interamericana de la Salud Animal a Nivel Ministerial. Estrategias y plan de acción para la erradicación de la tuberculosis bovina en las Américas. Washington, D.C., EUA, 30 abril-2 mayo.
37. Comisión Nacional de Zoonosis: 1982. La tuberculosis bovina en la República Argentina. Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina.

#### VII.- TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD DE HUMANOS A GANADO BOVINO.

38. Magnus, K., 1964. Morbidity of respiratory tuberculosis among persons infected from bovine and human sources. *Bull Int. Union against Tuber.* 35, 349-354.
39. Lisslie, I.W. 1968. Cross infection with mycobacterial between animal and man. *Bull. Int. Union Against Tuberc.* 41, 285-288.
40. Wigle, W.D., Ashley, M.J., Killough, E.M., Cosens, M. 1992. Bovine tuberculosis in humans in Ontario. *Am. Rev. Respir. Dis.* 106. 528-534.
41. World Health Organization. 1992. Tuberculosis control and research strategies for the 1990's. Memorandum from a WHO. *Bull W. H. O.* 70, 17-21.
42. Szewzyk, R., Svenson, S.B., Hoffner, S.E., Bolske, G., Wahlstrom, H., Englund, L., Engval, A., Kellenium, G. 1995. Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* infections in human and animal in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3183-3185.

#### VIII.- TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS DEL GENERO MYCOBACTERIUM.

43. Skerman, V.B., Megowan, V., Sneath, P.H. 1980. Approved list of bacterial names. *International Journal of systematic bacteriology*, 30, 225-420.
44. Casal, M., Linares, M.L. 1996. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* y micobacterias atípicas. En: García-Rodríguez, J.A., Picazo, J.J. ed. *Microbiología Médica*, ED. Española. Mosby, Doyma libros. S.A., Madrid, Tomo I. Pp. 371-389.

45. Payeur, J.B., Jarnagin, J.L., Marquardt, J.G., Schaper, L.A., Martin, B.M. 1993. Veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories. United State Departament Agriculture Ames, Iowa. Pp. 14-37.
46. Gyles, L.C., Thoen, O.C. 1986. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State. University Am. Press.
47. Chávez, G.G. 1993. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observada en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y de *M. avium sp silvaticum*. Tesis para obtener el grado de Doctor. Fac de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.

#### IX.- ESTRUCTURA DE LA ENVOLTURA CELULAR MICOBACTERIANA.

48. Drapee, P. 1991. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. Res. Microbiol. 142, 420-422.
49. Rastogi, N. 1991. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterail pathogenicity, virulence and drug resistance. Res. Microbiol. 142, 462-476.
50. Ausina, R. V. 1995. Tuberculosis. Farrera Valenti, P. 13 ° edición. Mosby/Doyma libros, Madrid. Pp. 2367-2371.
51. Besra, G.S., Chatterjee, D. 1994. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. Barry, R. Bloom, ed. American Society for Microbiology, Washington., Cap. 20.
52. Felton, M.J., Vermeulen, M.W. 1996. Immunopathology of tuberculosis. Roles of macrophages and monocytes. Infect. Immun. 64, 683-690.
53. Lee, R.E., Brennan, P.J., Besra, G.S. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Tuberculosis. Shinnick. Springer. Cap I. P.p 1-25.

#### X.- PATOGENESIS DE *M bovis* EN GANADO BOVINO.

54. Anon, 1984. Ann report on research and technical work, Belfast. Her Majesty's Stationery Office. Pp. 244.
55. Pritchard, D.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988. Conquest and controversy. J. Comp. Pathol. 99, 357-399
56. Neill, S.D., Hanna, J., O' Brien, J.J., McCracken, R. M. 1989. Transmission of tuberculosis from experimentally infect cattle to -contact calves. Vet. Rec. 124, 269-271.
- 57.- Thoen, O.Ch. 1994. Tuberculosis in Wild and domestic mammals. Chapter 11 pp 157-162. Tuberculosis, Pathogenesis, and Control. Edited by Barry R. Bloom . ASM Press. Washington, DC.
58. Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40, 41-52.

59. Neill, S.D., Hanna, J., Mackie, D.P., Bryson, T.G. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet. Rec.* 131, 45-47.
60. Neill, S.D., Hanna, J., O'Brien, J.J. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340-350.
61. Hermoso de Mendoza, S.M. 1992. Tratado de Veterinaria práctica. Tuberculosis Bovina. Madrid, España. P.p 21-32.
62. Schlesinger, L.S., Bellinger, C.G., Payne, N.R., Horwitz, M.A. 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol.* 144, 2771-2780.
63. Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Russell, D.G., Rich, E.A. 1994. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 152, 743-753.
64. Shorey, J.S., Carrol, M.C., Brown, E.J. 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science.* 227, 1091-1093.
65. Ernst, J.D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66, 1277-1281.
66. Taylor, M.E., Drickamer, K. 1993. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 399-404.
67. Schlesinger, L.S. 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, 2920-2930.
68. Shepherd, V.L., Cowan, H.B., Abdolrasulnia, R., Vick, S. 1994. Dexamethasone blocks the interferon-gamma-mediated downregulation of the macrophage mannose receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 367-367.
69. Chronos, Z.C., Abdolrasulnia, R., Whitsett, J.A., Rice, W.R., Shepherd, V.L. 1996. Purification of cell-surface receptor for surfactant protein A. *J. Biol. Chem.* 271, 16375-16378.
70. Zurbrink, B.G., Czuprynsky, J.C. 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* with bovine blood monocytes derived macrophages. *Infect. Immun.* 55, 1588-1593.
71. Dannenberg Jr., A.M. 1991. Delayed type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today.* 12, 228-232.
72. McDonough, K.A., Kress, Y., Bloom, B.R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* 61, 2763-2773.
73. Rook, G.A.W., Bloom, B.R. Mechanisms of pathogenesis in tuberculosis P.p 459-502. *Tuberculosis. Pathogenesis and control.* Bloom. B.R. 1994. ASM Press. Washington, D.C
74. Thoen, C.O., Bloom, B.R. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. Part 1. Thoen, C.O., Steele, J.H. 1995 *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State University Press/ Ames.
75. Laneelle, G., Daffe, M. M. 1991, *Mycobacterium* cell wall and pathogenicity: A lipidologist's view. *Res. Microbiol.* 142, 433-437.

76. McNeil, M.R., Brennan, P. J. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacterial in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res. Microbiol.* 142, 451-463.

77. Arderso, P., Askgaard, D., Ljungquist, L., Bennedsen, J., Heron, I. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect. Immun.* 59, 1905-1910.

#### XI.- INMUNIDAD EN LA TUBERCULOSIS BOVINA.

78. Pancholi, P., Mirza, A., Schauf, V., Steinman, R.M., Bhardwaj, N. 1993. Presentation of mycobacterial antigens by human dendritic cells; Lack of transfer from infected macrophages. *Infect. Immun.* 61, 5326-5332.

79. Anne. S. Hamblin. 1993. Cytokines and cytokines receptors. Irl Press at Oxford University Press.. with British society for Immunology. In Focus. Editor: D Males 2° edition. Chapter 2. Cytokines one by one P.p 29.

80. Covert, J., Splitter, G. 1995. Detection of cytokine transcriptional profiles from bovine peripheral blood mononuclear cells and CD4<sup>+</sup> lymphocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopath.* 49, (1-2) 39-50.

81. Salgame, P., Abrams, J.S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R.L., Bloom, B.P. 1992. Differing cytokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 cell clones. *Science.* 254, 279-282.

82. Dannenberg, A.M. Jr. 1991, Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today.* 12, 229-233.

83. Kupfer, A., Singer, S.J. 1989. Cell biology of cytotoxic and helper T-cell functions. *Annual Review of Immunol.* 7, 309-337.

84. Mosmann, T.R., Coffinan, R.L. 1986. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells. *Advances in Immunol.* 46, 111-147.

85. Pober, J.S., Costran, R.S. 1991. Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. *Advances in Immunol.* 50, 261-302.

86. Kawamura, I., Tsukada, H, Yoshikawa, H., Fujita, M., Nomoto, K., Mitsuyama, M. 1992. IFN- $\gamma$  producing ability as a possible marker for protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J. Immunol.* 148, 2887-2893.

87. Yamamura, M., Wang, X., Ohmen, J.D., Uyemura, K., Rea, T.H., Blomm, B.R., Modlin. R.L.. 1992. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* 149, 1470-1475.

88. Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A., Stewart, T.A 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.* 259, 1739-1742.

89. Inoue, T., Yoshikai, Y., Matsuzaki, G Nomoto, K. 1991. Early appearing  $\gamma\delta$ -bearing T cells during infection with Clamétte-Guérin bacillus. *J. Immunol* 146, 2754-2760.

90. Beck, J.S., Morley, S.M., Lowe, J.G. 1988. Diversity in migration of CD4 and CD8 lymphocytes in different microanatomical compartments of the skin in the tuberculin reaction in man. *Br. J. Exp. Pathol.* 69, 771-776.

91. Doherty, M.L., Bassett, H.F., Quinn, P.J., Davis, W.C., Kelly, A.P., Monaghan, M.L. 1996. A sequential study of the bovine tuberculin reaction. *Immunol.* 87, 9-14.
92. Roth, J.A and Kaeberle, M.L. 1982. Effect of glucocorticoids on the bovine immune system. *A. Vet. Med. Assoc.* 180, 894-901.
93. Larsson, B., Alenius, S., Fossum, C. 1986. An analysis of immunosuppression in cattle with mucosal disease. In: P.J. Hartigan and M.L. Monaghan (Editors), *Proc. Fourteenth World Congress on Diseases of Cattle*, World Association for Buiatrics, Dublin. Vol. 1. Pp 208-214.
94. Lloyd, S. 1983. Effect of pregnancy and lactation on infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 4, 153-176.
95. Doherty, M.L., Monaghan, M.L., Bassett, H.F., Quinn, P.J., Davis, W.C. 1996. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49, 307-320.
96. Orme, I.M., Cooper, A.M. 1999. Cytokine / chemokine cascade in immunity to tuberculosis. *Immunol. Today.* 20, 307- 311.
97. Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G., Orme, I.M. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* 178, 2243-2247.
98. Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R.S., Bloom, B.R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175, 1111-1122.
99. Stenge, S., Modin, R.L. 1999. T-cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Microbiol.* 2, 89-93.
100. North, R.J., Spitalny, G 1974. Inflammatory lymphocyte in cell-mediated antibacterial immunity: factors governing the accumulation of mediator T cells peritoneal exudates. *Infect. Immun.* 10 (3), 66-77.
101. Lefford, M.J. 1975. Delayed hypersensitivity and immunity in tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 111, 243-246.
102. Andersen, P. 1977. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 45, 115-131.
103. Jakman, R.M., Stenger, S., Lea, A., Moody, D.B., Roger, R.A., Niazi, K.R., Sugita, M., Modlin, R.L., Peters, P.J., Porcelli, S.A. 1998. The tyrosine-containing cytoplasmic tail of CD1b is essential for its efficient presentation of bacterial lipid antigens. *Immuni.* 8, 341-351.
104. Gong, J., Stenger, S. Zack, J.A., Jones, B.E., Bristol, G.C., Modlin, R.L., Morrissey, P.J., Barnes, P.F. 1998. Isolation of mycobacterium reactive CD1-restrictor T cells from patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Invest.* 101, 383-389.
105. Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thomas-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S.A.S., Bloom, B.R., Krensky, A.M., Modlin, R.L. 1998. An antimicrobial activity of cytotoxic T cells mediated by granulysin. *Science.* 282, 121-125.
106. Stenger, S., Mazzaccaro, R.J., Uyemura, K., Cho, S., Barnes, P.F., Rosat, J.P., Sette, A., Brenner, M.B., Bloom, B.R., Modlin, R.L. 1997. Differential effects of cytolytic T cell sunsets on intracellular infection. *Science.* 13, 1684-1687.

107. Carding, S.R. 1998. Role of gamma delta T cells in immunity to infections diseases and the regulation development. *Immunol. Res.* 17, 13-22.
108. Manfredi, A.A., Heltai, S., Rovere, P., Sciorati, C., Paolucci, C., Galati, G., Rugarli, C., Vaiani, R., Clementi, E., Ferrarini, M. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* exploits the CD95/CD95 ligand system of gamma/delta T cells to cause apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 28, 1798-1806.
109. Li, B., Bassin, H., Rossman, M.D., Kramer, P., Eyuboglu, A.F., Torres, M., Sada, E., Imir, T., Carding, S.R. 1998. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of micobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.* 161, 1558-1567.
110. Silver, R.F., Li, O., Boom, W.H., Ellner, J.J. 1998. Lymphocyte-depend inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes: requirement for CD4<sup>+</sup> T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. *J. Immunol.* 160, 2408-2417.
111. Yoneda, T., Ellner, J.J. 1998. CD4<sup>+</sup> T cell and natural killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 158, 395-403.
112. Lu, B., Rutledge, B.J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., North, R., Gerard, C., Rollins, B.J. 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 187, 601-608.
113. Johnson, C.M., Cooper, A.M., Frank, A.A., Orme, I.M. 1998. Adequate expression of protective immunity in absence of granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice with a disruption in the intracellular adhesion molecule 1 gene. *Infect. Immun.* 66, 1666-1670.

## XII.- ANTÍGENOS RELEVANTES DE *Mycobacterium bovis*.

114. Seibert, F.B. 1934. The isolation and properties of the purified protein derivative of tuberculin. *Am. Rev. Tuber.* 30, 713-720.
115. Seibert, F.B., Glenn, J.T. 1941. Tuberculin purified protein derivative. Preparation and analysis of a large quantity for standardization. *Am. Rev. Tuber.* 44, 9-25.
116. Seibert, F.B. 1949. Isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin alcohol fractions their chemical and biologicals propierties. *Am. Rev. Tuber.* 59, 86-101.
117. Young, D B., Garbe, T., Lathigra, R., Abou-Zeid, C. 1990. Protein antigens: structure function and regulation. In: McFadden (Editor), *Molecular Biology of the Mycobacteria*. Surrey University Press., London. Pp 1-35.
118. Coates, A.R.M., Allen, R.W., Hewitt, J., Ivanyi, J., Mitchison, D.A. 1981. Antigenic diversity of *M. bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet*, II, 167, 167-169.
119. Young, R.A., Bloom, B.R., Grosskinsky, C.M., Ivanyi, J., Daves, R.W. 1985. Dissectiong *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 2583-2587.
120. Krambovitis, E. 1987. Serodiagnosis of tuberculosis in perspective. *Serodiag. Immunother.* 1, 7-19.

121. Fifis, T., Rothel, J.S., Wood, P.R. 1994. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.* 40, 64-81.
122. Espitia, C., Mancilla, R. 1989. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 77, 378-383.
123. Fifis, T., Costopoulos, C., Radford, A.J., Bacic, A., Wood, P.R. 1991. Purification and characterization of major antigens in cattle. *Vet. Microbiol.* 30, 343-354.
124. Young, D.B., Garbe, T.R. 1991. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 142, 55-65.
125. Fifis, T., Plackett, P., Corner, L.A., Wood, P.R. 1989. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 29, 91-101.
126. Ivanyi, J., Sharp, K., Jackett, P., Bothamley, G. 1988. Immunological study of the defined constituents of mycobacteria. *Springer. Semin. Immunopathol.* 10, 279-300.
127. Daniel, T.M. 1984. Soluble mycobacterial antigens. In: G.P. Kubica and L.G. Lawrence (eds.). *The Mycobacterias: A Source Book.* Marcel Dekker, New York. Pp. 417-465.
128. Grange, J.M. 1984. The humoral immune response in tuberculosis: Its nature, biological role and diagnostic usefulness. *Adv. Tuber. Res.* 21, 1-78.
129. Gupta, V.K., Ram, G.C., Bansal, M.P. 1994. Antigenic characterization of *Mycobacterium bovis* BCG soluble antigens. *Vet. Microbiol.* 38, 227-240.
130. Daniel, T.M., Janicki, B.W. 1978. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol. Rev.* 42, 84-113.
131. Closs, O., Harboe, M., Axelsen, N.H., Bunch-Christensen, K., Magnusson, M. 1980. The antigens of *Mycobacterium bovis* strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis. *Scan. J. Immunol.* 12, 249-264.
132. Engers, H.D., and workshop participants. 1985. Results of a World Health Organization sponsored workshop on monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 48, 603-605.
133. Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M.E., Torres, L., Ramírez, C., Cruz, N. 1986. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 52, 293-302.
134. Rutherford, S.L., Lindquist, S. 1998. Hsp 90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature.* 396, 336-342.
135. Gross, M., Robinson, C.V., Mayhew, M., Hartl, F.U., Radford, S.E. 1996. Significant hydrogen exchange protection in GroEL-bound DHFR is maintained during iterative rounds of substrate cycling. *Protein Sci.* 5, 2506-2513.
136. Engers, H.D. and workshop participants. 1986. Results of a World Health Organization sponsored workshop to characterize antigens recognized by mycobacteria-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 57, 718-720.
137. Wood, P.R., Ripper, J., Radford, A.J., Bundesen, P.G., Rylatt, D.B., Cottis, L.E., John, M., Plackett, P. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2599-2604.

138. Ljungqvist, L., Worsaae, A., Heron, I. 1988. Antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis* in 11 strains of inbred mice: novel monoclonal antibody specificities generated by fusions, using spleens from BALB.B10 and CBA/J mice. *Infect. Immun.* 56, 1994-1998.
139. Morris, J.A., Thorns, C.J., Wooley, J. 1985. The identification of antigenic determinants on *Mycobacterium bovis* using monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1825-1831.
140. Minden, P., Kelleher, P.J., Freed, J.H., Nielsen, L.D., Brennan, P.J., McPheron, L., McClatchy, J.K. 1984. Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium bovis* BCG with a monoclonal antibody to *M bovis* BCG. *Infect. Immun.* 46, 519-525.
141. Wood, P.R., Ripper, A.J., Radford, P.G., Bundesen, D.B., Blatt, L.E., Cottis, M.J., Plackett, P. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2599-2604.
142. Harboe, M., Wiker, H. 1992. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: A review. *J. Infect. Dis.* 166, 874-884.
143. Espitia, C., Espinosa, R., Saavedra, R., Mancilla, R., Romain, R., Laqueyrie, F., Moreno, C. 1995. Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50-55 to kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45-47 to kilodalton antigens. *Infect. Immun.* 2, 586-589.
144. Masso, R.F., Varela, E., Páez, A., Zenteno, E., Montañó, F.L. 1998. Identification of major glycoconjugates from *Mycobacterium bovis* culture filtrate by biotin-hidrazide labeling. *Glycoconj. J.* 15, 843-846.
145. Ridell, M., Ohman, R., Wallerström. 1987. Characterization of *Mycobacterium* immunoprecipitates by selective staining of enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1983-1986.
146. Closs, O., Harboe, M., Axelsen, N.H., Bunch-Christensen K., Magnusson, M. 1980. The antigens of *Mycobacterium bovis*, strain BCG, studies by crossed electrophoresis: a reference system. *Scand. J. Immunol.* 12, 249-263.
147. Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40, 111-124.
148. O'Reilly, L.M. 1995. Tuberculin skin tests; sensitivity and specificity. P.p. 85-91. In: C.O. Thoen and J.H. Steel (ed), *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State University, Ames. Iowa.
149. Hanna, J., Neil, S:D., O'Brien, J.J. 1992. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31, 243-249.
150. Nagai, S., Matsumoto, J., Nagasuga, T. 1981. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 31, 1152-1160.
151. Wiker, H.G., Harboe, M., Lea, T.E. 1986. Purification and characterization of two protein antigens from the heterogenous BCG85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG. *Int. Ach. Allergy Appl. Immunol.* 81, 298-306.

152. De Bruyn, J., Huygen, K., Bosmans, R., Fauville, M., Lippens, R., Van Vooren, J.P., Falmagne, P., Weckx, M., Wiker, H.G., Harboe, M., Turneer, M. 1987. Purification characterization and identification of 32 kDa protein antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb. Pathol.* 2, 351-366.
153. Fifis, T., Costopoulos, C., Radford, A.J., Bacic, A., Wood, P.R. 1991. Purification and characterization of major antigens from *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect. Immunol.* 59, 800-807.
154. De Bruyn, J., Bosmans, R., Turnner, M., Weckx, M., Nyabenda, J., Van Vooren, J-P., Falmagne, P., Wiker, H.G., Harbor, M. 1987. Purification, partial characterization, and identification of a skin-reactive protein antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 55, 245-252.
155. Harboe, M., Wiker, H.J., Duncan, J.J.R., Garcia, M.M., Dukes, T.W., Brooks, B.W., Turcotte, C., Nagai, S. 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for antigen MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28, 913-921.
156. Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifis, T., McCormick, B.S., Francis, B., Melville, L., Small, K., Witte, K.D., Tolson, J., Ryan, T.J., deLiesle, G.W., Cox, J.C., Jones, S.L. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31, 71-79.
157. Manca, C., Lyashchenko, R., Wiker, H.G., Usai, D., Colangeli, R., Gennaro, M.L. 1997. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 65, 16-23.
158. Lyashchenko, K.P., Pollock, J.M., Colangeli, R., Gennaro, M.L. 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 5344-5349.
159. Rambukkana, A., Das, P.K., Chand, A., Baas, J.G., Groothuis, D.G., Kolk, H.J. 1991. Subcellular distribution of monoclonal antibody defined epitopes on immunodominant *Mycobacterium tuberculosis* proteins in the 30- kDa region; identification and localization of 29/33 kDa doublet proteins on mycobacterial cell wall. *Scand. J. Immunol.* 33, 763-775.
160. Harth, G., Lee, B.Y., Wang, J., Clemens, D.L., Horwitz, M.A. 1996. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kDa major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 64, 3038-3047.
161. Leão, S.C., Lopes, J.D., Patarroyo, M.E. 1993. Immunological and functional characterization of proteins of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 complex using synthetic peptides. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1543-1549.
162. Harth, G., Lee, B-Y., Horwitz, M.A. 1997. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic *Mycobacterium* of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infect. Immun.* 65, 2321-2338.
163. Wiker, H. G., Harboe, M. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 56, 648-661.

164. Huygen, K., Lozes, E., Gilles, B., Drowart, A., Palfliet, K., Jurion, F., Roland, I., Art, M., Dufaux, M., Nyabenda, J., De Bruyn, J., Van Vooren, J-P., DeLeys, R. 1994. Mapping of TH1 helper T-cell epitopes on major secreted mycobacterial antigen 85 A in mice infected with live *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 62, 363-370.
165. Azouaou, N., Petrofsky, M., Young, L.S., Bermúdez, L.E. 1997. *Mycobacterium avium* infection in mice is associated with time-related expression of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte response. *Immunol.* 91, 414-420.
166. Consultada en la dirección de Internet: <http://www.anl.gov/home/compbio>. Terry Gaasterland, Natalia Maltsev, Ross Overbeek, and Evgeni Selkov/ [gaasterland@mcs.anl.gov](mailto:gaasterland@mcs.anl.gov), [maltsc@mcs.anl.gov](mailto:maltsc@mcs.anl.gov), [overbeek@mcs.anl.gov](mailto:overbeek@mcs.anl.gov), [evgeni@mcs.anl.gov](mailto:evgeni@mcs.anl.gov)
167. Andersen, P., Askgaard, D., Gottschau, A., Bennedsen, J., Nagai, S. Heron, I. 1992. Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scan. J. Immunol.* 36, 823-831.
168. Gulle, H., Kaufmann, S.H.E., Moriarty, K. 1993. Rapid electroelution of two-dimensionally separated protein mixtures: Its use *in vitro* assays of T cell activities. *Electrophoresis.* 14, 902-908.
169. Schoel, B., Gulle, H., Kaufmann, S.H.E. 1992. Heterogeneity of repertoire of T cells of tuberculosis patients and healthy contacts to *Mycobacterium tuberculosis* antigens separated by high-resolution techniques. *Infect. Immun.* 60, 1717-1720.
170. Gulle, H., Fray, L.M., Gormley, E.P., Murray, A., Moriarty, K.M. 1995. Response of bovine T cells to fractionated lysate and culture filtrate proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Vet. Immun. Immunopatho.* 48, 183-190.
171. Romain, F., Augier, J., Pescher, P., Marchar, G. 1993. Isolation of a proline-rich mycobacterial eliciting delay-type hypersensitivity reactions only in guinea pigs immunized with living mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90, 5322-5326.
172. Andersen, P. 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. Immun.* 62, 2536-2544.
173. Hubbard, R.D., Flory, C.M., Collins, F.M. 1992. Immunization of mice with mycobacterial culture filtrate proteins. *Clin. Exp. Immunol.* 87, 94-98.
174. Haslo, K., Andersen, A., Nagai, S., Gottschau, A., Sorensen, T., Andersen, P. 1995. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 804-810.
175. Boesen, H., Jensen, B.N., Wilcke, T., Andersen, P. 1996. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 1491-1497.
176. Engers, H. D., Bennedsen, J., Buchanan, T.M., Chapara, S.D., Kadival, G., Closs, O., David, J.R., van-Embden, J., Godal, T., Mustafa, A.S., Ivanyi, J., Young, D.B., Kaufmann, S.H.E., Khoenko, A.G., Kolk, A.H.J., Kubin, M., Louis, J.A., Minden, P., Shinnick, T.M., Trnka, L. 1986. Results of a World Health Organization-sponsored workshop to characterize antigens recognized by *Mycobacterium*-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 51, 718-720.

177. Pollock, J.M., Andersen, P. 1997. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 65, 2587-2592.
178. Weldingh, K., Rosenkrands, I., Jacobsen, S., Rasmussen, P.B., Elhay, M.J., Andersen, P. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect. Immun.* 66, 3492-3500.
179. Denis, O., Lozes, E., Huygen, K. 1997. Induction of cytotoxic T-cell responses against culture filtrate antigens in *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infected mice. *Infect. Immun.* 65, 676-684.
180. Hewinson, R.G., Russell, W.P. 1993. Processing and secretion by *Escherichia coli* of a recombinant form of the immunogenic protein MPB70 of *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1253-1259.
181. Munk, M.E., De Bruyn, J., Gras, H., Kaufmann, S.H. 1994. The *Mycobacterium bovis* 32-kilodalton protein antigen induces human cytotoxic T-cell responses. *Infect. Immun.* 62, 726-728
182. Fifis, T.C., Corner, L.A., Rothel, J.S., Wood, P.R. 1994. Cellular and humoral immune response of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. *Scand. J. Immunol.* 39, 267-274.

### XIII.- EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN LA TUBERCULOSIS BOVINA.

183. Muraille, E., Leo, O. 1998. Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Scand. J Immunol.* 47, 1-9.
184. Annunziato, F., Galli, G., Romagnani, P., Cosmi, L., Manetti, R., Maggi, E., Romagnani, S. 1999. Chemokine receptors and other surface molecules preferentially associated with human T h1 or T h2 cells. *Microbes and Infection.* 1, 103-106.
185. Huygen, K., Abramowicz, D., Vandenbussche, P., Jacobs, F., De Bruyn, J., Kentos, A., Drowart, A., Van Vooren, J.P., Goldman, M. 1992. Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG- infected mice. *Infect. Immun.* 60, 2880-2886.
186. Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G., Orme, I.M. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon- $\gamma$  gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* 178, 2243-2247
187. Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Bloom, B.R. 1993. An essential role for interferon- $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 178, 2249-2254.
188. Yssel, H., de Waal Malefyt, R., Roncarolo, M.G., Abrams, J.S., Lahesmaa, R., Spits, H., DeVries, J.E. 1992. IL-10 is produced by subsets of human CD4 T cell clones and peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 149, 2378-2384.
189. Del Prete, G., De Carli, M., Aimerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagotti, R., Romagnani, S. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150, 353-360.
190. Del Prete, G.F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., Romagnani, S. 1991. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J. Clin. Invest.* 88, 346-350.

191. Barnes, P.F., Abrams, J.S., Lu, S., Sieling, P.A., Rea, T.H., Modlin, R.L. 1993. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T cell clones. *Infect. Immun.* 61, 197-203.
192. Zhang, M., Lin, Y., Iyer, D.V., Gong, J., Abrams, J.S., Barnes, P.F. 1995. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 3231-3234.
193. Barnes, P.F., Lu, S., Abrams, J.S., Wang, E., Yamamura, M., Modlin, R.L. 1993. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 61, 3482-3489.
194. Sieling, P.A., Wang, X-H., Gately, M.K., Oliveros, J.L., McHugh, T., Barnes, P.F., Wolf, S.F., Yamamura, M., Yogi, Y., Uyemura, K., Rea, T.H., Modlin, R.L. 1994. Interleukin-12 regulates T-helper type 1 cytokine responses in human infection disease. *J. Immunol.* 153, 3639-3647.
195. Valone, S.E., Rich, E.A., Wallis, R.S., Ellner, J.J. 1988. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and mycobacterial antigens. *Infect. Immun.* 56, 3313-3315.
196. Barnes, P.F., Chatterjee, D., Abrams, J.S., Lu, S., Wang, E., Yamamura, M., Brennan, P.J., Modlin, R.L. 1992. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. *J. Immunol.* 149, 541-547.
197. Barnes, P.F., Mehra, V., Rivoire, B., Fong, S-J., Brennan, P.J., Voegtline, M.S., Minden, P., Houghten, R.A., Bloom, B.R., Modlin, R.L. 1992. Immunoreactivity of a 10 kD antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 148, 1935-1840.
198. Moreno, C., Taverne, J., Mehlert, A., Bate, C.A.W., Brealey, R.J., Meager, A., Rook, G.A.W., Playfair, J.H.L. 1989. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 76, 240-245.
199. Robertson, M.J., Soiffer, R.J., Wolf, S.F., Manley, T.L., Donahue, C., Young, D., Herrmann, S.H., Ritz, J. 1992. Response of human natural killer cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): Cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* 175, 779-788.
200. Gately, M.K., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Chizzonite, R. 1992. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell. Immunol.* 143, 127-142.
201. Bertagnoli, M.M., Lin, B-Y., Young, D., Herrmann, S.H. 1992. IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 149, 3778-3783-
202. Suguwara, I., Yamara, H., Kanero, H., Mizuno, S., Takeda, K., Akira, S. 1999. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect. Immun.* 67, 2585-2589.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. CULTIVO DE *M bovis* Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE FILTRADO DE CULTIVO.

203. Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de la Tuberculosis y otras Micobacterias. (1997). Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). La Habana, Cuba.
204. Thoen, C.O. (1990). The genus *Mycobacterium*. In Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. Fifth Ed. Ed. Carter G.W., and Cole, J.R., P.p. 287-298. San Diego Calif.; Academic Press, Inc.
205. Preparación y estandarización del derivado proteico purificado (PPD) de la Tuberculina Nota Técnica N° 17 Nov. 1972. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires. Argentina. OPS.OMS
206. Tijssen. P. 1988. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier. Chapter 7 Purification of immunoglobulins and preparation of Fab fragments P.p 95-122.
207. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254 .

### II. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE CFPE DE *M bovis* EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

208. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature. 227, 248-254..
209. Andrews, A.T. (1981). Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. Cap I Basic principles of electrophoresis. P.p 1. Cap II. Polyacrylamide gel electrophoresis (page. Homogeneous gel and buffer systems. P.p. 5-47. Oxford University. Clarendon Press.
210. Westermeier, W. (1997). Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. E. Ed.- Weinheim: VCH. Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 (Federal Republic of Germany). Section. I Electrophoresis and Section II Method 7: SDS-polyacrylamide electrophoresis.
211. Merril, C.R., Switzer, R.C., Van Keuren, M.L. 1979. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and highly sensitive silver stain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4335-4339.

### III. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS DE PUNTO ISOELECTRICO.

212. Egen, N.B., Bliss, M., Mayersohn, M., Owens, S.M., Arnold, L., Bier, M. (1995). Isolation of monoclonal antibodies to phencyclidine from Ascities fluid. US/EG Bulletin 1475. (Rotofor Review N° 1) BIO-RAD.

213. Pollard, K.M., Chan, E.K.L. Grant, B.J., Sullivan, K.F., Tan, E.M., Glass, C.A. 1990. In vitro posttranslational modification of lamina B cloned from a human T-cell line. *Molec. Cell. Biol.* 10, 2164-2175.

214. Senecal, J.L., Raymond, Y. 1992. Autoantibodies to major and minor nuclear lamins are not restricted to autoimmune disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 63, 115-125.

#### IV. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (BOVINOS).

215. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO (1995). Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). <http://www.sagar.gob.mx/users/Conasag/nomfb.htm>.

216. Brucelosis y Tuberculosis (*M bovis*). Situación de los Programas en las Americas. Enero 2000. Publicación N° 1. ANAFTOSA/PS/OMS.

#### V. - AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO

217. Payeur, J.B., Jarnagin, J.L., Marquardt, J.G., Schaper, L.A., Martin, B.M. 1993. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology and identification of mycobacterium. Chapter 3 and 4. Collection of samples and processing of animal tissue for isolation of mycobacteria. National veterinary Service Laboratories. United State Department of Agriculture Ames, Iowa .

#### VII. TÉCNICA DE PCR.

218. Wilton, S., Cousins. D. 1992. Detection and identification of multiplex micobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *Res. PCR methods and applications.* 1, 269-273.

219. van Soolingen, D., Haas, P.E.W., Hermans, P.W.M., van Embden, J.A. 1994. Isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Current Protocols in Molecular Biology.* 13, 6-7.

220. Cousins, D.V., Wilton, S.D., Francis, B.R. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *mycobacterium bovis*. *Vet. Microbio.* 27, 187-195.

221. Primer curso internacional UNU/Biolac 1997 de : Biología Molecular Aplicada a la Tuberculosis. Instituto de Biotecnología CICV/INTA. Castelar, Argentina. Red Latinoamericana y del Caribe de Tuberculosis. INTA-THE United Nations University.

222. Wards. B.J., Collins, D.M., de Lisle, G.W. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 43, 227-240.

223. Rodriguez, J.G., Mejia, G.A., Del Portillo, P., Patarrollo, M.E., Murillo, L.A. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiol.* 141, 2131-2138.

## VIII. ANÁLISIS DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

224. Towbin, H., Steahelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4530-4354.
225. Rosenberg, I.M. 1996. Protein Analysis and Purification. Benchtop Techniques. Chapter 7. Transfer and detection of proteins on membrane supports. Pp. 153-179. Birkhauser. Boston. Printed in the U.S.A.

## XI. ENSAYO DE INTERFERON GAMMA

226. Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifis, T., McCormick, B.S., Francis, B., Melville, L., Small, K., DeWitte, K., Tolson, J., Ryan, T.J., Lisle, G.W., Cox, J.C., Jones, S.L. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 31, 71-79.
227. Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust. Vet. J. 67, 134-137.
228. Wood, P.R., Rothel, J.S., McWaters, P.G.D., Jones, S.L. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. Vet Immunol. Immunopathol. 25, 37-46.
229. Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R. 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. Aust. Vet. J. 69, 1-4.
230. Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormick, B.S., Francis, B.R., Creeper, J., Tweddle, N.E. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the single intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust. Vet. J. 68, 286-290.
231. Wood, P.R., Corner, L.A., Plackett, P. 1990. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$  interferon. Res. Vet. Science. 49, 46-49.

## XII. DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4/CD8.

232. Heir, D.M. 1982. Handbook of experimental immunology . Vol. 2 Cellular Immunology. Cap. 23. The preparation and labeling of lymphocytes. W.L. Ford. P.p 23.1-23.19. Blackwell Scientific Publications. Third edition.
233. Bensaid, A., Hadam, M. 1991. Individual antigens of cattle. Bovine CD4 (Bo CD4). Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 51-54.
234. MacHugh, N.D., Bensaid, A., Howard, C.J., Davis, W.C., Morrison, W.I. 1991. Analysis of the reactivity of anti-bovine CD8 monoclonal antibodies with cloned T cell lines and mouse L-cells transfected with bovine CD8. Vet. Immunol. Immunopathol. 27, 169-172.

## XIII. DISCUSSION

235. Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J., Heron, I. 1992. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect. Immun.* 59, 1905-1910.
236. Demissie, A., Ravn, P., Olobo, J., Doherty, M.T., Eguale, T., Geletu, M., Hailu, W., Andersen, P., Britton, S. 1999. T-cell recognition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate fractions in tuberculosis patients and their household contacts. *Infect. Immun.* 67, 5967-5971.
237. Armitige, L.Y., Jagannath, C., Wanger, A.R., Norris, S.J. 2000. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Effect on growth in culture and in macrophages. *Infect. Immun.* 68, 767-778.
238. O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
239. Havlir, D.V., Wallis, R.S., Boom, W.H., Daniel, T.M., Chernenak, K., Ellner, J.J. 1991. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect. Immun.* 95, 665-670.
240. Amadori, M., Tameni, S., Scaccaglia, P., Cavirani, S., Archetti, L.L., Giandomenico, R. Q. 1998. Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis* infected bovine herds. *J. Clin. Microbiol.* 36, 566-568.
241. Auer, L.A., Schleeauf, S.M. 1988. Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology.* 18, 51-61.
242. Fifis, T., Costopoulos, C., Corner, L.A. Wood, P.R. 1992. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet. Microbiol.* 30, 343-354.
243. Vilcek, J., Klion, A., Henriksen-DeStefano, D., Zemtsov, A., Davidson, D.M., Davidson, M., Friedman-Kien, A.E., Le, J. 1986. Defective gamma interferon production in peripheral blood leukocytes of patients with acute tuberculosis. *J. Clin. Immunol.* 6, 146-151.
244. Onwubalili, J.K., Scott, G.M., Robinson, J.A. 1985. Deficient immune interferon production in tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 59, 405-413.
245. Tootsi, Z., Ellner, J.J. 1996. Mechanism of anergy in tuberculosis. In *Tuberculosis*, Edited by Shinnick T.M. p.p. 221-234.
246. Skamene, E. 1986. Genetic control o resistance to mycobacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 124, 49-66
247. Tootsi, Z., Lapurga, J.P., Ondash, R., Sedor, J.R., Ellner, J.J., 1990. Expression of functional interleukin-2 receptors by peripheral blood monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Invest.* 85, 1777-1784.
248. Tweardy, D.J., Schacter, B.Z., Ellner, J.J. 1984. Association of altered dynamics of monocytes surface expression of human leukocytes antigen DR with immunosuppression in tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 149, 31-37.
249. Wahl, S. 1992. Transforming growth factor beta: a cause and a cure. *J. Clin. Immunol.* 2, 61-71.

250. Tootsi, Z., Gogate, P., Shiratsuch, H., Young, T., Ellner, J.J. 1995. Enhanced production of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) from patients with active tuberculosis and presence of TGF- $\beta$  in tuberculous granulomatous lung lesions. *J. Immunol.* 154, 465-473.
251. Bermudez, L.E. 1993. Production of transforming growth factor- $\beta$  by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness of IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 150, 1838-1845.
252. Fugiwara, H., Kleinhenz, M.E., Wallis, R.S., Ellner, J.J., 1986. Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 73-77.
253. Kleinhenz, M.E., Ellner, J.J. 1985. Immunoregulatory adherent cells in human tuberculosis: radiation-sensitive antigen-specific suppression by monocytes. *J. Infect. Dis.* 152, 171-176.
254. Hernández-Pando, R., Orozco, E.H., Arriaga, K., Sampieri, A., Larriva-Sahd, J., Madrid-Marina, V. 1997. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor-  $\beta$ , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunol.* 90, 607-617.