

01674
41



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

CRECIMIENTO INTRACELULAR DE *Mycobacterium bovis* EN MACROFAGOS BOVINOS RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A PARASITOS INTRACELULARES Y SU ASOCIACION AL POLIMORFISMO DE LA 3'UTR DEL *Nramp1*.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANTONIO JAVIER VALLECILLO MAZA

TUTOR:

DR. JOSÉ ANGEL GUTIÉRREZ PABELLO

COMITÉ TUTORAL:

DRA. CLARA INES ESPITIA PINZON

DRA. CRISTINA ESCALANTE OCHIOI

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi obra.

NOMBRE: Vallecillo Maza Antonio Javier

MEXICO, DF

FECHA: 01- dya - 2003

2003

FIRMA:

~~TESTADEN~~
FALLA DE ORIGEN

1



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

DEDICATORIAS:

A mi familia, ejemplo de honestidad y lucha cotidiana para lograr hacer realidad los sueños. "Por que nadie elige ser héroe, pero alguien tiene que hacer las cosas".

A ti, por que no solo he tenido la oportunidad de compartir mis logros.

A tu memoria, por que en cualquier sitio que el destino me depare estarás junto a mí.

A todos y a cada uno de mis amigos, el tesoro de mayor valor que nos regala la vida en el momento más necesitado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

AGRADECIMIENTOS:

A todos y cada uno de los miembros del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM por la amistad y respeto recibido.

A los integrantes de mi Comité tutorial y Jurado por su disponibilidad y atenciones proporcionadas.

A los Doctores José Ángel Gutiérrez Pabello y David I. Martínez Herrera por la confianza y la oportunidad otorgadas para la realización de mis estudios de maestría. Pero más aun por su amistad.

Al financiamiento otorgado por: PAPIIT proyecto número IN-219999 y CONACyT proyecto número 34833-B, becario con número de registro 158490.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3

INDICE:

	Página
INDICE	i
LISTA DE GRAFICAS, CUADROS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1.0 INTRODUCCION	1
2.0 ANTECEDENTES	7
3.0 JUSTIFICACION	9
4.0 HIPÓTESIS	11
5.0 OBJETIVOS	12
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS	13
6.1 TAMAÑO DE MUESTRA	13
6.2 IDENTIFICACION DEL FENOTIPO DE LOS ANIMALES Y EVALUACION DEL CRECIMIENTO INTRACELULAR DE <i>M. bovis</i> PATOGENO	14
6.2.1 CEPAS BACTERIANAS	14
6.2.1.1 PREPARACION DE INOCULOS	15
6.2.1.2 DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS COLONIAS (UFC) DEL INÓCULO	15
6.2.2 OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	17
6.2.3 DESARROLLO DEL ENSAYO BACTERICIDA	19
6.2.3.1 CLASIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ANIMALES CON <i>M. bovis</i> BCG Y EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO INTRACELULAR DE <i>M. bovis</i> PATOGENO	21
6.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE CONFORMACION MONOCATENARIA DE LA 3'UTR del <i>Nramp1</i>	21
6.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE SANGRE	22

i

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.3.2	AMPLIFICACIÓN DE LA 3'UTR DEL <i>Nramp1</i> BOVINO	23
6.3.3	ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE CONFORMACION MONOCATENARIA	23
7.0	RESULTADOS	25
7.1	CINÉTICAS DE CRECIMIENTO	25
7.2	ENSAYOS BACTERICIDAS	25
7.2.1	IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES NATURALMENTE RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A PARÁSITOS INTRACELULARES	25
7.2.2	CRECIMIENTO INTRACELULAR DE <i>M. bovis</i> PATÓGENO EN MACRÓFAGOS DE BOVINOS RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A PARÁSITOS INTRACELULARES	26
7.3	AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL FRAGMENTO DE LA 3'UTR DEL <i>Nramp1</i> Y ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE CONFORMACION MONOCATENARIA	27
7.4	ASOCIACION DEL POLIMORFISMO DE LA 3'UTR DEL <i>Nramp1</i> CON LA ACTIVIDAD CONTRA <i>M. bovis</i> PATOGENO DE LOS MACROFAGOS IDENTIFICADOS COMO RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A PARASITOS INTRACELULARES	27
8.0	DISCUSION	37
9.0	CONCLUSIONES	42
10.0	PERSPECTIVAS	43
11.0	BIBLIOGRAFIA	44
12.0	ANEXOS	52

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

LISTA DE GRAFICAS, CUADROS Y FIGURAS:

Graficas:		Pagina
	1. Cinéticas de crecimiento de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG y 9926	29
	2. Porcentaje de crecimiento intracelular de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	30
	3. Porcentaje de crecimiento intracelular de <i>Mycobacterium bovis</i> 9926	31
	4. Crecimiento intracelular de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG y 9926	32
Cuadros:		
	1. Distribución del comportamiento de los macrófagos resistentes y susceptibles contra <i>M. bovis</i> patógeno en relación con los polimorfismos de la 3'UTR del <i>Nramp1</i> identificados por análisis de conformación monocatenario	36
Figuras:		
	1. Localización de la NRAMP1	4
	2. Reacción de Fenton-Habers-Weiss	5
	3. Localización del <i>Nramp1</i>	8
	4. Macrófagos bovinos infectados con <i>Mycobacterium bovis</i>	33
	5. Electroforesis en gel de agarosa	34
	6. Electroforesis en gel de Acrilamida/Bis-acrilamida (Análisis de conformación monocatenario)	35

RESUMEN:

Crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares y su asociación al polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1*.

Vallecillo MAJ*, Gutiérrez-Pabello JA, Espitia C, Escalante-Ochoa C.

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510

El control y erradicación de la tuberculosis bovina impactan a nivel económico y productivo en los hatos afectados. Para hacer frente a esta enfermedad es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas. Una herramienta prometedora es la identificación, caracterización y selección de bovinos resistentes a parásitos intracelulares bacterianos; como *Mycobacterium bovis* (*M. b.*). Para la identificación, se recomendó en 1995 la utilización de los ensayos bactericidas con *M. b.* BCG; en donde se designan como susceptibles (S) aquellos que permitan el crecimiento intracelular en un porcentaje superior a 65 % y resistentes (R) aquellos menos permisivos. En el presente trabajo se utilizó en el ensayo bactericida *M. b.* BCG para identificar animales naturalmente R y S a parásitos intracelulares. Un aislado de campo fue utilizado para evaluar su crecimiento intracelular en macrófagos de animales R y S. Y asociar el fenotipo resistente a un polimorfismo presente en 3'UTR del *Nramp1* identificado mediante SSCP. De 24 bovinos adultos clínicamente sanos y libres de tuberculosis se tomó sangre venosa para la obtención de macrófagos y DNA. La monocapa de macrófagos fue infectada en placas de cultivo de Terasaki (HLA) con *M. b.* BCG y la cepa de campo a una multiplicidad de la infección (MOI) de 10:1, 24 h después se determinaron las unidades formadoras de colonias. El producto de PCR de la 3'UTR del *Nramp1*, amplificado de las muestras de DNA se sometió a SSCP. De los 24 animales evaluados, 21 se comportaron como S. Al evaluar mediante la prueba de Mann-Whitney el crecimiento intracelular de *M. b.* patógeno, se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento bacteriano en macrófagos de animales R y S ($p < 0.05$). Los alelos del *Nramp1* identificados no evidenciaron asociación estadística con la capacidad bactericida de los macrófagos. En conclusión, los macrófagos de animales R demostraron tener una mayor eficiencia en su actividad bactericida, no los S que fueron incapaces de controlar el crecimiento bacteriano. Sin embargo, no se asoció a los alelos del *Nramp1* ya relacionados con resistencia o susceptibilidad natural a *Brucella abortus* cuando se utilizó *M. b.* patógeno como inóculo. Es posible que otro polimorfismo del *Nramp1* o de otros genes pueda asociarse a este fenotipo, lo cual abre la posibilidad de seleccionar animales con una mayor capacidad de poder controlar la infección por *M. b.* patógeno.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, Resistencia natural, Macrófagos, *Nramp1*, Ensayo bactericida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT:

Intracellular growth of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages resistant or susceptible to intracellular parasites and their association to the polymorphism of the 3'UTR of the *Nramp1*. Vallecillo MAJ*, Gutiérrez-Pabello JA, Espitia C, Escalante-Ochoa C.

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510

Control and eradication of bovine tuberculosis impacts affected cattle ranches at the economic and productive level. In order to face this disease it is necessary to search for new alternative methods. A promising tool is the identification, characterization and selection of cattle naturally resistant to intracellular parasites; like *Mycobacterium bovis* (*M. b.*). A bactericidal assay with *M. b.* BCG was recommended in 1995 for the identification of the resistance phenotype against intracellular parasites, in which those that allows intracellular growth in a percentage of 65 % or more are designated susceptible (S) and those less permissive resistant (R). In the present study a bactericidal assay using *M. b.* BCG was conducted to identify cattle naturally R and S to intracellular parasites. A virulent field strain was also used to evaluate its intracellular survival in macrophages from R and S cattle. It was also intended to associate the resistant phenotype to a polymorphism present in 3'UTR of the bovine *Nramp1* gene through a SSCP analysis. Citrated peripheral venous blood was collect from 24 tuberculosis free and healthy adult cattle to obtained macrophages and genomic DNA. Macrophage monolayers in tissue culture Terasaki (HEA) plates were infected with *M. b.* BCG and virulent field strain at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1, and colony forming units were evaluated 24 hours later. A PCR product from the 3'UTR of *Nramp1* was amplified from the DNA samples and analyzed under SSCP conditions. Out of 24 cattle, 21 were permissive to *M. b.* BCG growth and were classified as susceptible. A Mann-Whitney analysis showed that macrophages from resistant and susceptible cattle differed significantly ($P < 0.05$) in controlling intracellular growth of virulent *M. b.* Results from SSCP did not show any association between the bactericidal activity of the macrophages and the polymorphism of the *Nramp1*. In conclusion, macrophages from R cattle were superior than macrophages from S cattle to control the in vitro intracellular replication of both strains. The polymorphism reported to have a strong association to *Brucella abortus* resistance in cattle did not replicate the information when *M. b.* was used as the inoculum in the macrophages. It is possible that different polymorphism of *Nramp1* or from another genes may be associated to this phenotype opening the possibility to select cattle with a greater capacity to control the infection by virulent *M. b.*

Keywords: Bovine tuberculosis, Natural resistance, Macrophage, *Nramp1*, Bactericidal assay.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.0 INTRODUCCION:

La tuberculosis, antigua plaga de la humanidad causada por *Mycobacterium tuberculosis* el cual infecta hoy en día alrededor de un tercio de la población mundial. Cerca de un 5 % de los seres humanos recién infectados desarrollara la enfermedad en un lapso de 5 años. Sus estragos se resumen en alrededor de 8 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes anuales. A lo anterior debemos adicionar la pandemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA); enfermedad que diezma el sistema inmológico de los individuos infectados generando condiciones que propician la reactivación de la tuberculosis o una mayor susceptibilidad al ingreso del agente etiológico.^{1,2}

Las primeras descripciones de la tuberculosis son referidas por Hipócrates (460-377 a. c.), Lebert denominó "Corpúsculo tuberculoso" a la lesión característica de la enfermedad. El desarrollo de nuevas teorías sobre el origen de las enfermedades estableció como posible causa un agente microbiano. Klencke en 1843, observó lesiones en, el hígado y, el pulmón tras las primeras inoculaciones de material tuberculoso en conejos. El trabajo más esclarecedor sobre el origen de la enfermedad fue sin duda el de Villemin en 1865, quien inoculó en animales material purulento procedente de lesiones tuberculosas humanas, pus no tuberculoso y pus tuberculoso de bovino. Confirmó así la teoría específica de la enfermedad y estableció una aparente identidad nosológica de la tuberculosis bovina y humana. El mejor aporte metodológico fue hecho por Conheim, al inocular material infeccioso en la cámara anterior del ojo de conejos, lo que facilitó observar la progresión de las lesiones. Fue hasta 1882 cuando se aisló en forma pura el bacilo tuberculoso humano por el alemán Robert Koch, siguiendo la metodología sugerida por Henle para confirmar el origen infeccioso de una enfermedad. Ya desde esta época fue cuestionada la aparente identidad etiológica de todas las formas de tuberculosis en diversas especies animales y humana, esta controversia se basó en las diferentes características de los cultivos, virulencia y transmisibilidad

del bacilo entre especies animales. Ya desde 1863, Virchow promulgaba que la tuberculosis bovina y humana no eran enteramente iguales, concepto contrario a lo expresado por Koch en 1882. Subsecuentes ensayos hechos por Chauveau, Gunther, Harms y Bollinger no fueron capaces de reproducir la enfermedad en bovinos, cerdos y cabras alimentados con material tuberculoso humano, pero si en animales alimentados con leche y pulmones contaminados con el bacilo bovino. Baugarten (1893) cuestiono la completa identidad etiológica de la enfermedad en bovinos y humanos; años después tras una serie de experimentos se postulo que el bacilo de origen humano tenía una menor capacidad para establecer la infección en el bovino y por el contrario, el bacilo bovino mostró una mayor virulencia en esta especie animal. En 1904, tras debates científicos se comenzó a dudar sobre las enseñanzas de Koch en relación a la trasmisibilidad del bacilo bovino al humano, concluyéndose que algunas formas de tuberculosis humana especialmente en niños, eran debidas a la introducción del bacilo de la tuberculosis bovina a través de la ingestión de leche contaminada. Estas conclusiones están acordes a lo expresado por los Doctores Schroeder y Cotton en "The bulletin of the Bureau of Animal Industry of the United States Department of Agriculture", donde afirman que: "una vaca tuberculosa constituye un elemento de mas peligro para la salud humana comunitaria que un humano tuberculoso".³

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible, con tendencia a la cronicidad, causada principalmente por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) miembro del complejo tuberculosis. Al igual que la tuberculosis del humano se caracteriza por el desarrollo de lesiones denominadas granulomas.⁴⁻¹² La ruta principal de infección en el ganado bovino es la vía respiratoria, la mayoría de las lesiones tuberculosas en los animales enfermos se encuentran en los tejidos que conforman o se asocian al aparato respiratorio.¹³⁻¹⁷ La vía aerogena no es la única forma de ingreso de *M. bovis*, es posible que la infección se inicie a través del tracto digestivo, sin embargo, la dosis infectiva requerida por esta vía es mucho mayor en comparación con la aerogena, en la cual la infección puede ser establecida por un solo bacilo.^{13-15, 18} El tamaño del inoculo que ingresa al animal tiene

una relación inversa al periodo de tiempo de inicio de excreción del bacilo por el animal infectado, aun menor número de bacterias que ingresan más tiempo y viceversa; dicha excreción en las infecciones en campo se inicia 12 a 14 semanas postinfección en promedio.^{16, 19} La transmisión de la enfermedad en el hato depende de una serie factores asociados a las condiciones ambientales que enfrenta la bacteria, la resistencia o susceptibilidad del hospedero y la virulencia de la bacteria. Ambientes húmedos, templados y protegidos de los rayos solares beneficia la supervivencia de la bacteria por largos periodos conservando su capacidad infecciosa.²⁰

La bacteria contenida en gotas pequeñas de moco fluido expectoradas por un animal infectado e inhaladas por uno sano induce una reacción inflamatoria en el tejido pulmonar que genera la acumulación de neutrofilos en primera instancia, los cuales son remplazados por macrófagos que intentan capturar y eliminar el bacilo.^{15, 21, 22} Cuando esta última célula no logra destruir a la bacteria se convierte en la célula hospedera de la micobacteria.⁵ Sin embargo, esta célula puede variar su comportamiento contra la bacteria, por influencia de varios factores, entre ellos la resistencia natural a la enfermedad.^{15, 23} Esta capacidad provee al individuo que la posee una mayor posibilidad de controlar las infecciones, por lo tanto ser resistente y sobrevivir a la enfermedad. La capacidad de resistencia a una enfermedad puede ser transmitida a la descendencia, la heredabilidad de esta condición hace que en las siguientes generaciones de individuos la proporción de resistentes sea mayor que en un principio cuando la población no estaba sometida a una presión de selección por la enfermedad.²⁴ En este sentido se ha descrito la participación del gen *Nramp1* (*Bcg/Ity/Lsh* locus, *Sle11a1*) (Natural resistance-associated macrophage protein 1) en el control temprano de la infección por microorganismos intracelulares no relacionados, dentro de los cuales se encuentran los géneros *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium* y *Leishmania*.²⁵⁻²⁹

El *Nramp1* codifica para una proteína integral de membrana que se recluta al fagosoma formado por la ingestión de la bacteria (*Figura 1*). Esta proteína se expresa principalmente en los macrófagos del tejido pulmonar y del bazo. Así como en células que conforman la lesión

granulomatosa inducida por la presencia de la micobacteria.^{26, 30} El análisis de la estructura de la proteína NRAMP1 ha demostrado que posee características en común con otras proteínas que funcionan como canales y transportadores de iones.^{31, 32}

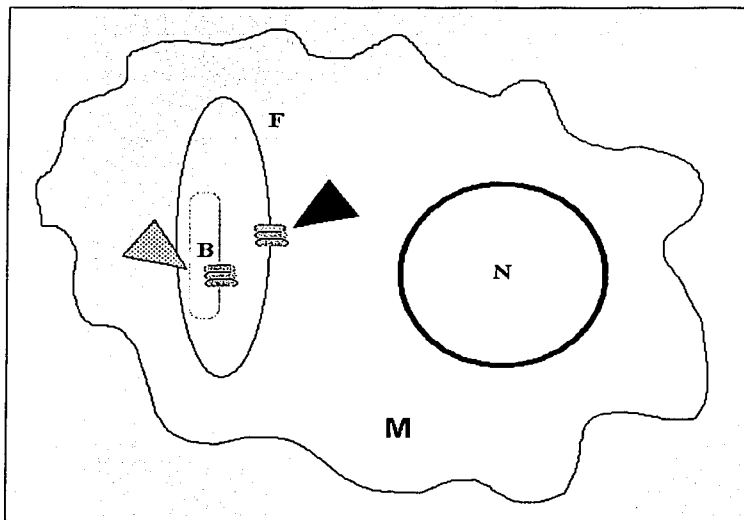


Figura 1: Localización de la NRAMP1 bovina (Punta de flecha negra) en la membrana del fagosoma (F) que contiene la bacteria (B), producto del *Mramp* (Del inglés Mycobacterial homologue of *Nramp*) (Punta de flecha punteada), Núcleo (N), Macrófago (M).

En la actualidad se postulan dos hipótesis para explicar el posible mecanismo de acción de la NRAMP1 en contra del microorganismo fagocitado. Por un lado se propone que la NRAMP1 es una proteína capaz de retirar el Fe^{2+} y otros cationes divalentes del ambiente fagolisosomal. Esto limita su disponibilidad para la bacteria que los requiere como cofactores de enzimas. De especial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

importancia resulta el Mn^{2+} , que es cofactor de la superóxido dismutasa de algunas bacterias, a las que les confiere protección contra compuestos reactivos de oxígeno. La bacteria al poseer un gen homólogo al *Nramp1* establece una competencia por los cationes divalentes disponibles en el fagolisosoma (Figura 1).³³⁻⁴¹ Quienes apoyan este mecanismo de acción de la NRAMP1 se basan en la alta similitud que posee esta molécula con la NRAMP2, proteína que se localiza en la superficie apical de los enterocitos y cuya función es la de permitir el paso del Fe^{2+} captado por estas células del intestino desde el endosoma temprano hacia el citoplasma. Las mutaciones en este gen en las ratas se ha relacionado con anemia por baja captación de Fe^{2+} .⁴²⁻⁴⁷

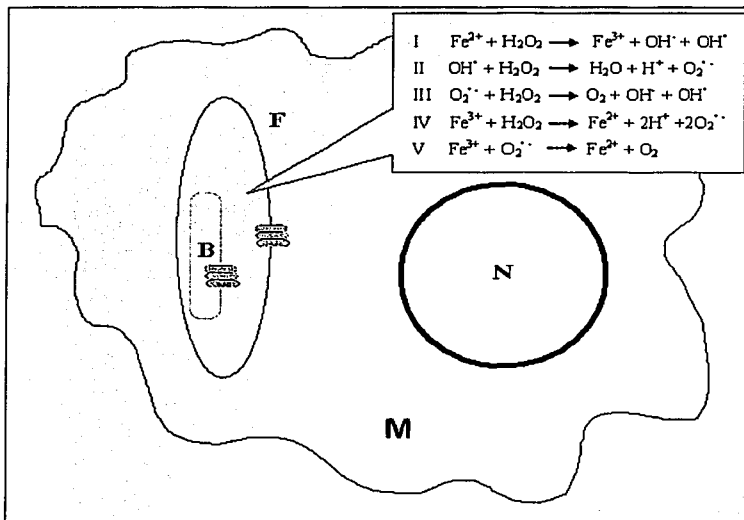


Figura 2: Reacción Fenton-I haber-Weiss. Fagosoma (F), Bacteria (B), Núcleo (N), Macrófago (M).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La otra vertiente sugiere que NRAMP1 funciona como un antiporter, introduciendo Fe^{2+} al espacio fagolisosomal. El Fe^{2+} ingresado actúa como catalizador para la formación de compuestos con mayor poder oxidante al interactuar con los reactivos de oxígeno y nitrógeno (ROIs y NOIs del inglés Reactive Oxygen Intermediates y Reactive Nitrogen Intermediates respectivamente) mediante la reacción de Fenton-Habert-Weiss, lo anterior genera un efecto bactericida mayor contra el microorganismo fagocitado (*Figura 2*).⁴⁶⁻⁵⁶

Ambas explicaciones poseen lógica, sin embargo los resultados de los trabajos experimentales no han sido concluyentes en apoyo de una de ellas. Lo cierto es que NRAMP1 induce un cambio en el ambiente fagolisosomal y que en ciertos individuos actúa con mayor eficiencia, aumentando la capacidad bactericida del macrófago y por ende confiriéndole una mayor resistencia a la enfermedad en este nivel de la infección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.0 ANTECEDENTES:

La existencia del *Nramp1* en bovinos fue identificada por Feng *et. al* en 1996. El gen *Nramp1* bovino es expresado primariamente en macrófagos de pulmón, bazo y algunas células que conforman el granuloma tuberculoso.^{30,37} Este gen se localiza en la posición 2q43-q44 del genoma bovino (*Figura 3*), codifica para una proteína de 548 aminoácidos, con un peso molecular de 59567 Da, que posee siete dominios extracelulares, con un sitio de glicosilación en el aminoácido 335 del cuarto dominio extracelular.^{38, 59} El análisis del polimorfismo conformación monocatenaria (SSCP del ingles Single-Stranded Conformational-Polymorphism) de la región no traducida 3' (3'UTR del ingles 3' Untranslated Region) del *Nramp1* bovino mostró un polimorfismo asociado en forma altamente significativa a la resistencia natural del ganado a *Brucella abortus* (*B. abortus*).⁵⁷

En otro sentido Qureshi *et. al* (1995) demostraron mediante ensayos bactericidas que los macrófagos procedentes de ganado resistente a un desafío *in vivo* con *B. abortus*, poseen una mayor capacidad que los macrófagos de ganado susceptible para el control del crecimiento intracelular de *B. abortus*, *M. bovis* BCG y *Salmonella dublin* (*S. dublin*). Por lo que estos autores recomiendan el uso de este ensayo para la identificación de ganado resistente o susceptible a parásitos intracelulares bacterianos.⁶⁰

La potencialidad de los ensayos bactericidas para identificar bovinos naturalmente resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos y la alta asociación del polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1* bovino al control intracelular de *B. abortus*, hacen pensar en una probable asociación entre este polimorfismo del *Nramp1* bovino y las diferencias del control de la infección intracelular por *M. bovis* entre macrófagos provenientes de animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

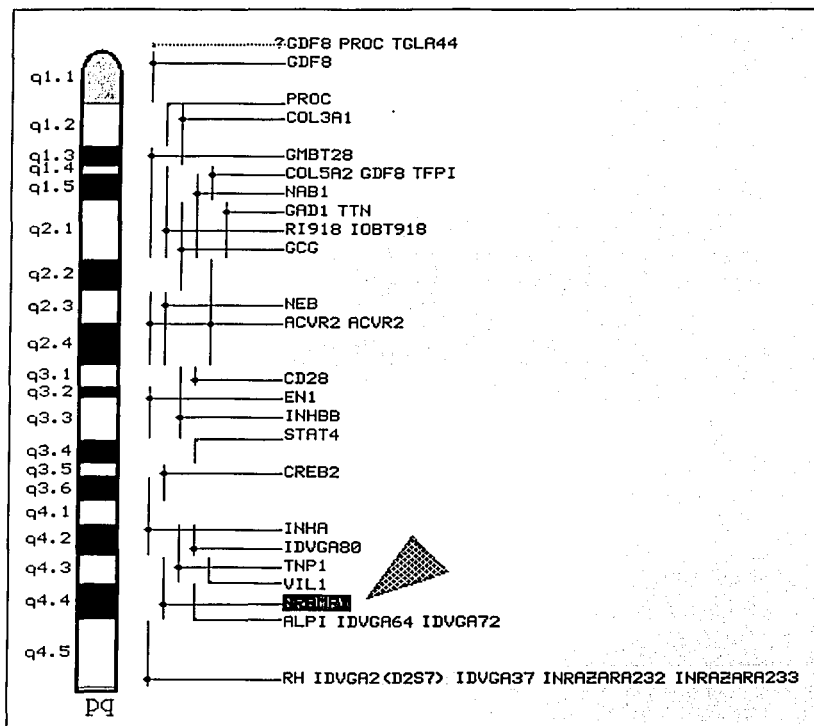


Figura 3: Cromosoma bovino numero dos. Localización del *Nrampl* bovino en la posición 2q43-q44 (Punta de flecha).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

3.0 JUSTIFICACION:

Hace más de un siglo que se demostró la naturaleza del agente causal de la tuberculosis humana y poco menos tiempo él de la tuberculosis bovina; sin embargo, hasta el momento dichas enfermedades no han sido controladas en su totalidad. Se estima que en América-Latina se registran anualmente 7000 casos de tuberculosis por *M. bovis*, alrededor de un 2 % de tuberculosis pulmonar y un 8 % extrapulmonar son debidas a la infección por este microorganismo. En México la población lactante corre un gran riesgo de infectarse, ya que casi más de la mitad de los 9,500.7 millones de litros de leche producidos en el año 2001 no fueron pasteurizados; por lo que es imperativo la aplicación de medidas de control de la tuberculosis bovina.⁶¹⁻⁶⁶

El control de la tuberculosis bovina como en muchas otras enfermedades de los animales domésticos se basa en la reducción de la diseminación del agente etiológico mediante la aplicación medidas como la cuarentena y sacrificio de los animales identificados como enfermos o infectados. La inmunización de la población susceptible, uso de antibióticos, quimioterapéuticos y pesticidas son formas de control que implican fuertes inversiones económicas y de tiempo. El daño ecológico generado por el uso de pesticidas; la aparición de cepas bacterianas cada vez más resistentes a quimioterapéuticos y antibióticos, generadas por la presión de selección inducida por estos da pauta a la búsqueda de nuevas formas de enfrentar a las enfermedades infecciosas.

La capacidad de controlar con eficiencia una infección es un aspecto poco considerado en la selección de las especies domésticas, ya que la imperante necesidad de proveer mayor volumen de alimento a la población humana ha centrado la atención sobre cualidades productivas, sin tomar en consideración la resistencia natural a ciertas enfermedades que poseen algunos individuos. Por lo anterior se hace necesaria la generación de un mayor conocimiento sobre los mecanismos de resistencia natural a ciertos patógenos de importancia en salud veterinaria y humana como el *M. bovis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Años atrás se demostró la participación de gen *Nrampl* en el control de microorganismos intracelulares no relacionados. En el caso particular del bovino el control intracelular de *B. abortus* tiene relación con dicho gen, sin embargo, esta asociación no ha sido demostrada para otros microorganismos intracelulares como *M. bovis*. De existir tal asociación, se abre la posibilidad de adicionar una nueva forma de control a las ya existentes para la tuberculosis bovina. El presente trabajo pretende contribuir al mejor entendimiento de los mecanismos que generan resistencia natural a enfermedades infecciosas por parásitos intracelulares bacterianos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.0 HIPÓTESIS:

Los macrófagos derivados de monocitos de bovinos identificados como resistentes a parásitos intracelulares bacterianos permitirán un nivel de crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* inferior al de macrófagos susceptibles.

El control diferencial del crecimiento *Mycobacterium bovis* mostrado por macrófagos bovinos resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos tiene asociación con el polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.0 OBJETIVOS:

GENERAL:

Evaluar la asociación entre el comportamiento bactericida contra *Mycobacterium bovis* patógeno de los macrófagos de bovinos resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos al polimorfismo del la 3'UTR del *Nramp1*.

ESPECÍFICOS:

Identificar bovinos resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos mediante el ensayo bactericida.

Medir el nivel de crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* patógeno en macrófagos de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.

Verificar diferencia estadística del nivel de crecimiento de *Mycobacterium bovis* patógeno en macrófagos bovinos resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.

Mostrar la relación del polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1* a un control intracelular diferencial de *Mycobacterium bovis* patógeno por macrófagos de bovinos resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS:

El presente trabajo se realizó con bovinos (*Bos taurus*) sanos, provenientes de un hato libre de tuberculosis y brucelosis bovina. Los animales pertenecen al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

6.1 TAMAÑO DE MUESTRA:

Se estimó el tamaño de muestra adecuado al experimento y que representara a la población de la cual se extrajo mediante la siguiente fórmula:⁶⁷

$$* n = 3.84 p (1 - p) / T^2 \text{ donde:}$$

p = frecuencia del fenómeno estudiado (Resistencia a parásitos intracelulares bacterianos) en la población, cuando se desconoce este valor, el tamaño de muestra más conservador es el mayor, el cual se obtiene asignándole el valor de 50 %. Dado que la proporción de animales fenotípicamente resistentes en este hato era desconocida, se optó por asignar un valor a p de 50 %.

T = grado de precisión de la estimación (20 %: P+/- 10 %).

3.84 = valor de Z² para $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza de 95 %).

Sustituyendo: $n = 3.84 (0.5) (0.5) / (0.2)^2$

Por lo tanto: n = 24 animales.

De cada uno de los 24 animales fueron tomadas las muestras hemáticas conforme a la disponibilidad de los mismos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2 IDENTIFICACION DEL FENOTIPO DE LOS ANIMALES Y EVALUACION DEL CRECIMIENTO INTRACELULAR DE *M. bovis* PATOGENO:

6.2.1 CEPAS BACTERIANAS:

Los ensayos bactericidas se realizaron con las siguientes cepas:

Mycobacterium bovis BCG

Mycobacterium bovis BCG subcepa Danesa, amablemente donada por la Dra. Iris Estrada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Se utilizó para identificar a los animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.

Mycobacterium bovis 9926

Esta cepa llegó para tipificación al laboratorio de Diagnóstico bacteriológico del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM en Enero de 1999, procedente de Acatic, Jalisco. Fue aislada de un bovino hembra, criollo, de 8 años de edad; sacrificado en Septiembre de 1998, el cual presentó lesiones tuberculosas. Fue empleada para evaluar el crecimiento intracelular de una cepa patógena e interpretarlo como un fenómeno condicionado por la actividad microbicida de los macrófagos.

De cada una de las dos cepas de *M. bovis* se hizo una cinética de crecimiento bacteriano. Para establecer el día en el cual se alcanzaría la fase logarítmica intermedia. Las cepas se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H11 (Bacto[®] Mycobacteria 7H11 agar, Difco Laboratorios, Detroit MI USA) con enriquecimiento OADC (BBL^{MT} Middlebrook OADC Enrichment, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA), cuando las colonias fueron visibles se tomaron 5 de ellas y sembraron en 30 mL de medio Middlebrook 7H9 (BBL[®] Middlebrook 7H9 Broth base, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD USA) con enriquecimiento OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA), se incubaron por 8 días a 37 °C con agitación constante de 100 revoluciones por minuto (r.p.m.). El cultivo obtenido se transfirió a 270

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ml. de medio Middlebrook 7H9 con enriquecimiento OADC y 0.5 g/L de Tween 80, se incubo en las condiciones antes descritas. A partir de este momento se considera el tiempo inicial, cada 24 h se determino la absorbancia a 650 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb) por un período de 3 semanas. Se graficaron las lecturas de la absorbancia obtenidas.

6.2.1.1 PREPARACIÓN DE INÓCULOS:

Una vez alcanzada la fase logarítmica intermedia, los cultivos de las diferentes cepas fueron cosechados. El cultivo bacteriano fue centrifugado a 2500 x g por 15 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado y la pastilla fue resuspendida en 15 mL de CRPMI 10 % SFB (L-Glutamina 2 mM, MEM aminoácidos no esenciales 0.1 mM, Piruvato de sodio 1 mM, Bicarbonato de sodio 20 mM, Suero Fetal Bovino 10 % (Gibco™ Invitrogen Corporation Grand Island N.Y. USA)) y se centrifugo en las condiciones antes descritas por 10 min. Este procedimiento fue repetido dos veces más. Del ultimo lavado se retiró el sobrenadante y resuspendió en CRPMI 12 % SFB. Para dispersar los agregados de bacterias, se paso dos veces la suspensión de bacterias a través de una jeringa con una aguja 27G x 13 mm. La suspensión obtenida se transfirió en cantidades de 1 mL a tubos con capacidad de 1.5 mL (Eppendorf, Brinkman Instruments, Inc. Westbury NY USA), se guardaron por 12 h a -20 °C y posteriormente el lote de inóculos se almaceno a -80 °C hasta su uso en un ultracongelador (Ultra Freezers, Nuaire, Plymouth, Minnesota USA).

6.2.1.2 DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS COLONIAS (UFC) DEL INÓCULO:

Para determinar la cantidad de bacterias contenidas en 1 mL de suspensión bacteriana congelada, se retiró un tubo del congelador y se incubó por 60 min a 37 °C en baño María. Posterior a esto, se colocaron 500 µL de la suspensión de bacterias en un tubo (Elkay Products, Inc. Boston Turnpike

Shrewsbury, MA USA) con 4500 μL de PBS (NaCl 1.5 mM, NaH_2PO_4 9.1 mM, Na_2HPO_4 1.25 mM, pH 7.4 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)), se mezcló perfectamente y se tomaron de este tubo 50 μL que se agregaron a otro tubo con 450 μL de PBS. Se siguió esta serie de diluciones por 8 tubos. De cada una de las diluciones obtenidas se sembraron 100 μL , por duplicado, en placas de agar Middlebrook 7H1 con enriquecimiento OADC. Las placas inoculadas se incubaron por un periodo de 2 a 3 semanas hasta hacerse visible el crecimiento, se contó el número de colonias y multiplicó por el factor de multiplicación correspondiente a la dilución. De esta forma se obtuvo la concentración del inóculo. De acuerdo a la cantidad de bacterias, se calculó el factor de dilución para alcanzar una concentración de 2×10^7 bacterias/mL, de la cual tomamos 5 μL para infectar a 1×10^4 macrófagos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.2 OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA:

La muestra hemática se obtuvo en la forma más aséptica posible, de la vena yugular de cada uno de los 24 animales que conformaron la muestra. Para impedir la coagulación de la sangre, esta se mezcló con la solución ácido cítrico-dextrosa (ACD) ($C_6H_7Na_3 \cdot 2H_2O$ 75.5 mM, $C_6H_8O_7$ 41.6 mM, $C_6H_{12}O_6$ 135 mM, pH 5.0 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)), previamente colocada en una jeringa (Terumo Medical Corporation, Elkton, MD USA), en una proporción de 4 mL de ACD por 30 mL de sangre. En el laboratorio, se mezclaron 15 mL de la muestra de sangre con 15 mL de solución salina de fosfatos-citrato (PBS-Citrato) (NaCl 1.5 mM, NaH_2PO_4 9.1 mM, Na_2HPO_4 1.25 mM, $C_6H_7Na_3 \cdot 2H_2O$ 12.5 mM, pH 7.4 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)). En 2 tubos de 50 mL (Nalgene Nunc Internacional Corp, Naperville, IL USA) se colocaron 15 mL de la suspensión de trabajo de Percoll (Percoll® Amersham Biosciences AB Uppsala Sweden) (Ver anexo 1), a estos se les adicionaron los 30 mL de la sangre-PBS-Citrato, con cuidado de no mezclar ambas sustancias, para mantener dos fases; la suspensión de Percoll de trabajo en la parte inferior del tubo y sobre esta la sangre mezclada con el PBS-Citrato. Los tubos así preparados se centrifugaron a 1000 x g por 20 min a temperatura ambiente. Al finalizar la centrifugación, se forman 3 fases: en la parte inferior del tubo el agregado de eritrocitos y suspensión de Percoll de trabajo, la fase intermedia leucocitos más plasma, y la fase superior plasma. De los tubos, se colectó el plasma y se colocó en un tubo nuevo, el plasma se utilizó para realizar lavados a las células blancas obtenidas. Se transfirió la interfase donde estaban suspendidas las células blancas a un tubo de 50 mL, se le agregó PBS-Citrato hasta completar 50 mL. Este tubo se centrifugó a 300 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 10 mL de plasma autólogo con una pipeta de transferencia y se adicionó hasta alcanzar 50 mL PBS-Citrato. Se volvió a centrifugar a 300 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se repitió en la misma forma una vez más el lavado de las células.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La pastilla formada del último lavado se resuspendió en 8 mL de CRPMI con 10 % de suero autólogo, esta suspensión se transfirió a un matraz de Teflón con capacidad de 50 mL, el cual se le agregó 12 mL de CRPMI sin suero, a sí el porcentaje de suero se redujo a 4 %, lo que facilitó la adherencia de los monocitos a la superficie del matraz. Los matraces con la suspensión de células se incubaron por 24 h a 37 °C con humedad y 5 % de CO₂, al concluir la incubación, se realizó un lavado suave de la superficie del matraz con una pipeta de transferencia y se retiró del medio de cultivo, esto para desechar las células no adheridas. Se agregaron de 12 a 15 mL de CRPMI 10 % de suero autólogo, se monitorearon los matraces diariamente, si el medio tornara a color amarillento se procedía a retirar la mayor parte del medio de cultivo y agregar medio de cultivo fresco. Una vez transcurrido un período 14 días, en el cual han madurado a macrófagos, se hizo la cosecha de las células.^{68, 69} Para ello los matraces se colocaron en un recipiente al que se le agregó hielo hasta cubrir 2 terceras partes de los matraces, en esta condición se dejaron por un periodo de 35 min. Luego de esto, los matraces se golpearon para desprender las células. El contenido del matraz se transfirió a un tubo de 15 mL, se realizó el conteo de las células en un hemocitometro (Neubauer, Bocco, Western Germany), en forma simultanea se centrifugo el tubo a 300 x g por 10 min a temperatura ambiente. Al terminar la centrifugación, se retiro el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en una cantidad de CRPMI 10 % de suero autólogo tal que la concentración de células por 1 mL fuera de 1×10^6 células. De esta suspensión con 1×10^6 células por mL se colocaron 10 μ L en 3 pozos de cada una de 4 placas de Terasaki (HLA plates) (NuncTM, NuncTM Brand Products, Denmark), además en cada una de las esquinas de las placas se agregó una gota de agua destilada estéril para evitar la desecación de los pozos con las células. Se incubaron estas placas por 12 h a 37 °C con humedad y 5 % de CO₂.

6.2.3 DESARROLLO DEL ENSAYO BACTERICIDA:

En las dos placas de Terasaki donde fueron colocados por triplicado 10 μL de una suspensión de macrófagos con una concentración de 1×10^6 células/mL, (1×10^4 células/pozo). Las se incubaron por 12 h a 37 °C, con humedad y 5 % de CO_2 ; después de este tiempo el medio de cultivo se retiró de cada uno de los pozos y fue sustituido por 5 μL de medio de cultivo celular con una concentración de bacterias de 2×10^7 bacterias/mL. Se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1, como control para cada uno de los tiempos se colocaron en un pozo sin células de cada una de las placas la misma cantidad de bacterias más 5 μL de medio de cultivo celular. Este procedimiento se aplicó en forma similar para las dos cepas utilizadas; *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926. Las placas se incubaron por 4 h en las condiciones antes mencionadas y antes de introducirlas a la incubadora se revisó si las gotas de agua colocadas en las esquinas no se habían secado; de ser así, se volvió a colocar más agua. Mientras tanto, se verificó la concentración del inoculo utilizado. Se agregaron 5 μL de la suspensión de bacterias a 195 μL de PBS, a partir de este tubo se realizó una serie de 3 diluciones 1:10. 100 μL de cada una de las diluciones se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC este volumen se dispersó por toda la superficie de la placa y se incubó por 2 a 3 semanas a 37 °C. Una vez transcurridas las cuatro horas de incubación (Tiempo 0), a cada uno de los pozos con bacterias y células de ambas placas de cada una de las cepas de *M. bovis* se les retiró el medio con bacterias, excepto en donde no había células. Los pozos se lavaron 5 veces con 10 μL de medio de cultivo celular fresco. A los pozos de una de las cajas se le agregó de nuevo 10 μL de medio de cultivo celular. Esta caja se volvió a colocar en la incubadora por un período de 24 h, esta fue la caja de nuestro tiempo 1 (T1). Antes introducirla se observó si aun había agua en sus esquinas. En los pozos de la caja (T0), a los que no se les había colocado nada, se adicionó 10 μL de la solución de lisis (Tween 20 al 0.5 % (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)) y se dejó actuar por 10 min a temperatura ambiente. Mientras transcurrían los 10 min, del

pozo donde solo había bacterias, estas se tomaron y adicionaron en un tubo en el que previamente se colocó 170 μL de PBS, se hicieron dos lavados con 10 μL de medio de cultivo celular, los cuales también fueron colocados en el mismo tubo. A partir de este tubo se realizaron 3 diluciones decuples. De cada una de las diluciones se tomaron 100 μL , los cuales fueron sembrados en placas de agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC. Transcurrido los 10 min, de cada uno de los tres pozos se tomaron los 10 μL del lisado y se transfirieron a tres tubos respectivamente, cada tubo se le había colocado 170 μL de PBS, de la misma forma que en el control, se hicieron dos lavados con 10 μL de medio de cultivo celular. Con el procedimiento antes descrito se realizó una serie de 2 diluciones decuples de cada pozo y se sembró un volumen igual de cada una de las diluciones de los tres pozos en placas agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC, las cuales se incubaron por el mismo periodo de tiempo. Transcurridas las 24 h de incubación, de los pozos con células más bacterias, se tomó el medio y adicionó a tres tubos respectivamente, en los cuales se había colocado un volumen de 160 μL de PBS. Las células de estos pozos fueron lisadas con 10 μL de la solución de lisis por un periodo de 10 min. Mientras tanto se realizaron en la forma antes descrita la recuperación, dilución y siembra de las bacterias del pozo control de cada una de las dos cepas. Pasados los 10 min del periodo de lisis de las células, se recuperó el lisado de cada uno de los pozos y adicionó a cada uno de los tres tubos respectivos en los que se había colocado con anterioridad el medio de cultivo celular. Se hicieron los dos lavados y la serie de 2 diluciones decuples correspondientes a cada uno de los tres pozos. Se sembraron 100 μL de cada una de las diluciones de las tres series y se incubaron. Transcurridos 21 días de incubación de las placas inoculadas se realizó el conteo de las UFC's de cada una de las cepas. Los datos obtenidos fueron capturados en una hoja de cálculo diseñada para el análisis del porcentaje de crecimiento intracelular para cada una de las cepas a las 24 h postinfección (PI) (Ver anexo 3).

6.2.3.1 CLASIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ANIMALES CON *M. bovis* BCG Y EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO INTRACELULAR DE *M. bovis* PATÓGENO:

De acuerdo a los resultados de Qureshi, *et. al* (1995) para realizar la clasificación de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos; los macrófagos que permitan el crecimiento de *M. bovis* BCG en un porcentaje superior a 65 % se consideran susceptibles y los que logren reducir el crecimiento bacteriano a 65 % o menos se designan como resistentes.⁶⁰

En el caso particular de la cepa patógena de *M. bovis* patógeno, en primera instancia se midió el porcentaje de crecimiento intracelular y posteriormente verificó la existencia de diferencia estadística en el nivel de crecimiento intracelular de la bacteria entre macrófagos de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares con la prueba estadística de Mann-Whitney. Esta prueba es utilizada para detectar diferencias estadísticas entre dos poblaciones del mismo tamaño o diferentes, en las que el fenómeno a describir tenga como variable explicativa, una variable categórica de dos niveles (Resistentes o Susceptibles) y una variable de respuesta de tipo numérica (Porcentaje de crecimiento intracelular de la bacteria). Otro punto a mencionar es que este tipo de pruebas estadísticas no paramétricas son recomendadas en el caso que se desconoce si la media del fenómeno medido se distribuye normalmente.⁷⁰

6.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE CONFORMACION MONOCATENARIA DE LA 3'UTR del *Nramp1*:

De acuerdo a lo descrito por Feng, el polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1* bovino asociado a una mayor capacidad bactericida contra *B. abortus* de los macrófagos de bovinos resistentes a parásitos intracelulares consiste en un microsatélite (GT)_n con una longitud de GT₁₅, en contraparte este microsatélite tiene una longitud de GT₁₄, GT₁₅ y GT₁₆ en los animales susceptibles a parásitos intracelulares. Estos polimorfismos son identificados de forma rápida por análisis de conformación monocatenario del producto amplificado por reacción en cadena de la polimerasa de la 3'UTR.⁵⁷

6.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE SANGRE:

Se colectó 5 mL de sangre de cada uno de lo animales evaluados con el ensayo bactericida, en tubos (Venoject, Terumo Europe N.V. Interleuvenlaan Leuven, Belgium) con anticoagulante EDTA (Ácido Etilendíamino tetraacético). Se conservaron a 4 °C por 2 a 3 días. Cada muestra de sangre se colocó en un tubo de 15 mL (Nalgene Nunc Internacional Corp, Naperville, IL USA), al cual se agregó 7.5 mL de agua destilada estéril y mezcló. Se centrifugó por 10 min a 2000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante fue decantado; se repitió dos veces más el lavado con agua destilada estéril. En el último lavado, después de decantar el sobrenadante, se agregó 2 mL de solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.5 % SDS (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)), se mezcló con vortex por un min. Se adicionó Ribonucleasa A (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA) en una concentración final de 20 µg/mL e incubó en baño María por 60 min a 37 °C. Se agregó Proteínasa K (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA) a una concentración final de 50 µg/mL, se incubó en baño María por 120 min a 50 °C, más 60 min a 65 °C. Concluido esto se colocó en tubos de 1.5 mL de capacidad (Eppendorf, Brinkman Instruments, Inc. Westbury NY USA) 500 µl de la suspensión de células lisadas. Una vez colocada la suspensión en los tubos de 1.5 mL se agregó 200 µL de NaCl 5 M (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA), fue mezclado en vortex por 15 a 30 seg y centrifugado a 12,000 x g por 15 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante cuidadosamente, aproximadamente 700 µL y fue colocado en un tubo nuevo de 1.5 mL de capacidad. A este último se agregó un volumen (700 µL) de Isopropanol frío (-20 °C) (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA) y centrifugó por 20 min a 12,000 x g a 4 °C. Se retiró el Isopropanol cuidadosamente, se agregó Etanol al 70 % frío (-20 °C) (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA) y una vez más se volvió a centrifugar por 10 min a 12,000 x g a 4 °C de temperatura. Se descartó el Etanol al 70 %, se secó la pastilla y fue

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

resuspendida en 200 μ L de H₂O destilada estéril. Se cuantificó por espectrofotometría cada una de las muestras y fueron almacenadas en congelación (-20 °C) hasta su uso.

6.3.2 AMPLIFICACIÓN DE LA 3'UTR DEL *Nramp1* BOVINO:

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction) para amplificar un fragmento de aproximadamente 175 pares de bases (bp del inglés Base Pairs), con los siguientes iniciadores: Sentido 5'-AAGGCAGCAAGACAGACAGG-3' y antisentido 5'-ATGGAACTCACGTTGGCTG-3' (Invitrogen™ Life technologies, Carlsbad, CA USA); de la región no codificante 3' del *Nramp1* bovino (Ver anexo 4).⁷¹ La reacción fue realizada en un volumen de 30 μ L (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada uno dGTP, dTTP, dCTP, dATP (Bioselec, Sta. María México D.F. Méx.)), 0.5 μ M de ambos iniciadores, 0.3 Unidades de Taq DNA polimerasa (Bioselec, Sta. María México D.F. Méx.) y 100 ng de DNA genómico de cada animal. La desnaturalización se realizó a 94 °C por 5 min, posteriormente 40 ciclos en los cuales se desnaturalizó a 94 °C por 1 min, seguido por la alineación a 60 °C por 40 seg y una extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final por 7 min a 72 °C. Se visualizó la presencia de cada uno de los productos amplificados con una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con Tris-Borato-EDTA buffer (TBE buffer) (Gibco BRL Life Technologies, Grand island NY USA), teñido con Bromuro de etidio (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA).

6.3.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE CONFORMACION MONOCATENARIA:

La identificación del polimorfismo en la secuencia de las bases que conforman este fragmento del *Nramp1* se realizó por análisis del polimorfismo conformación monocatenaria. Brevemente: la simple modificación de una base en la secuencia de un fragmento de DNA le confiere propiedades migratorias diferentes, ya que el fragmento desnaturalizado al migrar en un medio no

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

desnaturalizante adquiere una estructura secundaria que dependerá de la composición bases de la secuencia, por lo cual hace posible determinar cambios de secuencia en el fragmento.^{72,73} A 10 µL del producto de PCR se le agrego 15 µL del buffer de carga (95 % Formamida, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.5 % Xilene cianol 0.5 % Azul de bromofenol (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA y Amresco®, Solon Ind. Pkwy. Solon, Ohio USA) las muestras se desnaturalizaron por 5 min a 94 °C, manteniendo los tubos en hielo hasta cargar el gel.^{74,75} Una vez colocadas las muestras, el gel de 8 X 10 cm (6 % Acrilamida/Bisacrilamida (30:1), no desnaturalizante) se sometió a electroforesis por 2.5 h a 55 Volts a temperatura ambiente. Concluida la electroforesis, se procedió a la tinción del gel con Plata. El gel se lavo dos veces con la solución 1 (Etanol 10 %, Ácido acético 0.5 % (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA y Merck-México, S.A. Naucalapan de Juárez, Edo. de Méx. Méx.)) hasta eliminar los colorantes del buffer de carga. Se tiño con una solución al 0.17 % de Nitrato de plata (solución 2) (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA) a una temperatura de 95 °C durante 80 seg. Se realizó un lavado con agua destilada. Se agrego la solución 3 (Hidróxido de sodio 3 %, Formaldehído 0.1 % (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA y Merck-México, S.A. Naucalapan de Juárez, Edo. de Méx. Méx.)), se retiro esta solución que sirvió para precipitar el exceso de plata, se agrego más de esta solución e incubó hasta hacer visibles las bandas. Se paro la reacción con una solución acuosa de Ácido acético al 5 % (solución 4) (Merck-México, S.A. Naucalapan de Juárez, Edo. de Méx. Méx.).⁷⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.0 RESULTADOS:

7.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO:

La cinética de crecimiento mostró que *M. bovis* BCG alcanzo la fase logarítmica intermedia de crecimiento a los 7-8 días de incubación y *M. bovis* 9926 a los 13-14 días (*Grafica 1*). Se tomó la decisión de preparar los inóculos bacterianos en la fase logarítmica intermedia alcanzada en los periodos de crecimiento ya referidos para cada una de las cepas, con el objeto de tener ambos inóculos en similares condiciones de crecimiento, sin embargo, la cantidad de bacterias estimadas por UFC, obtenidas por mL de cultivo fue menor para *M. bovis* 9926.

7.2 ENSAYOS BACTERICIDAS:

7.2.1 IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES NATURALMENTE RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A PARÁSITOS INTRACELULARES:

El objetivo inicial de este trabajo fue lograr la identificación de animales resistentes o susceptibles a parásitos intracelulares, de acuerdo a lo descrito por Qureshi *et al.*⁶⁰ Para lo cual se utilizó *M. bovis* BCG subcepa Danesa como inóculo de infección de los macrófagos a una MOI 10:1; y evaluación del crecimiento intracelular a las 24 h PI. De los 24 animales evaluados solo los macrófagos de 3 mostraron un comportamiento que los clasifica como resistentes, es decir, permitieron un crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG menor o igual al 65 %, punto de corte para la clasificación fenotípica. El resto, 21 animales se comportaron como susceptibles (*Grafica 2*), lo que representa un 87.4 % de susceptibles y un 12.6 % de animales resistentes a parásitos intracelulares bacterianos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.2.2 CRECIMIENTO INTRACELULAR DE *M. bovis* PATÓGENO EN MACRÓFAGOS DE BOVINOS RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A PARÁSITOS INTRACELULARES:

Una vez clasificados los animales fenotípicamente de acuerdo al comportamiento con *M. bovis* BCG y mensurado el crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 a las 24 h PI. Se realizó el análisis estadístico del crecimiento permitido por los macrófagos de animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y una significancia de 0.05. Los resultados muestran que hubo una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 en macrófagos de animales resistentes y susceptibles ($p < 0.05$). Los macrófagos de los animales resistentes demostraron tener una mayor eficiencia en su actividad bactericida contra *M. bovis* patógeno en comparación con los macrófagos de animales susceptibles (*Grafica 3*). Los mismos 3 animales que fueron capaces de controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG en un porcentaje igual o menor al punto de corte para clasificarlos como resistentes a parásitos intracelulares bacterianos mantuvieron esta misma capacidad contra *M. bovis* 9926. Estos resultados sugieren que la actividad de los macrófagos contra *M. bovis* BCG se conserva aun contra *M. bovis* patógeno, pero no al mismo nivel. La cepa patógena de *M. bovis* 9926 fue capaz de sobrevivir en un porcentaje mayor en los macrófagos de animales resistentes y susceptibles ($p < 0.05$) como resultado de la participación de la virulencia de la bacteria (*Grafica 4*). La observación microscópica de los macrófagos infectados con *M. bovis* 9926 (*Figura 4B*) mostró una mayor retracción o redondeamiento de las células (4 h PI) y en algunos casos extremos el desprendimiento de células a las 24 h PI, esto en contraste con los macrófagos infectados con *M. bovis* BCG en donde no se observó (*Figura 4A*).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL FRAGMENTO DE LA 3'UTR DEL *Nramp1* Y ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE CONFORMACION MONOCATENARIA:

Se amplificó un fragmento de 175 bp de la 3'UTR del *Nramp1* bovino de los 24 animales evaluados, así como de dos muestras de DNA previamente caracterizadas, amablemente proporcionadas por el Dr. Garry Adams de Texas A & M University, con las condiciones antes descritas para la PCR (*Figura 5*). Es importante señalar que el producto amplificado de uno de los 24 animales (*Figura 5, Carril B*), se observa una banda de mayor intensidad, aun a pesar de utilizar la misma cantidad de DNA genómico como molde. Se realizó el SSCP de cada uno de los productos amplificados por PCR de acuerdo a las condiciones antes descritas para la electroforesis y tinción del gel. Solo en uno de los 24 productos de PCR correspondientes a los animales evaluados se encontró un patrón de migración diferente a los 23 restantes (*Figura 6*). Al compararlos con un par de productos amplificados por PCR de muestras de DNA previamente genotipificadas y asociados a resistencia o susceptibilidad a *B. abortus*, se encontró que 23 de los fragmentos correspondían al alelo resistente (GT₁₃) y solo 1 al susceptible (GT_{14, 15 y 16}). Este último es el mismo producto que se observó con mayor intensidad en la electroforesis en gel de agarosa.

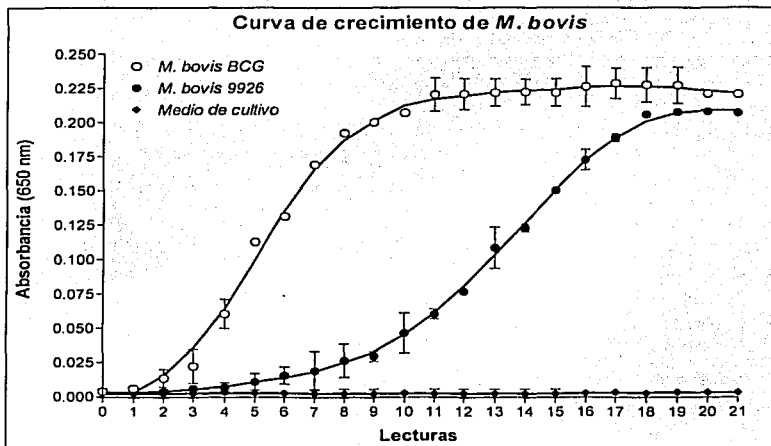
7.4 ASOCIACION DEL POLIMORFISMO DE LA 3'UTR DEL *Nramp1* CON LA ACTIVIDAD CONTRA *M. bovis* PATOGENO DE LOS MACROFAGOS IDENTIFICADOS COMO RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A PARASITOS INTRACELULARES :

Al evaluar la posible asociación del polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1* a la actividad contra *M. bovis* patógeno de los macrófagos mediante una prueba de independencia, se encontró que no hay evidencia estadística para establecer que un comportamiento no permisivo del crecimiento intracelular de *M. bovis* patógeno en los macrófagos de bovinos resistentes a parásitos intracelulares

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

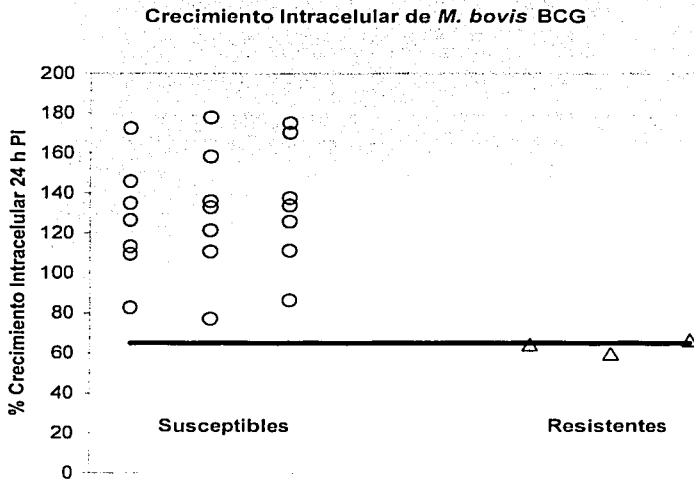
bacterianos sea dependiente o este asociado a la longitud GT_{13} del microsatélite, asociado al fenotipo resistente a *B. abortus* ($p < 0.05$) (Cuadro 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



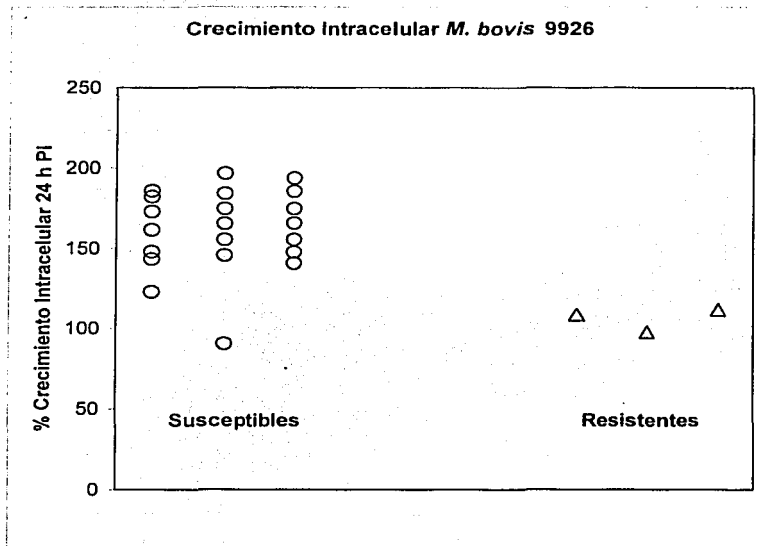
Gráfica 1: Cinética de crecimiento de *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926. Ambas cepas fueron crecidas en medio Middlebrook 7H19 (BBL® Middlebrook 7H19 Broth base, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD USA) con enriquecimiento OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA), incubadas a 37 °C con agitación (100 r.p.m.). Se determinó la absorbancia (650 nm) cada 24 h durante 21 días. Se graficaron los resultados de dos repeticiones, la línea de tendencia para cada una de las cepas y el control (Medio de cultivo).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 2: Porcentaje de crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG en macrófagos bovinos a las 24 h PI. De acuerdo al punto de corte (Línea) de 65 %, solo tres animales muestran un fenotipo resistente (Triángulos) el resto un fenotipo susceptible (Círculos).

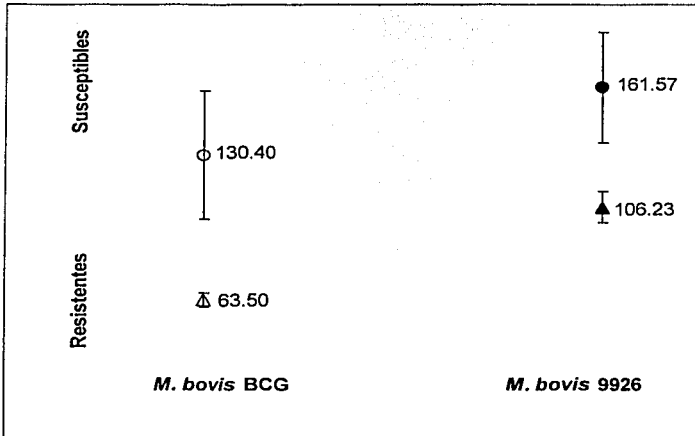
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 3: Evaluación del crecimiento intracelular diferencial de *M. bovis* 9926 en macrófagos de bovinos resistentes (Triángulos) y susceptibles (Círculos) a parásitos intracelulares bacterianos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 entre macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles ($p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Crecimiento Intracelular *M. bovis*



Gráfica 4: Comparación del crecimiento intracelular diferencial de *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 en macrófagos de bovinos a las 24 h PI. Se encontró diferencia estadística del crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 tanto en macrófagos de bovinos resistentes como susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos ($p < 0.05$) con respecto al mostrado por *M. bovis* BCG.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A



B

Figura 4: Macrófagos bovinos infectados con *M. bovis* (A *M. bovis* BCG y B *M. bovis* 9926), posterior al lavado para retirar a las bacterias extracelulares. Se observa diferente morfología inducida por la infección, un mayor número de células redondeadas al ser infectadas con *M. bovis* 9926 (Puntas de flecha en B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

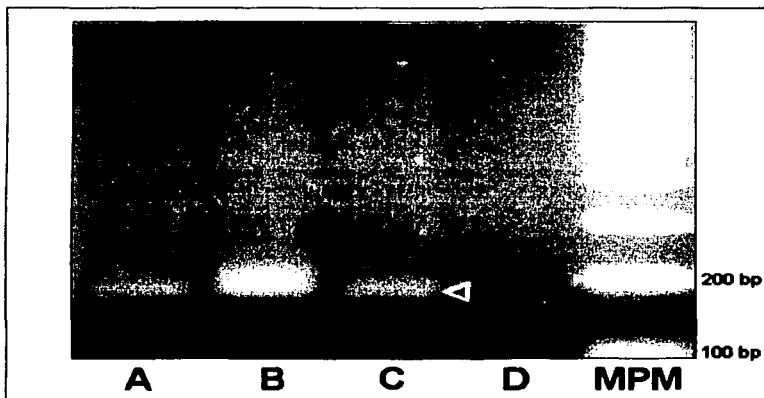


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % de los productos amplificados por PCR de la 3'UTR del *Nramp1* de tres animales (Carril A, B y C), control negativo de la reacción (Carril D) y marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (MPM) (Gibco BRL®, Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD USA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1: Distribución del comportamiento de los macrófagos resistentes y susceptibles contra *M. bovis* patógeno en relación con los polimorfismos de la 3'UTR del *Nramp1* identificados por SSCP.

MACROFAGOS	POLIMORFISMOS		
	GT ₁₃	GT _{13, 14, 15}	
NO PERMISIVOS	3	0	3
PERMISIVOS	20	1	21
	23	1	24

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.0 DISCUSION:

La metodología del ensayo bactericida permitió identificar en forma fenotípica la resistencia o susceptibilidad a parásitos intracelulares bacterianos. Sin embargo, este ensayo esta sujeto a la influencia de una serie de variables que afectan los resultados. Por un lado se observo que el inoculo bacteriano almacenado en la forma descrita perdió viabilidad, por lo que la cantidad de bacterias contabilizadas en los controles del inoculo de cada ensayo se reducen paulatinamente. Esto generó diferencias en las MOI entre ensayos; sin embargo este problema se corrigió mediante la cuantificación continua cada 6 a 8 semanas del inoculo bacteriano. Durante el ensayo el procedimiento más crítico fueron los lavados para retirar las bacterias no fagocitadas. La posibilidad de dejar bacterias viables adheridas a las células es mayor cuando se realizan solo lavados, que cuando se trata a las bacterias extracelulares con un antibiótico al que son susceptibles, sin embargo, el largo tiempo de incubación requerido con el antibiótico y su posible ingreso a la célula hacen poco factible su uso en este ensayo.⁷⁷⁻⁷⁹ Dada esta condición de no discriminar a las bacterias adheridas de las fagocitadas, las primeras fueron consideradas como bacterias intracelulares en este ensayo. Otro punto a considerar fue la necesidad de una estandarización suficiente de la repetibilidad entre e intraensayos. Una amplia ventaja de este ensayo, al compararlo con otros modelos de evaluación de resistencia en donde se desafía al animal con cepas virulentas de microorganismos, es que en este solo utiliza una fracción del individuo lo que hace más practica la evaluación y de menor riesgo al poder ser manejada en áreas exclusivas para el manejo de agentes infecciosos; sin embargo, el costo y el tiempo son factores que hacen poco práctico la aplicación del ensayo a poblaciones amplias de bovinos. Se hace necesario contar con una metodología más rápida y en lo posible más económica para la identificación fenotípica del ganado. Una alternativa es generar bacterias con genes reporteros como el de la proteína verde fluorescente (GFP del ingles Green Fluorecent Protein) que permitan contabilizar en forma mas rápida a través de microscopia

de fluorescencia o citometría de flujo la cantidad de bacterias fagocitadas, a sí como el número de las mismas que permitan los macrófagos su crecimiento a las 24 h PI.⁶⁰ Una ventaja adicional es la menor manipulación de bacterias vivas, puesto que en ambas metodologías se puede utilizar células y bacterias ya fijadas, implicando un nulo riesgo de infección durante la lectura del ensayo. Uno de los posibles inconvenientes es el requerimiento de una mayor cantidad de células para este ensayo; esto se puede solucionar con la previa centrifugación de la sangre colectada con la solución ACD y recuperación de la capa flogística para ser sometida a la centrifugación isopícnica. De esta forma, es mayor la cantidad de células obtenidas con un menor uso de material y soluciones. Por otro lado, la cantidad de ensayos será mayor por el lapso de tiempo en comparación al utilizar el plaqueo como metodología para contabilizar las bacterias. Esto conlleva poder aplicar este ensayo a poblaciones más grandes de bovinos con el fin de identificar en manera fenotípica la resistencia a parásitos intracelulares bacterianos.

El ensayo bactericida con *M. bovis* BCG subcepa Danesa logro identificar en la muestra de 24 animales tomados de acuerdo a la disponibilidad de los mismos para su uso en el experimento, resistencia a parásitos intracelulares bacterianos. De los 24 animales evaluados, solo en 3 de ellos se encontró un comportamiento de sus macrófagos que los clasifiqué como resistentes a parásitos intracelulares (*Grafica 2*). Estadísticamente el tamaño de la muestra es representativa del hato de donde se extrajo, sin embargo, los animales no fueron tomados al azar lo cual pudo inducir cierto grado de tendencia de los resultados, en los que se muestra que los resistentes representan el 12.6 % de esta población; en contraste con lo referido para una población que no ha sido sometida a selección intencionada para la resistencia a intracelulares en donde es posible encontrar un 20 % de animales resistentes.⁵⁷

La subcepa de *M. bovis* BCG utilizada en este trabajo es una variable que puede explicar la no coincidencia de lo obtenido con lo previamente reportado por Qureshi *et. al.*⁶⁰ *M. bovis* BCG en sus

diferentes subcepas es capaz de mostrar comportamiento variable que tienen como origen la pérdida en algunas de ellas de regiones de DNA genómico.⁸¹⁻⁸³

Otro factor que puede hacer variar la proporción resistentes-susceptibles es la presencia o ausencia de la enfermedad en el hato, factor que no ha sido evaluado y que puede explicar una proporción menor de resistentes en un hato libre de tuberculosis y brucelosis bovina. Ya que, la presencia del agente patógeno en una población induce una presión de selección que genera la permanencia de los individuos mejor capacitados para resistir la infección.²¹

Los porcentajes de crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926 a las 24 h PI en los animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares fueron diferentes en forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Los macrófagos obtenidos de animales considerados como resistentes permitieron la sobrevivencia y crecimiento intracelular de *M. bovis* patógeno en un porcentaje menor que los susceptibles. La actividad bactericida de los macrófagos de los animales resistentes se conserva aun contra la bacteria patógena (*Grafica 3*). Sin embargo, al comparar los porcentajes de crecimiento intracelular de *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 se denota que la cepa patógena tiene mayor capacidad de sobrevivir a los mecanismos bactericidas de los macrófagos, capacidad previamente observada por Aldwel *et. al* en macrófagos derivados de pulmón (*Grafica 4*). Aunado a esto en la observación microscópica de las células infectadas se encontró mayor número de macrófagos con morfología redondeada, indicativo de un mayor daño celular al ser infectadas con *M. bovis* 9926 (*Figura 4*).^{6, 84} Estos resultados abren la posibilidad de utilizar el ensayo bactericida con esta cepa patógena para identificar la resistencia a *M. bovis*. No sin antes establecer un punto de corte mayor al establecido para la cepa de *M. bovis* BCG, que permita clasificar resistencia o susceptibilidad a *M. bovis* patógeno, ya que estos resultados concuerdan con lo ya previamente observado; en donde se muestra que existe diferencia en el crecimiento intracelular de *M. bovis* patógeno en macrófagos de animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos.⁸⁵ De sumo interés será establecer si la condición de resistencia a *M. bovis* patógeno es

un fenómeno que se conserva ante diversos aislados de *M. bovis* patógeno, de ser así, se estará en condiciones para sugerir la selección de animales con mayor capacidad para resistir la infección por *M. bovis*.

Por otro lado, de cada uno de los 24 animales en los que se evaluó el crecimiento intracelular de *M. bovis* 9926, se amplificó por PCR un fragmento de 175 bp de la 3'UTR del *Nramp1*. La electroforesis en gel de agarosa de cada uno de los productos de PCR mostró que correspondían en peso al tamaño esperado.⁷¹ De los 24 fragmentos amplificados se logró identificar un solo producto con un patrón de migración diferente a los 23 restantes en el SSCP. Al comparar los patrones de migración con el de dos productos amplificados con DNA previamente genotificado, se observó que los productos de 23 animales correspondían al alelo resistente asociado a resistencia a *B. abortus* y el único animal con patrón de migración diferente posee un alelo resistente y otro susceptible, es decir, es un heterocigoto (*Figura 6*). El producto amplificado con DNA de este último animal fue el que a la electroforesis en gel de agarosa se observó con mayor intensidad (*Figura 5*). Y los resultados de la secuenciación de este producto junto con otro tres más corroboró lo observado en el SSCP, donde las secuencias de estos tres últimos productos tienen 13 repeticiones del microsatélite GT, no así el heterocigoto, el cual tiene un alelo con 14 repeticiones (*Anexo 5*). El análisis del polimorfismo de conformación monocatenaria con las modificaciones implementadas en este trabajo resultó de utilidad para la identificación del polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1*, lo cual concuerda con lo sugerido para utilizar esta técnica en la identificación de cambios de secuencias en fragmentos de DNA de la misma longitud.⁷²

No se pudo demostrar en forma estadística una asociación del comportamiento de los macrófagos de bovinos resistentes a parásitos intracelulares al polimorfismo GT₁₃, alelo del *Nramp1* asociado previamente a la resistencia natural contra *B. abortus* ($p < 0.05$). Un resultado similar fue descrito por Barthel *et. al* al intentar encontrar una relación de este mismo marcador genético a la ocurrencia y distribución de las lesiones originadas por la infección de *M. bovis*.⁷¹ Ambos resultados hacen

entrever el poco o reducido efecto del *Nramp1* durante la infección por microorganismos miembros del complejo tuberculosis, o la nula asociación en específico de esta área del *Nramp1* bovino al efecto sobre el fenotipo en esta población de animales, como lo ya previamente discutido por Abe *et. al* con base en los resultados encontrados en humanos. En los que varios marcadores genéticos poseen asociación al mismo comportamiento fenotípico ante la infección por *M. tuberculosis* en individuos de poblaciones de regiones geográficas diferentes.^{86, 87}

En la tuberculosis como en otras enfermedades infecciosas, el ingreso, establecimiento y progresión de la infección ocurre bajo un complejo mecanismo de interacciones entre el hospedero y la bacteria. El hospedero despliega una serie de mecanismos de defensa que colaboran para impedir el ingreso o eliminación del agente patógeno ya establecido.⁸⁸ La bacteria por su parte hará uso de sus factores de virulencia para evadir o contrarrestar las barreras impuestas por el hospedero, antes de alcanzar su nicho ecológico. Estos mecanismos de defensa al actuar con mayo eficiencia ante la infección hacen al individuo que los posee resistente a la enfermedad. Por ser un conjunto de mecanismos, es lógico pensar que están controlados a nivel genético por más de un locus. El uso de nuevas tecnologías como la asociación de los loci de efecto cuantitativo (QTLs del ingles Quantitative Trait Loci) al comportamiento de una población ante una enfermedad pueden proveer de nuevos locus con mayor efecto en la resistencia natural a la infección.^{24, 89}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.0 CONCLUSIONES:

Se logro identificar 3 animales con fenotipo resistentes a parásitos intracelulares bacterianos mediante el ensayo bactericida con *M. bovis* BCG subcepa Danesa.

Al evaluar el comportamiento de los macrófagos de los animales resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos contra una cepa patógena de *M. bovis*, se demostró que los macrófagos de animales resistentes controlan con mayor efectividad el crecimiento intracelular de *M. bovis* ($p < 0.05$), pero no al mismo nivel mostrado contra *M. bovis* BCG.

El análisis del polimorfismo de conformación monocatenaria de la 3'UTR del *Nramp1* mostró que 23 de los 24 animales poseen el mismo alelo, que al compararlos con los controles de DNA genotificados, corresponden al alelo resistente y el animal restante mostró genotipo heterocigoto.

No se logro establecer una relación entre el polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1* previamente asociado a resistencia natural a *B. abortus*, a la mayor capacidad bactericida de los macrófagos de animales resistentes a parásitos intracelulares.

Es posible la capacidad bactericida de los macrófagos contra *M. bovis* patógeno tenga asociación con otra región del *Nramp1* en esta población de bovinos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10.0 PERSPECTIVAS:

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo en donde no se logra evidenciar una asociación del fenotipo observado en los macrófagos bovinos con el polimorfismo de la 3'UTR del *Nramp1* se generan cuestionamientos sobre la posible causa de este comportamiento con relación a dicho gen. Un evento probable es que en los macrófagos de animales resistentes la expresión del *Nramp1* sea mayor que en los susceptibles; en este sentido se ha planteado medir la expresión de dicho gen a nivel de RNAm por medio de ensayos de protección a ribonucleasa (RPA del inglés Ribonuclease Protection Assay).

Por otro lado es importante señalar, que al lograr establecer dos grupos de animales en los que la actividad microbicida de sus macrófagos los clasifiqué como resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos, se proporciona material de experimentación para la evaluación de otros posibles genes y/o mecanismos que generen esta diferencia en el comportamiento ante la infección intracelular por *M. bovis* patógeno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11.0 BIBLIOGRAFIA:

1. Rook GAW, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50:259-284
2. Glickman SM, Jacobs Jr WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 2001; 104:477-485
3. Bonney SG. Pulmonary tuberculosis and its complications. Philadelphia: W. B. Saunders Company; ??
4. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in the cattle. *Tuberculosis* 2001; 81:79-86
5. Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin MR, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2001; 81:103-107
6. Aldwell FE, Wedlock DN, Slobbe LJ, Griffin JFT, Buddle BM, Buchan GS. In vitro control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. *Tuberculosis* 2001; 81:115-123
7. Domenech P, Barry III CE, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Immunol* 2002; 4:28-34
8. Brosch R, Gordon SV, Marniesse M, Buchrieser P, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3684-3689
9. Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrell B, Cole ST, Hewinson G. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 2001; 81:157-163
10. Collins DM. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 2001; 81:97-102
11. Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol* 2001; 9:452-458
12. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletion suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 2000; 186:74-80

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

13. McIlroy SG, Neill SD, MacCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec* 1986; 118:718-721
14. Neill SD, O'Brien JJ, MacCracken RM. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet Rec* 1988; 122:184-186
15. Cassidy JP, Bryson DG, Neill SD. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec* 1999; 144:139-142
16. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *J Comp. Path* 1999; 121:321-337
17. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in the cattle. *Tuberculosis* 2001; 81:79-86
18. Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J. A mathematical model of *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet Microbiol* 1991; 28:103-109
19. Costello E, Doherty MI, Monaghan MI, Quigley FC, O'Reilly PF. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J* 1998; 155:245-250
20. Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 2001; 81:23-41
21. Phillips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Res Vet Sci* 2003; 74:1-15
22. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *J comp. Path* 1998; 119:27-44
23. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J* 2002; 163:1-3
24. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun* 2003; 4:4-11
25. Govoni G, Vidal S, Gauthier S, Skaneme E, Malo D, Gros P. The *Bcg/Ity/Lsh* locus; genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp1*^{Gly169} allele. *Infect Immun* 1996; 64:2923-2929
26. Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 1997; 185:717-730

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

27. Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W, Gruenheid S, Gros P, Grinstein S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 1998; 188:351-364
28. Xu DL, Goto Y, Endo F, Amoato KK, Shinjo T. The effect of *Bcg* gene on antigen presentation of spleen adherent cells and peritoneal macrophages from *Mycobacterium bovis* BCG-infected *Bcg⁺* and *Bcg⁻* mice. *Vet Microbiol* 1997; 59:67-78
29. Brown DH, Lafuse WP, Zwilling BS. Stabilized expression of mRNA is associated with microbial resistance controlled by *Nramp1*. *Infect Immun* 1997; 65:597-603
30. Estrada-Chavez C, Pereira-Suarez AL, Meraz MA, Arriaga C, Garcia-Carranca A, Sánchez-Rodríguez C, Mancilla R. High-level expression of NRAMP1 in peripheral blood cells and tuberculous granulomas from *Mycobacterium bovis*-infected bovines. *Infect Immun* 2001; 69:7165-7168
31. Searle S, Bright NA, Roach TI, Atkinson PGP, Braton CH, Meloan RH, Blackwell JM. Localization of *Nramp1* in macrophages: modulation with activation and infection. *J. of Cell Science* 1998; 111:2855-2866
32. Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson, N. Function metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. *J. Exp Biol* 1997; 200:321-330
33. Govoni G, Gros P. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* 1998; 47:277-284
34. Kehres DG, Janakiraman A, Schlauch JM, Maguire ME. *SitABCD* is the alkaline Mn^{2+} transporter of *Salmonella enterica* serovar *tiphymurium*. *J Bacteriol* 2002; 184:3159-3166
35. Kehres DG, Janakiraman A, Schlauch JM, Maguire ME. Regulation of *Salmonella enterica* serovar *tiphymurium mntH* transcription by H_2O_2 , Fe^{2+} , and Mn^{2+} . *J Bacteriol* 2002; 184:3151-3158
36. Wylie S, Seu P, Goos JA. The natural resistance-associated macrophage protein 1 *Sle11a1* (formerly *Nramp1*) and iron metabolism in macrophages. *Microbes Infect* 2002; 4:8841-8848
37. Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P. Natural resistance to intracellular infections: Natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) functions as a pH-dependent Manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* 2000; 192:1237-1247

38. Agronoff D, Monahan IM, Mangan JA, Butcher PD, Krishna S. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel p11-dependent bivalent cation transporter belonging to the Nramp family. *J Exp Med* 1999; 190:717-724
39. Cellier MFM, Bergevin I, Boyer E, Richer E. Poliphyletic origins of bacterial Nramp transporter. *Trends Genet* 2001; 17:365-370
40. Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondria protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. *J Exp Biol.* 1997; 200:321-330
41. Agronoff D, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol* 1998; 28:403-412
42. Forbes JR, Gros P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 2001; 9:397-403
43. Pinner E, Gruenheid S, Raymond M, Gros P. Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family SMF by NRAMP2, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *J Biol. Chem* 1997; 272:28933-28938
44. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. Nramp2 is mutated in the anemia Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 95: 1148-1153
45. Gruenheid S, Cannone-Hergaux F, Gauthier S, Hackam DJ, Grinstein S, Gros P. The iron transport protein NRAMP2 membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* 1999; 189:831-841
46. Cannone-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 1999; 93:4406-4417
47. Kishi F, Tabuchi M. Human natural resistance-associated macrophage protein 2: Gene cloning and protein identification. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251:775-783
48. Goswami T, Bhattacharjee A, Babal P, Scarle S, Moore E, Li M, Blackwell JM. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter. *Biochem J* 2001; 354:511-519
49. Zwilling BS, Jun DE, Wikoff L, Brown D, Lafuse WP. Role the iron in Nramp1-mediated inhibition of micobacterial growth. *Infect Immun* 1999; 67:1386-1392

50. Kuhn DE, Baker BD, Lafuse WP, Zwilling BS. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with *Nramp1*^{Gh169} or *Nramp1*^{Asp169}. J Leukoc Biol 1999; 66:113-119
51. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:8841-8848
52. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. J Exp Med 1998; 2001:1203-1209
53. Hippeli S, Elstner EF. Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. FEBS Lett 1999; 443:1-7
54. Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. BioMetals 1999; 12:195-199
55. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanism of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. J Inorg Biochem 2002; 91:9-18
56. Keyer K, Strohmeier A, Imlay JA. Superoxide and the production oxidative damage. J Bacteriol 1995; 177: 6782:6790
57. Feng J. Isolation and characterization of bovine *Nramp1* and bison *Nramp1*: a major candidate gene for natural resistance to brucellosis [Dissertation]. Texas A&M University.; 1996
58. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
59. URL:<http://www.thearkdb.org>
60. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. Vet Immunol Immunopathol 1995; 50:1-10
61. URL:<http://www.sagarpa.gob.mx>
62. Dankner WM, Davis CE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-México border in the Baja California region. Pediatrics 2000; 105:1-5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

63. Milian F, Sanchez LM, Toledo P, Ramirez C, Santillan MA. D. Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Queretaro, Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 2000; 42: 13-19
64. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM.: Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk it human populations. *Microbes Infect* 2002; 4:471-480
65. Grange Jm.: *Mycobacterium bovis* infection in humans beings. *Tuberculosis* 2001; 81:71-77
66. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HPAK, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:59-70
67. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Programa Nacional de Epidemiología. Manual para determinar el tamaño de muestra para estudios de campo en medicina veterinaria.
68. Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1992, 34:291-305
69. Paulnock, D.M. Macrophages. Practical approach. Great Britain: Oxford University Press, 2000
70. Spiegel MR, Shiller JJ, Sirvasan RA. Probabilidad y estadística. 2nd ed. Colombia; Mc Graw-Hill, 2000
71. Barthel R, Piedrahita JA, McMurray DN, Payeur J, Baca D, Güemes FS, Perumalla VS, Fict TA, Templeton JW, Adams LG. Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1140-1144
72. Pogue R, West S, Bushby K. Multiplex SSCP and Heteroduplex analysis with southern hybridization for large-scale mutation detection. *Genomics* 1998; 54: 1-4
73. Hagashi K. Recent enhancements in SSCP. *Genet Anal* 1999; 14:193-196
74. Maekawa M, Sugano K, Ushiana M, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Relative ratios of mRNA molecules encoded by genes with homologous sequences using fluorescence -based single-stranded conformation polymorphism analysis. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 1996; 223:520-525
75. Temesgen Z, Satoh K, Uhl JR, Kline BC, Cockerill FR. Use of polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis to detect a point in the mutation in the catalase-peroxidase gene (katG) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes* 1997; 11: 59-63

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

76. Rossetti S, Englisch S, Bresin E, Pignatti PF, Turco AE. Detection of mutations in human genes by a new rapid method: cleavage fragment length polymorphism analysis (CFLPA). *Mol Cell Probes* 1997; 11: 155-160
77. Parish T, Stoker DG. Editores. *Mycobacteria protocols. Methods in molecular biology.* New Jersey: Humana Press Inc, 1998
78. Clark VL, Bavoiil PM. Editores. *Bacterial pathogenesis.* San Diego, California: Academic Press, 1997
79. Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, Haun S, Teixeira L, Chen Y, Johnson JL, Ellner JJ, Dietze R, Bates J, Cave MD, Eisenach KD. Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 203-210
80. Parker AE, Bermudez LE. Expression of the green fluorescent protein (GFP) in *Mycobacterium avium* as a tool to study interaction between *Mycobacteria* and host cells. *Microb Pathog* 1997; 22: 193-198
81. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996; 178: 1274-1282
82. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17: 915-992
83. Behr MA. Comparative genomics of BCG vaccines. *Tuberculosis* 2001; 81:165-168
84. Esquivel-Solis H. Apoptosis por *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos: efecto de la virulencia bacteriana y la resistencia del hospedero. (Tesis maestría) México DF, México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2003
85. Gutiérrez-Pabello JA, Adams LG. Survival of *Mycobacterium bovis* in macrophages from cattle naturally resistant and susceptible to intracellular pathogens. *Vet Mex En prensa.*
86. North RJ, Medina E. How important is *Nramp1* in tuberculosis? *Trends Microbiol* 1998; 6:441-443
87. Abe T, Iinuma Y, Ando M, Yokeyama T, Yamamoto T, Nakashima K, Takagi N, Baba H, Hasegawa Y, Shimokata K. *Nramp1* polymorphisms, susceptibility and clinical features of tuberculosis. *J Infect* 2003; 56: 1-6
88. Adams LG. Natural disease resistance in domestic animals with emphasis on intracellular disease: functional and genetic basis. *Academia Veterinaria Mexicana* 1996; 133-148

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

89. Sanchez F, Radiaev TV, Nikonenko BV, Persson A-S, Sengul S, Schallin M, Schurr E, Apt AS, Lavebratt C. Multigenic control of disease severity after virulent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun* 2003; 71: 126-131
90. Perofit II. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods* 2000; 44: 1-30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12.0 ANEXOS:

ANEXO I:

PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE PERCOLL® DE TRABAJO:

Para la recuperación de los monocitos por centrifugación isopícnica, se requiere que la suspensión a preparar de Percoll posea una gravedad específica similar a la de las células a separar.^{69,90}

En este caso la gravedad específica (SG) de la suspensión de Percoll que se utilizó fue de 1.0770.

Para alcanzar esta gravedad específica se hizo necesario adicionar al "Percoll stock" una serie de soluciones en volúmenes variables de acuerdo a la gravedad específica que posea cada uno de ellos y la del "Percoll stock".

Percoll stock (Percoll):

10 volúmenes de Percoll (Percoll^{MT} Amersham Biosciences AB Uppsala Sweden)

1 volumen de NaCl 1.5 M, NaH₂PO₄ 100 mM (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)

Se midió su índice de refracción (RI), el cual puede ser de: RI = 1.3530 a 1.3531

Para calcular la SG del Percoll, se utilizó esta fórmula: $SG\text{-Percoll} = (RI - 1.1814) / 0.1523$

Albúmina sérica bovina 5% (BSA):

5 g de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)

cbp 100 mL de H₂O destilada, se esterilizó por filtración.

Se midió su índice de refracción (RI), el cual fue de: RI = 1.3415

Se calculó la SG de la BSA, con esta fórmula: $SG\text{-BSA} = (RI - 0.63727) / 0.69336$

Citrato de sodio 130 mM (Citrato):

19.11 g Citrato trisódico (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)

cbp 500 mL de H₂O destilada, se filtro para esterilizar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Su índice de refracción (RI) fue medido, el cual fue de: $RI = 1.3388$

Para calcular la SG del Citrato, se utilizó esta formula: $SG\text{-Citrato} = (RI - 1.0918) / 0.24129$

Solución balanceada de fosfatos (PBS):

87.7 g de NaCl (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)

13.0 g de Na_2HPO_4 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)

1.5 g de NaH_2PO_4 (Sigma Chemical CO, St Luis, MO USA)

cbp 1000 mL de H_2O destilada, se ajusto pH a 7.4 y fue esterilizado por filtración

Se midió su índice de refracción (RI), el cual fue de: $RI = 1.3349$

Fue calculada la SG del PBS, con esta formula: $SG\text{-PBS} = (RI - 1.0918) / 0.24129$

Para calcular los volúmenes de cada una de las anteriores soluciones que se adicionaron para preparar 30 mL de la suspensión de Percoll de trabajo, se hizo necesario resolver la siguiente ecuación:

$$X(a) + 0.1(b) + 0.1(c) + (0.8-X)(d) = 1.077 - 1 \quad \text{donde:}$$

$$* a = SG\text{-PBS} - 1$$

$$b = SG\text{-BSA} - 1$$

$$c = SG\text{-Citrato} - 1$$

$$d = SG\text{-Percoll} - 1$$

Se encontró el valor de X.

Se resolvieron cada una de las siguientes ecuaciones para determinar los volúmenes de:

$$\text{Volumen PBS (mL)} = (X)(30 \text{ mL})$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Volumen BSA (mL) = 0.1(30 mL)

Volumen Citrato (mL) = 0.1(30 mL)

Volumen Percoll (mL) = (0.8 - X)(30 mL)

Todas las mediciones de índice de refracción y el cálculo de los volúmenes de las soluciones a agregar para preparar la suspensión de Percoll de trabajo se realizaron el mismo día que se utilizaron.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 2:

Preparación de suspensión de trabajo de Percoll.

Elementos:	RI:	SG:	Volumén
Albumina	1.341	1.014956	3
Citrato	1.3880	1.020349	3
PBS	1.334	1.003771	5.840017
Percoll	1.352	1.120158	18.159983

1	Vol. final	2.30	2	3
	SG	1.0770		
	X =	0.19466724		

*Solo introducir valores de RI (Índice de refracción) en los cuadros indicados para Albumina, Citrato, PBS, Percoll y el volumen final requerido de la suspensión de trabajo de Percoll.
 **No cambiar los datos en los otros cuadros.

Donde:

- 1.- Celdas donde se colocan los valores de las lecturas de índice de refracción (RI) de cada una de las soluciones.
- 2.- Valores de la gravedad específica (SG) de las soluciones calculados en forma automática por la hoja.
- 3.- Volumen de calculado en forma automática de acuerdo al volumen indicado de solución de trabajo a preparar.
- 4.- Celda donde se coloca el valor del volumen a preparar (mL). Valor la gravedad específica deseada para la solución de trabajo y valor de la incógnita X, utilizada para calcular los volúmenes de las soluciones a mezclar para la solución de trabajo de Percoll®.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ANEXO 3:

Vaca	13	1
Cepa	BCG	

Fact Diluc	Inóculo		Tiempo 0		Control 0		Tiempo 1		Control 1	
	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total
P1	503	100600	270	54000	508	101600	210	42000	982	196400
P2			263	52600			207	41400		
P3			268	53600			201	40200		
Promedio			267	53400			206	41200		
Des Est			3 605551	1700 90			4 502576	916 5151		

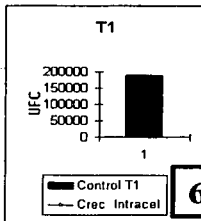
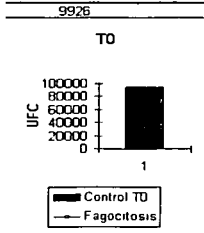
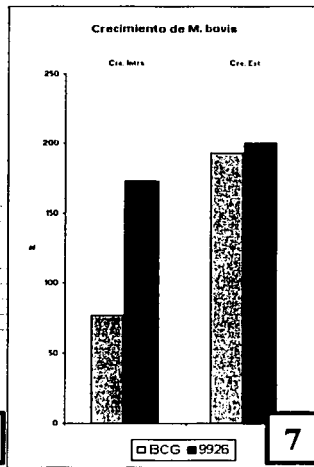
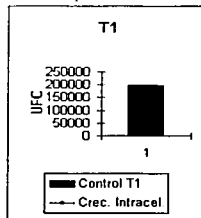
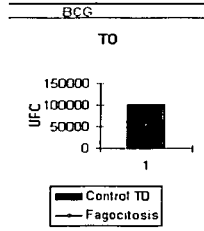
Cepa	9926
------	------

Fact Diluc	Inóculo		Tiempo 0		Control 0		Tiempo 1		Control 1	
	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total	UFC cont	UFC total
P1	460	96000	156	31200	470	94000	281	56200	941	188200
P2			148	29600			271	54200		
P3			165	33000			259	51800		
Promedio			156 3333	31266 67			270 3333	54066 67		
Des Est			8 504901	1700 98			11 01514	2203 026		

Cepa	Fagoc	Cre Intra	Cre Ext	Bac Cel
BCG	53 08151	77 15356	193 3071	5 34
9926	32 56944	172 9211	200 2128	3 126657

5

4



6

7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Donde:

- 1.- Identificación de bovino y cepa de *M. bovis*.
- 2.- Datos de conteo de las UFC de la dilución para el control de inoculo, de las tres serie de diluciones del tiempo cero y del control del tiempo cero.
- 3.- Datos de conteo de las UFC de las tres serie de diluciones del tiempo uno y del control del tiempo uno.
- 4.- Los valores de las UFC contadas para ambas cepas de *M. bovis*.
- 5.- Valores de porcentaje de fagocitosis, crecimiento intracelular a las 24 h PI, crecimiento extracelular a las 24 h y numero de bacterias fagocitadas por célula calculados en forma automática por la hoja de cálculo para ambas cepas.
- 6.- Graficas de porcentaje de fagocitosis y crecimiento intracelular a las 24 h PI con sus respectivos controles de crecimiento extracelular en ambas cepas.
- 7.- Grafica de comparación entre el crecimiento intracelular y extracelular de amabas cepas a las 24 h PI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 4:

Secuencia del *Nramp1* bovino.

LOCUS SLC11A1

DEFINITION *Bos taurus* solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1 (SLC11A1).

Gene Bank, accession Q27981

BASE COUNT	453 a	673 c	626 g	524 t		
ORIGIN						
gcttgcctatg	cccgtgaggg	gctgcccggc	acgccagcca	ctcgcacaga	gagtgcccga	
qcctgcggtc	ctcatgtcag	gtgacacggg	ccccccaaag	cagggagggg	ccagatagg	
ctccatctcc	agcccaccca	glcccagagcc	acagcaagca	ctccccggag	ggacctacct	
aagtgagaag	atccccattc	cggatacaga	atcgggtaca	tlcagcctga	ggaagctgtg	
ggcccttcacg	ggggctggat	tcctcatgag	catcgcatlc	ctggaccacg	gaaacat tga	
gtcggatctc	caggctgggg	ctgtggctgg	atltcaacttc	ctctgggtgc	tgcctgtggc	
caacagtttg	ggtctgtct	ggcagcgacl	ggctgcccgq	ctggggctgg	tgcagggcaa	
ggacttggac	gaggtctgcc	atctctacta	ccctaaggtg	ccccgcattc	tcctctggct	
gaccatcgag	ctagccatcg	tgggtctaga	catgcaggaa	gtcatttgga	cagctat tgc	
attcagttctg	ctctccgcgg	gacgaatccc	actctggggt	gggtgctcca	tcaccgctgt	
ggacactttc	ttcttccctc	tcctcgataa	ctacgggltg	cggaaagctg	aaagccttct	
tggatttctt	attaccataa	tggccttgac	cttcggctat	gagtaagttg	tggctcagcc	
tgtctcagga	gcattgcttc	agggctctgt	cttgcccctc	tggcccaggt	gtggcccagcc	
cgagctgctg	caagccgttg	gcactcatgg	cggccatcct	atgtcccaca	acatctacct	
gcaattctctc	ctgggtcaagt	ctcggagaggt	agaccggtc	cggggccggg	acatccgaga	
ggcccaacatg	tacttctctg	ttgaagccac	catcgccctg	tcctgtcctc	tcctctacaa	
cctcttlytc	atggctgtct	ltggggcaac	ctltctacaag	caaaccaacc	aggetctggc	
caacactctg	gcccagacga	gccctccacga	ctacgcgcgg	atcttctcca	ggaaccaact	
gaccgtggca	gtggacattt	accaaggagg	cgtgtactctg	ggcttgcctt	ltggctctcc	
agccctgtac	atcttggggc	tgggtctctc	ggctgctggg	cagagctcca	ccatgaccgg	
caacctacgcg	ggacagtttg	tgatggaggg	cttccctgaa	ctggcgttgt	caagctctgc	
ccgagctctg	ctcactcggc	ccctggccca	cttgcccact	gtgctctctg	ctgtctctag	
ggacttggcg	gacctgtcag	gectcaaacg	ccctgtccat	gtgctgcaga	gectgtgctc	
tcctctgctc	gtgctgcccc	tcctcaacct	caaccagcatg	cccgcctga	tgcaggagtt	
tqccaaatggc	ctgggtgagca	aagtttatcc	ttcctccact	atgggtgctg	lctgcccgg	
caacccttac	ttcgtgatca	gctacttggc	cagcctcccc	caacctgcc	acttcaagct	
tglagcactg	ctggcccgag	ctcactctgg	cttcaaccact	taccgtgtct	ggacctgtct	
catcacccag	ggagcccactc	ttctggccca	cagttcccac	caacctcttc	ltgatggggc	
tcctgtgagay	gatcaggaga	aggggagagc	ctcgggatga	gctcccaccac	gggctctggc	
acgggtggaa	tgatggggca	cagtggcctg	tcagacaatg	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	
gtgtatgtgt	<u>gtgaaagcag</u>	<u>caagacagac</u>	<u>agggatctc</u>	gggaagctgg	caacgtgagt	
tccagagggg	ctctgtgtgtg	tgtgcacacac	tggcctgcc	gacaaggggt	tgtgtgtgtg	
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	cagcaagagc	gagagggagt	ctgtctctag	tataaaatgt	
<u>agttccat</u> tag	ggacctgtcta	tttctatgct	cagatctcag	tgtctctcag	agccaaagctg	
ggacacctac	cttggagttg	ttgtaaataa	gacacttga	cgcaagacct	agccactcag	
atttaaaaac	aaaagaaatc	ttaatccaaa	agttactgag	cactatccaa	ggagtgaact	
gacagaccca	cccagctctg	gttggggacc	aggtccaaa	ctgatttaaa	ataaagatct	
gaaaatgcta	aataaatgct	gttgtgtctt	gtccccgaa	ccatagtact	agtagaa	

Inserción de iniciadores: Secuencia en negritas y subrayado.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

No 1 Bovino 75 Fenotipo R Alelo R	<pre> tccagagggg cctgtgtgtg tgtgacacac ttct ggaagctggc caacgtgagt <u>tgtgtgtgtg</u> <u>tgtgcatgca</u> cagcaagacg gagagggagt tctggaaggc agccaacgtg agttccata </pre>
No 2 Bovino 98 Fenotipo R Alelo R	<pre> tccagagggg cctgtgtgtg tgtgacacac ttct ggaagctggc caacgtgagt <u>tgtgtgtgtg</u> <u>tgtgcatgca</u> cagcaagacg gagagggagt tctggaaggc agccaacgtg agttccata </pre>
No 3 Bovino 189 Fenotipo S Alelo R	<pre> tccagagggg cctgtgtgtg tgtgacacac ttct ggaagctggc caacgtgagt <u>tgtgtgtgtg</u> <u>tgtgcatgca</u> cagcaagacg gagagggagt tctggaaggc agccaacgtg agttccata </pre>
No 4 Bovino 52 Fenotipo S Alelo S	<pre> tccagagggg cctgtgtgtg tgtgacacac ttct ggaagctggc caacgtgagt <u>tgtgtgtgtg</u> <u>tgtgNntgca</u> cagcaagacg gagagggagt tctggaaggc agccaacgtg agttccata </pre>

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN