

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Efecto de la resistencia natural a *Mycobacterium bovis* en la
activación de los macrófagos bovinos por la vía alterna.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A:

Uziel Castillo Velázquez

Tutor Principal: José Ángel Gutiérrez Pabello

Comité tutorial: Luz Maria López Marín
Rogelio Alonso Morales



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Uziel Castillo Velazquez

Dedicatoria.....

A Dios.
Principalmente a el.

A mis padres:

Rosalía Castillo y Guillermo Paredes.
Quienes siempre velaron por mí y me dieron lo mejor que un hijo puede tener que es amor y apoyo incondicional, así como por impulsarme todos los días a superarme y mantener una competencia eterna conmigo mismo, esto es especialmente para ustedes, mis viejos, aliciente de todo lo que he hecho en la vida.

A mis hermanos:

Uriel, Adriana y Juana Elideth.

A mis Sobrinos:

Manelick, Esteban y principalmente a Gahel y a Memito
A ustedes por ser los motores que cada día me impulsan a superarme y hacerme ver que cualquier mal día es superado y olvidado con una miradita y un besito tierno que de ustedes venga.

A Araí:

A ti, por que al buscarte me encontré yo mismo
Por ser la piedra angular de mi vida en este momento.
TQM

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Gracias.....

A mi honorable jurado: Dra. Clara Espitia Pinzon, Presidente. Dr. Rogelio Hernández Pando, Vocal. Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Secretario. Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Suplente. Dr. Mauricio Castañón Arreola. Por sus juiciosos y desinteresados comentarios para mejorar el presente trabajo.

A mi comité tutorial: Dra. Luz Maria López Marín y Dr. Rogelio Alonso Morales por sus comentarios, aportación, orientación y confianza para la realización de este trabajo.

A mi tutor: José Ángel Gutiérrez Pabello. Gracias por permitirme lograr una de las muchas metas en mi vida, por demostrarme que uno nunca termina de crecer y que siempre habrá algo que se puede mejorar, por instaurar en mi la capacidad, la confianza y la objetividad para lograr este objetivo, por darme la oportunidad de tomar decisiones y hacerme consciente de las consecuencias que ellas implican, gracias por NO darme la oportunidad de fallar, ya que de eso dependió este éxito, que mas que mío es de un grupo de trabajo que siempre velo por mi buen funcionamiento, gracias más que tutor o asesor fue un amigo incondicional y a veces hasta fungió como padre con sus consejos y regaños.

A mis amigos del Laboratorio de Investigación en Tuberculosis y Brucelosis. Especialmente al grupo de Tuberculosis bovina. Elihu Aranday, Toño Vallecillo (El Doc), Jorgito De la Garza, Hugo Esquivel, Alexis Paulina (Alepa), Cinthia, Alan (chavito), Alejandro Benítez y Eve-lyne, los cuales pertenecen a un grupo de trabajo que siempre tuvo el tiempo y la disponibilidad para compartir sus conocimientos, su amistad y sobre todo su calidad humana, grupo al cual me siento completamente orgulloso de pertenecer, gracias por hacerme sentir como de la familia.

Esencialmente a Lucy Favila por su invaluable amistad, su confianza y su apoyo incondicional en todo momento, por motivarme a seguir adelante y darme la confianza para saber que las metas se pueden cumplir y que siempre estarás ahí para ayudarme a mejorar.

A mis compañeros de piso: principalmente a Moy, Bárbara, Itzel, Juanjo, Alejandra, Gil Andrés, quienes fueron siempre la contracara de mi comportamiento dentro de un laboratorio, gracias por ser fuentes de desahogo y apoyo moral durante este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Erica Carrillo, Dr. Rigo, Dra. Bety, Dra. Irasema, Victor Campuzano (Manito), Dr. Edgar, a Yuliette, Jorge Alba, Valeria, Rosalia (La Chalis), Marino, Almita y a Pablo Vera (Pablito). Gracias a todos ellos por su amistad, sus sabios consejos y su aporte constante en ideas, juicios y críticas constructivas a mi trabajo y a mi persona, a todos ellos debo gran parte de mi formación personal, así como profesional.

A mis compañeros de Generación: Edith, Andira, Jimena, Rosalba, Deyanira, al pinché Güero, Paty, y Nadiuchis. Con los cuales recorrí este sinuoso camino y por fin todos vamos llegando a la meta, Gracias.

Al personal del CEIPSA: al Dr. Javier Gutiérrez Molotla, al Dr. Julio Guarneros, al Capi y a Daniel, por cuidar y mantener en óptimas condiciones de salud a los bovinos utilizados en este estudio, personas que a veces son poco reconocidas pero que tienen un gran peso en este proyecto ya que de ellos dependió gran parte de esta meta.

A las instituciones: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia principalmente al LITB, a las Dras. María Candela Chiesa, Dra. Perla Del Río y al Dr. Gustavo Reyes Terán del CIENI-INER por su apoyo en la técnica de Citometría de Flujo. Al Dr. Rogelio Hernández Pando y a Juan Carlos León del Depto. de Patología del INNSZ, por su apoyo en la técnica de Microscopia Electrónica. A la Dra. Clara Espitia y al Dr. Antonio Javier Vallecillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo con la cepa BCG-GFP para la técnica de Microscopia de Florescencia.

A los Proyectos: CONACYT-PAPIIT-IN 222306 e IN-214009-3.

Gracias a todos y cada uno de ustedes, todos son importantes y aportaron demasiado en el logro de esta meta, el papel tendrá mi nombre, pero el trabajo lo hicimos todos y espero que este logro lo sientan tan suyo como yo.

Gracias.

*El inteligente no es aquel que lo sabe todo,
Sino el que sabe utilizar lo poco que sabe.*

Sebastian cohen

*Los obstáculos son esas cosas que las personas ven
cuando dejan de mirar sus metas.*

E. Joseph Cossman

*La verdadera sabiduría está en reconocer
la propia ignorancia*

Sócrates

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.- Agente etiológico de la tuberculosis bovina.	12
1.2.- RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>Mycobacterium bovis</i>	13
1.3.- Respuesta inmune innata.	13
1.4.- Respuesta inmune adquirida.	15
1.5.- Apoptosis como mecanismo de control de <i>M.bovis</i>	17
1.6.- Activación clásica del macrófago.	18
1.7.- Activación Alternativa del macrófago.	19
1.8.- Resistencia natural del ganado a patógenos intracelulares.	22
2.- JUSTIFICACIÓN:.....	17
3.- HIPOTESIS:.....	18
4.- OBJETIVOS:.....	18
Objetivo general:.....	18
Objetivos específicos:.....	18
5.- MATERIAL Y MÉTODOS:.....	19
5.1.- Animales.	19
5.2.- Macrófagos Derivados de Monocitos de Bovino (MDMB).	20
5.3.- Cosecha de los Macrófagos.	21
5.4.- Inducción de activación alterna por efecto de IL-4.....	21
5.5.- Cepas Bacterianas.	22
5.6.- Preparación del inóculo.	22
5.7.- Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	23
5.8.- Infección de macrófagos.	23
5.9.- Tratamientos:.....	25
5.11.- Síntesis de ADN complementario (cDNA).....	26
5.12.- Cuantificación de mRNA de citocinas por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (q-PCR).....	26
5.13.- Método de cuantificación.	28
5.14.- Desarrollo del Ensayo Bactericida.....	29
5.15.- Detección intracelular de <i>M. bovis</i> BCG-GFP.	31
5.16.- Detección de Apoptosis.....	31
5.17.- Fragmentación del ADN nuclear (FADN).....	32
6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
7.1.- Los macrófagos bovinos de animales resistentes muestran mayor producción de Óxido Nítrico bajo el tratamiento con LPS.	34
7.2.- La Interleucina-4 recombinante bovina disminuye la producción de ON en macrófagos bovinos.....	34
7.3.- La activación alterna del macrófago promueve la transcripción incrementada de receptores de superficie en macrófagos bovinos.....	35
7.4.- La infección con <i>M. bovis</i> no rescata la producción de ON ni modifica la concentración de arginasa bajo condiciones de activación alterna.	35

7.5.- La activación alterna del macrófago disminuye la expresión génica de citocinas proinflamatorias en macrófagos infectados con <i>M. bovis</i>	36
7.6.- La expresión de IL-1b, TNF- α y MIP-1 es superior en macrófagos de animales susceptibles por la presencia de la micobacteria y no por efecto de la IL-4.	37
7.8.- La estimulación sostenida con rIL-4 disminuye el índice fagocítico en macrófagos de animales resistentes.	38
7.9.- La estimulación sostenida con rIL-4 mejora el control de la replicación de <i>M. bovis</i> por macrófagos de animales susceptibles.	39
7.10.- El fenotipo de resistencia y susceptibilidad juega un papel determinante en la inducción de apoptosis en macrófagos bovinos activados por la vía alterna e infectados con <i>M. bovis</i>	40
8.- DISCUSIÓN.....	42
9.- CONCLUSIONES.....	55
11.- FIGURAS.....	73
12.- SOLUCIONES.....	91
17.- GRADIENTE DE PERCOLL.....	92

RESUMEN

Uziel Castillo Velázquez Efecto de la resistencia natural a *Mycobacterium bovis* en la activación de los macrófagos bovinos por la vía alterna. Bajo la Dirección del Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello.

En el presente estudio se determinaron las diferencias en cuanto a capacidad fagocítica, supervivencia intracelular, índice de apoptosis y expresión de citocinas dadas por los diferentes esquemas de activación del macrófago y el papel que juega el fenotipo animal de resistencia o susceptibilidad a patógenos intracelulares bajo un desafío con *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Se seleccionaron 6 animales previamente clasificados como Resistentes (R) y Susceptibles (S) Se obtuvieron monocitos derivados de sangre periférica, posterior a 13 días de maduración y diferenciación a macrófagos fueron activados bajo los diferentes métodos de activación y desafiados con *M. bovis* BCG como cepa patógena y *M. bovis* 9926 como cepa patógena, a una multiplicidad de infección de 10:1. Se logró la inducción de la activación alterna en macrófagos bovinos por efecto de la rIL-4; asimismo, dicha citocina produjo la disminución en la producción de ON bajo condiciones de infección, un aumento en la expresión a nivel de transcritos de receptores de superficie celular como es el Receptor de Manosa del Macrófago y el Receptor Scavenger A1 del macrófago y una disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias en comparación con la vía clásica, aunque la presencia de la micobacteria estimuló la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, siendo este efecto más evidente en macrófagos procedentes de animales R, los cuales muestran un índice de fagocitosis superior con ambas vías de activación celular y un mejor control de la proliferación micobacteriana, bajo condiciones de activación alterna; sin embargo, al mantener la estimulación con esta citocina los animales S mostraron un control en la proliferación bacteriana similar al de los animales R, por último se evidenció un mayor porcentaje en el índice de Fragmentación de ADN en animales S en presencia de *M. bovis* en comparación con animales R. Conclusión: Los animales R poseen la capacidad de responder mejor hacia los estímulos mostrando una mayor expresión de citocinas y quimiocinas, control intracelular de *M. bovis*, producción de ON e índice de apoptosis como mecanismo de control, siendo esta respuesta inflamatoria conservada a pesar del tipo de activación del macrófago, por lo tanto el fenotipo podría influir en la resolución de la infección independiente al tipo de activación celular.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, macrófago bovino, activación alterna, resistencia natural.

ABSTRACT

Uziel Castillo Velázquez *Mycobacterium bovis* natural resistance effect on alternative activation of bovine macrophages
Directed by Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello.

In the present study phagocytic ability, intracellular survival, apoptosis index and cytokine expression under the different macrophage activation schemes were evaluated in bovine macrophages experimentally challenged with *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), macrophages became from animals with intracellular pathogen resistance or susceptibility phenotype. Six animals formerly classified as Resistant (R) or Susceptible (S) were chosen. Monocytes from peripheral blood were obtained and, after the 13 days maturation and differentiation, macrophages were activated under different pathways and challenged with *M. bovis* BCG (non pathogenic strain) and *M. bovis* 9926 (pathogenic strain) at multiplicity of infection of 10:1.

Bovine macrophage alternative activation were successfully induced by rbIL-3, this cytokine diminished ON production under infection conditions and increases transcription of superficial cellular receptors as Macrophage Mannose Receptor and Scavenger A1 Receptor in macrophages, as well as reduces the pro-inflammatory cytokines and chemokines expression; this effect was more evident in macrophages from R animals which showed superior phagocytosis index under both activation phenotypes and a better mycobacteria proliferation control under alternative activation. When rbIL-3 stimulation persists, S animals showed similar bacterial proliferation control when compared with R animals. Higher levels of DNA fragmentation were observed in macrophages from S animals when exposed to *M. bovis*.

In conclusion, phenotype differences suggests that R animals have better ability to face up stimulus showing higher cytokine and chemokine expression, *M. bovis* intracellular control, ON production and phagocytosis index as a control mechanism. This better inflammatory response is preserved no matter the activation phenotype; therefore R phenotype could influence infection resolution independently from cellular activation type.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, bovine macrophage, alternative activation, natural resistance.

1.- INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis bovina es una enfermedad causada por *Mycobacterium bovis*, una micobacteria que afecta principalmente el aparato respiratorio y se manifiesta en forma crónica, además de que guarda una estrecha relación genética y estructural con *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis humana. (Brosch, 2002).

La patogenia de la infección ocurre en condiciones similares en ambas especies, comenzando con la entrada de la bacteria a los pulmones por inhalaciones aéreas y la posterior fagocitosis por los macrófagos alveolares que son considerados como la primera línea de defensa ante la micobacteria, además de ser las células donde subsiste (Fenton, 1996; Keane, 1997).

Durante las primeras etapas de reconocimiento, los macrófagos pueden interactuar de dos maneras con las micobacterias; puede haber una interacción directa entre los diversos receptores del macrófago con los componentes constitutivos de la superficie de la bacteria, o bien, el macrófago puede reconocer de manera específica diversos elementos séricos como los anticuerpos, o de manera inespecífica como los componentes del complemento o proteínas de fase aguda, los cuales actúan como opsoninas. Aunque el reconocimiento puede darse en presencia o ausencia de componentes del suero, las vías de activación del macrófago infectado pueden variar y esto repercutir en la viabilidad del microorganismo (Schlesinger, 1993 y 1996; Hirsch, 1994).

Se ha propuesto que la vía de entrada de la micobacteria determina su destino dentro de los macrófagos; por ejemplo, la internalización por medio de receptores *Fc* de la micobacteria opsonizada induce la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y favorece la fusión fagosoma-lisosoma, mientras que si la entrada es a través de CR3 inhibe el estallido respiratorio y no hay maduración de los fagosomas. (Ferguson, 2000; Aderem, 1999).

La alteración de la respuesta inmune puede resultar en la reactivación y replicación del bacilo, con necrosis y daño al tejido pulmonar. La respuesta inmune es capaz de prevenir la enfermedad activa en la mayoría de los casos, pero no elimina la infección.

La habilidad de la micobacteria para mantener una infección crónica y producir la enfermedad en un individuo infectado, depende de sus factores de virulencia que capacitan al microorganismo para entrar y sobrevivir indefinidamente dentro de las células fagocíticas mononucleares, se sabe que los macrófagos juegan un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis bovina, debido a que estos son la primera línea de ataque, actúan como hospederos y son el principal mecanismo de control.

1.1.- Agente etiológico de la tuberculosis bovina.

Mycobacterium bovis, forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Es un microorganismo ácido alcohol resistente de crecimiento lento con un intervalo generacional de 16 a 20 horas (Cole, 2002) debido a la gran cantidad de lípidos que conforman su pared (60 % de peso seco). El tiempo de crecimiento en medios de cultivo es de 3-4 semanas a una temperatura óptima de 35-37 °C, es exigente en sus requerimientos nutricionales por lo que necesita medios específicos para su cultivo, tales como Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11, 7H12, Dubos, Petragnani, Stonebrink-Leslie y Löwenstein Jensen. La adición de glicerol inhibe el crecimiento de *M. bovis* a diferencia de *M. tuberculosis* el cual se ve favorecido (McKinney, 2000; Milner, 1969; Dubos, 1946; Kilburn, 1968; Mitchison, 1971). Es aerobio facultativo, tiene la capacidad de cambiar su ruta metabólica para la producción de energía a partir del ciclo de Krebs al ciclo del glioxilato, utilizando la enzima isocitrato liasa (Icl). (Carter, 1986).

El complejo tuberculosis incluye a las siguientes especies micobacterianas: *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. microti* *M. africanum* y finalmente *M. bovis*, el cual comparte el 99% de homología con las otras bacterias que conforman este complejo, asimismo la enfermedad es considerada como una zoonosis (Costello, 1998; Mostowy, 2002; Rastogi, 2001).

Adicionalmente esta bacteria, cuenta con mecanismos de virulencia los cuales le permiten evitar la fagocitosis, acelerar su replicación, de igual forma posee algunas proteínas que sirven para la supervivencia, como son catalasa peroxidasa o KatG (Cohn, 1968; Marcinkeviciene, 1995; Wilson, 1995) la superóxido

dismutasa o SodA y SodC y glutamina sintasa o glnA1, (Yuan, 1996; Harth, 2003) que son enzimas que degradan reactivos intermediarios de oxígeno. (Li, 1998; Dussurget, 2001) HspX (Acr) que es una proteína cuya expresión es inducida bajo condiciones de anoxia, estando presente en organismos infectados aunque aún se desconoce su función (Piddington, 2001; Yuan, 1998).

Otras proteínas que se encuentran asociadas a los lípidos de la pared son OmpA que actúa como porina, encontrada solo en cepas virulentas de *M. tuberculosis*, (Horwitz, 2000; Senaratne, 1998). Adicionalmente, la proteína de 19 kDa interactúa con los receptores TLR-2 siendo importante en la vía de entrada de la micobacteria (Harth, 1999; Brennan, 1999; Hickman, 2002.)

Algunos elementos de la pared bacteriana como es el lipoarabinomano (LAM) puede actuar como un importante inmunomodulador de la respuesta inmune disminuyendo la producción de IFN- γ (Raynaud, 2002).

1.2.- RESPUESTA INMUNE CONTRA *Mycobacterium bovis*.

1.3.- Respuesta inmune innata.

La patogenia de la tuberculosis bovina empieza con la entrada de un pequeño número de bacilos a los pulmones por vía aérea. Una vez que el bacilo es inhalado se aloja en las vías primarias, es fagocitado por los macrófagos alveolares (Fenton, 1996; Keane, 1997).

En el espacio alveolar los mecanismos innatos de defensa involucran a diferentes tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, células alveolares tipo I y II y factores solubles como mucina, defensina, lisozima, lactoferrina, proteínas surfactantes, fosfolipasa A₂, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio (Knowles, 2002).

La respuesta inmune innata ante infecciones por el género *Mycobacterium* comienza con el reconocimiento de diversas estructuras moleculares de origen micobacteriano por algunos receptores como los *TLR (Toll Like Receptors)*, los cuales inducen la producción de TNF- α y óxido nítrico (ON) que directa o indirectamente contribuyen a la muerte de los microorganismos, además de inducir la activación y orientación de la respuesta inmune adquirida a través del reclutamiento de linfocitos T al sitio de la lesión; asimismo, se induce la activación de las células dendríticas, favoreciendo la producción de citocinas y quimiocinas. (Vasselon, 2002; Iwasaki, 2004). Una vez que la micobacteria es degradada en su totalidad, entran en acción los mecanismos proteolíticos encargados de la generación y presentación de péptidos y otros antígenos. (Korbel, 2008)

Posterior a la fagocitosis, la micobacteria es incluida en el fagosoma para formar el fagolisosoma donde, en un proceso dinámico, es destruida por los mecanismos bactericidas de los macrófagos que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno las cuales causan daños a las proteínas estructurales y de membrana, así como a los ácidos nucleicos, ocurriendo fragmentación de DNA e inactivación de enzimas etc...

Por otro lado, pueden intervenir especies reactivas de nitrógeno que por medio de la enzima óxido nítrico sintasa forman el óxido nítrico el cual debido su carácter inestable y junto con los radicales libres de oxígeno interaccionan ávidamente con un sinnúmero de grupos químicos presentes en muchas moléculas causando en ellas alteraciones estructurales y funcionales, como bloquear la respiración bacteriana, inhibir la síntesis de ADN, ocasionar la pérdida de bases, y la desaminación de la citocina en uracilo causando mutaciones al momento de la replicación y la ruptura de una o las dos hebras del ADN (Kwon, 1997).

Por otro lado la micobacteria tiene la capacidad de producir cantidades significativas de amoníaco y así evadir el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal, reduciendo la potencia de las enzimas intralisosomales vía alcalinización; enzimas como la glutamino-sintetasa y la ureasa micobacteriana, inhiben la fusión fagolisosomal promoviendo la supervivencia de ésta.

1.4.- Respuesta inmune adquirida.

El proceso de presentación de antígenos constituye un paso importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares. El control inmunológico de la infección por *Mycobacterium* está basado en la respuesta inmune de tipo celular caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas como: IL-12, IFN- γ , IL-18, TNF- α , RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-18. Las diferentes poblaciones celulares y mediadores solubles en su conjunto forman una compleja red de señales que participan en el control de la enfermedad. También puede aparecer una respuesta no protectora caracterizada por la producción de citocinas Th2 como: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β , que antagonizan la respuesta inmune celular, y como consecuencia, no hay un buen control de la infección favoreciendo la enfermedad.

Algunos componentes de la micobacteria como el LAM, la lipoproteína 19 kDa y algunas glicoproteínas, inducen la producción de moléculas como IL-1, TNF- α y ON, la unión de estas tres activa diferentes vías de señalización que tienen en común el factor nuclear κ B (NF- κ B), induciéndose la expresión de citocinas y proteínas involucradas en la respuesta inmune para favorecer la eliminación o inhibición del crecimiento micobacteriano o servir como switch entre la respuesta inmune innata y la adquirida. (López M, 2003)

Los linfocitos T participan en la respuesta inmune adquirida con dos funciones fundamentales, una de ellas es la producción de citocinas como el INF- γ el cual activa las funciones efectoras por parte del macrófago, y es producido por todas las células T: como CD4+, CD8+, T $\gamma\delta$. De igual forma, las células T tienen actividad citolítica sobre células infectadas, aunque la lisis de los macrófagos infectados no elimina completamente a la micobacteria (Flesch, 1995).

Durante la fase de estimulación de la respuesta inmune los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas del Complejo de Histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y presentados por los macrófagos a los linfocitos T CD8⁺, los cuales tienen capacidad de producir INF- γ , reconocer antígenos proteicos y glicolípidos micobacterianos acoplados a moléculas del

MHC I o CD1. Dichas células poseen funciones citotóxicas para lisar a las células infectadas a través de un mecanismo dependiente de granulinas, el cual implica un reconocimiento entre las células presentadoras de antígenos (CPA) y los linfocitos T CD8⁺ (Flynn, 2001).

Asimismo, los antígenos proteicos pueden ser acoplados a moléculas del Complejo de Histocompatibilidad tipo II (MCHII) y presentados a los linfocitos TCD4⁺, que los reconocerán e iniciarán la producción de INF- γ , cuya acción mantendrá la activación de macrófagos. Por su parte el macrófago tiene la capacidad de producir IL-1 e IL-2 citocinas que promueven la expansión clonal de los linfocitos T CD4⁺ y su activación lo que resultará en una mayor producción de INF- γ .

Por otro lado, los antígenos de naturaleza glicolípida (fosfatidil manósidos, lipoarabinomananas, ácidos micólicos y hexosil-1-fosfoisoprenoides) son reconocidos por moléculas CD1 y presentados a linfocitos TCD8⁺ y linfocitos T dobles negativos (CD4⁻CD8⁻) (Schluger, 2001).

Otra población importante de linfocitos son los T $\gamma\delta$ los cuales desempeñan un papel importante en la infección ya que son las primeras células reclutadas hacia el sitio de infección donde secretan citocinas y quimiocinas que tienen la capacidad de eliminar macrófagos infectados mediante un mecanismo de citotoxicidad dependiente de gránulos, similar al de los linfocitos CD8⁺.

Las infecciones por microorganismos que producen una reacción granulomatosa crónica son el mejor ejemplo de la falta de eficiencia de los mecanismos bactericidas en la defensa del huésped o una pobre respuesta por parte del sistema inmune. Las razones son múltiples e incluyen un defecto en la activación por parte de los macrófagos, que es secundario a la fagocitosis mediada por receptores que no activan el mecanismo productor de reactivos intermediarios de oxígeno (ROI), aunque también existe una resistencia intrínseca de la micobacteria a dichos compuestos y es necesario que se combinen con los reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI) para aumentar significativamente la capacidad micobactericida (Zhu, 1992).

1.5.- Apoptosis como mecanismo de control de *M.bovis*

La apoptosis se define como un proceso de muerte celular programada, descrita por primera vez por Ker y colaboradores en 1972. La apoptosis es una función fisiológica básica durante el desarrollo embrionario, en el crecimiento y para el mantenimiento de la homeostasis en las células, su objetivo es eliminar las células dañadas o innecesarias para el beneficio del organismo (MacFarlane y Williams, 2004). Por ejemplo, la mitad de los linfocitos son eliminados por apoptosis, así como células defectuosas y con un potente mecanismo destructivo como neutrófilos (Winau, 2004).

La apoptosis es un mecanismo involucrado en la defensa del macrófago contra la micobacteria, se sabe que la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos de ratón y de humano puede inducir o inhibir la apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo* (Keane, 1997; Placido, 1997; Klinger, 1997; Watson, 2000; Hirsch, 2001; Rojas, 1999). La inducción de apoptosis por *M. tuberculosis*, es parcialmente mediada por la unión de los componentes de la pared celular bacteriana al receptor tipo TLR-2 (Aderem, 1999). De manera que las actividades pro y anti-apoptóticas inducidas por *M. tuberculosis*, que posiblemente se manifiestan durante los diferentes estados de la infección, pueden ser necesarias para el establecimiento de una infección persistente (Liang-Yong, 2000).

Asimismo, la apoptosis de los macrófagos infectados inhibe el crecimiento intracelular y la diseminación bacteriana (Fratuzzi, 1997). Por otra parte, se ha demostrado la inducción de apoptosis en macrófagos de bovino tras la incubación con *M. bovis* virulento en ensayos *in vitro*, lo cual sugiere que existe una relación directa entre la multiplicidad de infección (MOI) utilizada y el tiempo de presentación de este fenómeno (Gutiérrez-Pabello, 2002). Además, los macrófagos provenientes de bovinos resistentes o susceptibles a *M. bovis* BCG presentan diferencias significativas en el control de la cepa virulenta y otros agentes, siendo mayor el control en los resistentes (Qureshi, 1995; Vallecillo, 2003).

1.6.- Activación clásica del macrófago.

Se sabe que la activación “clásica” de los macrófagos, es conocida desde los estudios realizados por Mackaness *et al*, (1964) quienes demostraron que la infección de ratones con *Mycobacterium bovis* BCG o *Listeria monocytogenes* aumentaba la actividad microbicida de los macrófagos de manera estímulo-dependiente pero no antígeno-específica (Gordon, 1999; Hamilton, 2002).

La activación de los macrófagos permite la erradicación de estas bacterias y ocurre cuando diversos mediadores solubles (citocinas) producidas por los linfocitos T, potencializan los mecanismos bactericidas de los macrófagos los cuales destruyen a los microorganismos través de mecanismos dependientes e independientes del oxígeno.

La función bactericida de los macrófagos se fundamenta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROI) y del nitrógeno (RNI) a través del estallido respiratorio, los primeros incluyen la participación de los radicales libres del oxígeno (ROI) generados por el sistema de la NADPH-oxidasa al transformar al oxígeno molecular en anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Walter, 1981).

Algunas citocinas involucradas y que modulan la activación clásica de los macrófagos como el IFN- γ y otras como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-1 e interleucina-6 las cuales son producidas por los mismos macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (a excepción del IFN- γ) y por linfocitos expuestos a productos micobacterianos, ejerciendo efectos inmunorreguladores y mediando muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis. El INF- γ es clave en el control de infecciones por especies del género *Mycobacterium*, es producido por células T CD4⁺, CD8⁺ y T $\gamma\delta$ así como también por células NK. Asimismo, se cree que podría estar involucrado en un aumento en la presentación de antígenos, reclutamiento de linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos T citotóxicos, los cuales podrían participar en la eliminación de la infección. Si bien la sola producción de INF- γ es ineficiente en el control de la infección por *Mycobacterium*, éste es requerido para una adecuada respuesta

protectiva hacia el patógeno. Aunque la producción de IFN- γ , esta principalmente limitada a las células T y a las células NK, también se ha comprobado su producción por macrófagos alveolares de humanos tras la infección por *M. tuberculosis* (Fenton, 1997). Por otra parte, se ha demostrado que la 1,25 Dihidroxitamina D3 (1,25-(OH) $_2$ D $_3$), sola o en combinación con IFN- γ y/o TNF- α es capaz de activar a los macrófagos para inhibir el crecimiento o eliminar a *M. tuberculosis*. (Denis, 1991). En conclusión la actividad conjunta de los ROI, el ON y los componentes lisosomales son la principal causa de muerte del microorganismo ingerido.

1.7.- Activación Alterna del macrófago.

Gordon (2003) define a la activación alterna como la activación de los macrófagos inducida por IL-4 e IL-13, citocinas que son producidas generalmente por una respuesta tipo Th2, inhibiendo la respuesta Th1 por antagonismo con el IFN- γ , este fenómeno se ha asociado particularmente a procesos alérgicos, respuesta humoral y celular a parásitos y patógenos extracelulares.

Mantovani (2004) menciona que la IL-4 e IL-13 son más que simples inhibidores de la activación del macrófago, e inducen una activación diferente refiriéndose a ella como una activación alternativa, la cual es inducida por las citocinas antes mencionadas y caracterizada por la presencia de receptores no-opsónicos, bajos niveles de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; NOS2), así como una marcada disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias como es la IL-1, TNF- α e IL-6 (Esquema.1).

Estudios recientes agrupan los efectos de estas citocinas sobre los macrófagos junto con los efectos de la interleucina 10, (IL-10) como “desactivadores ” de los macrófagos, aunque ya es sabido que estos efectos son producidos por la IL-4 e IL13, la cuales inducen cambios fenotípicos en la superficie celular distintos a los inducidos por el IFN- γ y la IL-10 (la cual desactiva el mecanismo de estallido respiratorio y la producción de citocinas inflamatorias, particularmente el TNF- α por los macrófagos). La IL-4 e IL-13 aumentan la expresión de moléculas del MHC II por parte de los macrófagos, lo cual estimula la endocitosis y el aumento en la

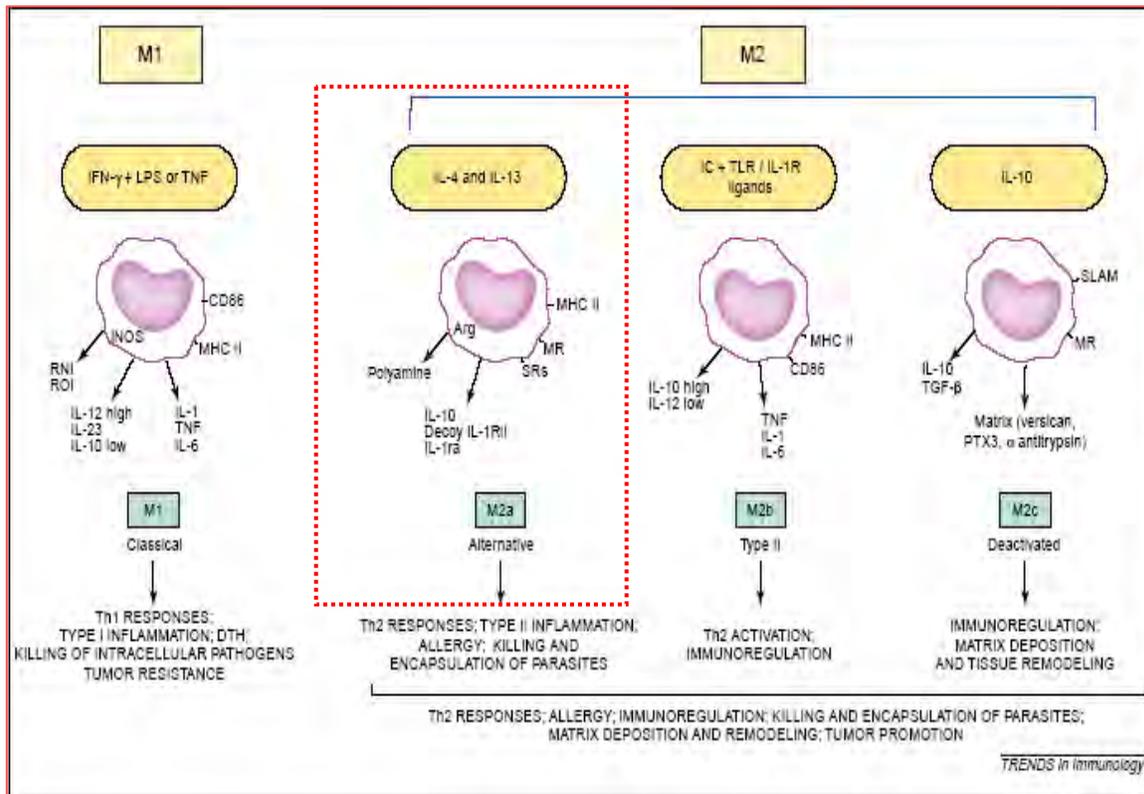
expresión de los receptores de manosa (MR) y, por lo tanto, el flujo de ligandos dentro de los lisosomas, de igual manera se favorece el incremento de la presentación de antígenos e inducción en la expresión de quimiocinas selectivas como es la quimiocina derivada del macrófago (MDC), también conocida como CCL22, y la quimiocina reguladora de activación y timo (TARC) o CCL17; este tipo de activación por parte del macrófago favorece la producción de la L-arginina como precursor en la biosíntesis de prolina y poliamina, promueve el crecimiento celular, formación de colágeno y reparación del tejido, todo esto implicado en la formación y funcionalidad del granuloma (Hesse, 2001). Además se sabe que la IL-4 y otras citocinas del tipo Th2 incrementan el metabolismo de la L-arginina por parte del macrófago vía la enzima Arginasa, lo cual produce ornitina y urea (Munder, 1999).

Mooser (2003) menciona que este tipo de activación está dada por la exposición de los macrófagos hacia la IL-4 o glucocorticoides lo que induce a la sobreexpresión de receptores fagocíticos, pero tiene fallas en la producción de radicales de nitrógeno, que da como resultado una pobre eliminación de patógenos intracelulares (Modolell, 1995) y parece estar más involucrada en procesos de inmunosupresión y reparación de tejidos. La actividad supresora de este tipo de macrófagos influye sobre células T activadas por mitógenos los cuales muestran una significativa reducción en sus capacidades secretoras y proliferativas, donde hay un aumento en la producción de IL-10 y del receptor antagonista de la IL-1 (IL-1R α) (Goert, 1999-b).

Estudios recientes mencionan que los macrófagos activados de forma alterna muestran un aumento en la producción de componentes involucrados en la síntesis de la matriz extracelular como el β IG-H3 que promueve la fibrogénesis por medio de células fibroblastoides, así como altos niveles de fibronectina, (Gratchev, 2001; Song, 2002) e induce la expresión de moléculas del MHC II, matriz metaloproteínasa-12 (MMP-12) y receptores de transferrina (TfR) (Antje, 2006).

También se ha encontrado evidencia que los macrófagos responden diferencialmente a los estímulos de citocinas Th1 y Th2, por ejemplo, los macrófagos asociados a estímulos Th1 son activados de una forma más temprana

para producir ON en comparación con macrófagos asociados a Th2, los cuales no solo no producen ON, sino que incrementan el metabolismo de la L-arginina, lo cual sugiere que la influencia inmune de las citocinas ya sean Th1 o Th2 van en caminos opuestos. (Nathan, 1991; Williams-Ashman, 1979).



Esquema 1.-Polarización de macrófagos. Bajo diferentes señales y sus funciones en el modelo murino (Mantovani, 2004)

Los mecanismos que un animal puede utilizar para resistir la enfermedad se dividen en mecanismos inmunes y no inmunes. Dentro de estos últimos, los macrófagos son considerados como uno de los elementos más importantes en este proceso. Diferentes estudios utilizando macrófagos de origen bovino han demostrado que la condición genética del ganado asociada a la resistencia natural a patógenos intracelulares es muy importante en el resultado final de la interacción microorganismo-huésped (Gutiérrez, 2003).

1.8.- Resistencia natural del ganado a patógenos intracelulares.

El termino resistencia natural a las enfermedades se refiere a “la capacidad heredable de un animal de evitar el desarrollo de una enfermedad cuando se expone al agente causal que la provoca, pero sin haber tenido previa exposición o haber sido inmunizado” (Hutt, 1958). Bajo estas condiciones se presenta una falta de susceptibilidad al proceso de enfermedad, aún si existe contacto entre el huésped y el agente infeccioso debido a que el agente patógeno no puede desarrollarse a causa de una incompatibilidad de tipo estructural o fisiológico con el huésped (Skamene, 1983).

Prueba de ello, son los resultados de algunos estudios que se han realizado en el modelo bovino; por ejemplo, Qureshi (1995) demostraron que los macrófagos de ganado **resistente** fueron significativamente superiores en el control del crecimiento intracelular de varios patógenos como *B. abortus*, *M. bovis* BCG, *Salmonella dublin* aunque no así para la especie *Salmonella typhimurium*, en comparación con macrófagos de animales **susceptibles**.

De acuerdo con los resultados de Qureshi, los criterios para realizar la clasificación de los animales en resistentes o en susceptibles a parásitos intracelulares bacterianos, se basan en la capacidad de los macrófagos para permitir el crecimiento bacteriano; cuando dicho crecimiento sea superior en un 65% se consideraran como susceptibles y los que logren reducir el crecimiento bacteriano a 65% o menos, se designarán como resistentes.

Al respecto, se han realizado estudios que evalúan el crecimiento intracelular de *M. bovis* virulento, multiplicación bacteriana e índice de fagocitosis en macrófagos derivados de monocitos provenientes de ganado genéticamente resistente y susceptible a parásitos intracelulares, a las 0 y 24 hrs. con una MOI de 10:1, donde se reportó que la proporción de fagocitosis bacteriana fue de 1.4 ± 0.17 y 2.1 ± 0.54 bacterias/macrófago, la multiplicación bacteriana fue de 165% y 263% en macrófagos de ganado resistente y susceptible, respectivamente. Mencionando

que los macrófagos de animales resistentes y susceptibles difieren en el control intracelular de la multiplicación de *M. bovis* (Gutiérrez-Pabello, 2003).

Por otra parte, Esquivel (2003) realizó un estudio de inducción de apoptosis en macrófagos en reposo y activados de animales resistentes y susceptibles desafiados con una cepa patógena (*M. bovis* 9926) y una cepa atenuada (*M. bovis* BCG) a una MOI de 10:1, donde se estudiaron las variables de condensación de cromatina y fragmentación del DNA. Los resultados de este estudio concluyen que los macrófagos de animales resistentes presentan mayor índice de apoptosis con ambas cepas de *M. bovis* que los macrófagos de animales susceptibles y que la cepa patógena induce mayor apoptosis que la cepa atenuada. Adicionalmente, se identificó que la activación clásica de los macrófagos incrementa el porcentaje de apoptosis conservando la misma relación descrita con células en reposo, lo cual sugiere que el fenómeno de apoptosis juega un papel importante en la patogenia de la tuberculosis.

Características de macrófagos, linfocitos T y respuesta a anticuerpos en ganado naturalmente resistente y susceptible a patógenos intracelulares. (Adams, 1998)

Características.	Naturalmente Resistente.	Naturalmente Susceptible.
Crecimiento intracelular in vitro	Restringido	Permisivo
% fusión fago-lisosomal	Incrementado	Reducido.
Producción de ROI	Alta	Baja
ON producido por LPS o INF- γ	Alta	Baja
Respuesta a anticuerpos	Masiva y prolongada	Mínima y de poca duración

2.- JUSTIFICACIÓN:

La importancia de la tuberculosis bovina radica en las pérdidas económicas que ocasiona a la ganadería, en el riesgo que representa para la salud pública y su papel como barrera no arancelaria para la exportación del ganado.

Aunque los métodos de alimentación y cría de los animales influyen sobre la variabilidad en la expresión de la enfermedad, ha podido observarse que la resistencia natural es hereditaria y se puede transmitir de un progenitor a su descendencia, por lo tanto, es importante generar información de como este fenotipo de resistencia natural pudiera ser modificada por el efecto de la activación alterna del macrófago o la relación que existe entre el fenotipo de resistencia y la presentación de una activación alterna por parte de los macrófagos.

Se sabe que los macrófagos de animales resistentes montan una mejor respuesta inmune contra la tuberculosis bovina ya que son capaces de disminuir la viabilidad de la micobacteria dentro de las células del hospedero debido a su capacidad de respuesta ante patógenos intracelulares, el propósito de este trabajo es conocer los eventos relacionados con el control de dicha infección, tales como es la producción de citocinas y quimiocinas, eventos celulares asociados a apoptosis como medida de control y la producción de mediadores solubles que disminuyan el crecimiento intracelular y por ende la diseminación de la micobacteria, lo anterior se estudiara bajo un esquema de activación alterna dado por efecto de la Interleucina-4 y como este tipo de activación podría modificar tales características.

De tal manera se considera importante generar información sobre este tipo de activación en el control de la infección, usando como modelo animal al bovino, ya que la información existente respecto a este tipo de activación es limitada y se desconocen los efectos, consecuencias y posible relación con la resistencia natural de los bovinos a los patógenos bacterianos intracelulares y los tipos de activación celular de los macrófagos.

3.- HIPOTESIS:

La activación alterna de los macrófagos disminuirá la capacidad microbicida, el proceso de muerte celular y la respuesta inflamatoria de macrófagos procedentes de donadores naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares.

4.- OBJETIVOS:

Objetivo general:

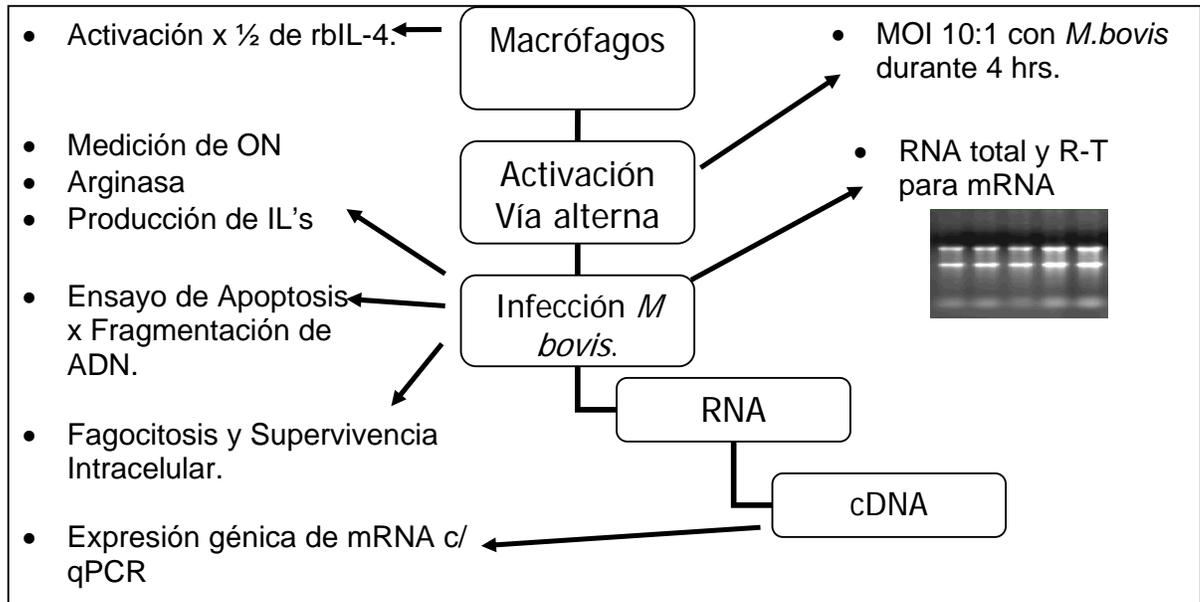
Identificar el efecto de la resistencia natural en la interacción de *Mycobacterium bovis* con macrófagos bovinos activados por la vía alterna.

Objetivos específicos:

- Inducir *in vitro* la activación alterna de macrófagos procedentes de bovinos por efecto del tratamiento con IL-4.
- Evaluar el efecto de la virulencia de *Mycobacterium bovis* en la expresión de citocinas a nivel de mRNA y proteína, en macrófagos procedentes de individuos resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares activados por la vía alterna.
- Identificar el índice de supervivencia intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos activados por vía alterna procedentes de donadores resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares.
- Identificar el índice de apoptosis inducida por *Mycobacterium bovis* en macrófagos activados por la vía alterna procedentes de individuos resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS:

Modelo Experimental.



Fases del modelo experimental y secuencia de los experimentos.

5.1.- Animales.

Para el presente estudio se seleccionaron bovinos sanos previamente clasificados como resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares (Vallecillo, 2003), utilizando los ensayos microbicidas propuestos por Qureshi (1996). Los animales cuyos macrófagos *in vitro* permitieron no más del 65% de supervivencia intracelular de *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Güerin) se clasificaron como **resistentes**, mientras que aquellos animales que sus macrófagos permitieron un porcentaje de supervivencia mayor al 65% fueron clasificados como **susceptibles**. Los animales provienen del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), un hato libre de tuberculosis (no expuesto, vacunado o desafiado) que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2.- Macrófagos Derivados de Monocitos de Bovino (MDMB).

La obtención de los MDMB, es una modificación del protocolo desarrollado por Campbell y Adams (1992). La sangre se colectó asépticamente por punción en la vena yugular, utilizando jeringas de 60 ml con 3.5 ml de anticoagulante ACD [75 mM de citrato trisódico, 41.6 mM de ácido cítrico y 135 mM de glucosa a un pH de 5.0] por cada 30 ml de sangre y se procesó durante las primeras 4 horas inmediatas a su colección.

La sangre completa se centrifugó durante 30 min a 1000 X g a temperatura ambiente (TA). Se apartó el plasma para hacer lavados y se recuperó la capa flogística. Esta capa se diluyó a una proporción de 1:1 con PBS-Citrato (PBS-C) [Cloruro de sodio 1.5 mM, Fosfato de sodio monobásico 9.1mM, Fosfato de sodio dibásico 1.25 mM, Ácido cítrico trisódico 12.5 mM, a un pH de 7.4]. Posteriormente, se depositó sobre un gradiente de Percoll (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) con una gravedad específica de 1.0770 a una proporción de 2:1 con el Percoll. Se centrifugó a 1000 X g durante 30 min a 4 °C y se colectó la interfase de leucocitos tratando de no tomar eritrocitos, ni cantidades excesivas de Percoll. Posteriormente se lavaron los leucocitos con PBS-C más 20% del plasma antes obtenido y se centrifugaron a 500 Xg durante 10 min a TA, conservando sólo el paquete celular, este lavado se repitió tres veces más para asegurar la eliminación del Percoll. El paquete celular fue resuspendido en 8 ml de medio CRPMI 1640 con suero autólogo al 4%. (Complete-Roswell Park Memorial Institute 1640) [L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, $C_3H_3O_3Na$ 1 mM y $NaHCO_3$ 20 mM] (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY. EUA), una vez esto, se transfirieron a matraces tipo Erlenmeyer recubiertos con Teflón (Nalgene, Thermo Fisher Scientific Inc USA.) para facilitar y asegurar la adherencia de los monocitos al fondo del matraz. Se incubaron por 18 a 24 hrs. en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio a los matraces con CRPMI suplementado con 10% de suero autólogo (CRPMI-10%) y el medio al 4% se colectó en un tubo Falcón y se centrifugó a 500 Xg por 10 min para recuperar las células que no se adhirieron al fondo del matraz y se colocaron en otro matraz con CRPMI-10%, se cultivaron de igual forma durante 12 a 14 días, tiempo en el cual se diferencian a macrófagos (Campell, 1992). Se realizaron

cambios de medio en un intervalo de 3 días, para asegurar el desarrollo de los macrófagos.

5.3.- Cosecha de los Macrófagos.

Se colocaron los matraces en un recipiente con hielo, hasta cubrir 2/3 partes de los matraces y en esta condición se dejaron por un lapso de 35 a 45 min. Una vez esto, los matraces se golpearon levemente para desprender las células. El contenido de los matraces se transfirió a un tubo de 50 ml. Se realizó el conteo de las células con un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se centrifugó el tubo a 500 X g por 10 min a temperatura ambiente. Al terminar la centrifugación, se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en medio CRPMI-10%, ajustando la concentración de células para obtener una concentración final de 1×10^6 células por ml de medio.

5.4.- Inducción de activación alterna por efecto de IL-4

Los macrófagos una vez cosechados en la forma antes descrita fueron depositados en cajas de cultivo celular de 25 cm² a una concentración de 3.5×10^6 células y tratados con una dosis de 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml de IL-4 recombinante bovina (rbIL-4) (R&D Systems 614 MacKinley place N.E. Minneapolis, MN 55413-2610) como inductor de activación alterna, otra alícuota de macrófagos fue incubada con LPS de *E. coli* 026:B6 (Sigma-Aldrich CO: St. Louis MO USA) a una concentración de 50 ng/ml, otro grupo fue tratado con IFN- γ recombinante bovino a una concentración de 100 ng/ml (R&D Systems 614 MacKinley place N.E. Minneapolis, MN 55413-2610) y finalmente otro grupo con las mismas características pero sin ningún tratamiento como testigo.

Todos los tratamientos se dejaron incubando durante 22 hrs. y al término se obtuvo sobrenadante del medio de cultivo para cuantificar la producción de óxido nítrico por medio de un kit comercial (Reactivo de Griess Promega) y arginasa (QuantiChrom arginase assay Kit Bioassays Systems).

5.5.- Cepas Bacterianas.

Se utilizaron 2 cepas bacterianas; *Mycobacterium bovis* BCG subcepa Danesa, donada amablemente por la Dra. Iris Estrada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, y *Mycobacterium bovis* 9926 que es una cepa de campo aislada de un bovino hembra, criollo, de 8 años de edad; sacrificado en septiembre de 1998, procedente de Acatic, Jalisco, México; el cual presentó lesiones compatibles con tuberculosis al examen *postmortem*.. De igual forma se utilizó una cepa de *M. bovis* BCG a la cual se le insertó la proteína verde fluorescente donada amablemente por el Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

5.6.- Preparación del inóculo.

Las cepas bacterianas se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H11 (Bacto[®] Mycobacteria 7H11 Agar, Difco Laboratorios, Detroit MI USA) con enriquecimiento OADC (BBL[™] Middlebrook OADC Enrichment, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA), cuando las colonias fueron visibles se tomaron 5 de ellas, las cuales fueron sembradas 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 en agitación constante a 100 r.p.m. El cultivo obtenido se transfirió a 270 ml de medio Middlebrook 7H9 con enriquecimiento OADC y 0.5 de Tween 80, y se incubó en las condiciones antes descritas.

Cuando los cultivos de cada una de las dos cepas seleccionadas, alcanzaron el periodo establecido para su colección, se centrifugaron a 2500 X g por 15 min. a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se suspendió y lavo dos veces en PBS (cloruro de sodio 1.5 mM, fosfato de sodio monobásico 9.1 mM, fosfato de sodio dibásico 1.25 mM) y se centrifugó en las condiciones antes descritas por 10 min. Después de retirado el sobrenadante, se suspendió en medio CRPMI (RPMI Medium 1640 Invitrogen[™] Corporation Grand Island, NY USA) complementado (aminoácidos esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM y bicarbonato de sodio NaHCO₃

20mM) más 15% de suero fetal bovino (Gibco™ Invitrogen Corporation Grand Island NY USA).

Para dispersar los agregados bacterianos, se pasó dos veces la suspensión de bacterias con una jeringa a través de una aguja 27G x 13 mm. La suspensión obtenida se transfirió en cantidades de 1 ml a tubos con capacidad de 1.5 ml, se guardaron por 12 hrs. a -20°C y posteriormente el lote de inóculos se almacenó a -80°C hasta su uso.

5.7.- Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

La concentración del inóculo bacteriano se determinó por medio del conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), de cada cepa se descongeló un tubo por incubación a 37°C y se le realizaron una serie de diluciones décuples seriadas de la suspensión bacteriana sembrándose por triplicado 100 µl de ésta, en placas de agar Middlebrook 7H11 enriquecido con 10% de OADC. Las placas se incubaron de tres a cuatro semanas a 37 °C. La cantidad de UFC se obtuvo por ml, aplicando la siguiente ecuación:

$$(UFC)(FD)(10) = \text{bacterias/ml}$$

En donde: *UFC* = unidades formadoras de colonias y *FD* = factor de dilución

5.8.- Infección de macrófagos.

Se realizaron diferentes infecciones de macrófagos para los diferentes experimentos.

- Infección para extracción de RNA para medición de transcritos y obtención de sobrenadante para detección de interleucinas, ON y arginasa.

Una alícuota de 3.5×10^6 macrófagos fueron infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 usando una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Posteriormente las cajas de cultivo (cajas de 25 cm²) conteniendo a las células, se centrifugaron a 200 x g por 10 min. e incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 4 h. Después de que transcurriera el tiempo necesario para la fagocitosis, las células se lavaron con PBS 1x para remover las bacterias extracelulares. Se utilizaron como controles, macrófagos sin infectar y sin estimular. Estos macrófagos fueron tratados de la misma manera para poder mantener comparaciones válidas. La obtención y la infección de los macrófagos se realizaron por triplicado de forma independiente.

- Infección para realización de ensayo bactericida y supervivencia intracelular.

En placas de Terasaky se colocaron por triplicado 10 μ l de una suspensión de macrófagos a una concentración de 1×10^4 células/pozo, el medio se retiró a cada uno de los pozos y fue sustituido por medio de cultivo celular conteniendo 10 ng/ml de rIL-4 durante 22 h, al término de este tiempo se volvió a sustituir el medio por medio de cultivo celular con una concentración de bacterias de 2×10^7 bacterias/ml. Se utilizó una MOI de 10:1 como control, se colocaron en un pozo sin células de cada una de las placas la misma cantidad de bacterias más 5 μ l de medio de cultivo celular. Este procedimiento se utilizó de forma similar para cada una de las cepas utilizadas, *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926.

- Infección para la detección de *M. bovis* BCG-GFP a nivel intracelular en macrófagos bovinos.

En placas de 24 pozos se colocaron por triplicado 200 μ l de una suspensión de macrófagos con una concentración 2×10^5 células/pozo sobre un cubreobjeto redondo, después de este tiempo el medio fue retirado de los pozos y sustituido por medio de cultivo celular conteniendo 10ng/ml de rIL-4, 50 μ g/ml de LPS y otro control de células sin tratamiento durante 22 hrs. , al término de este tiempo se volvió a sustituir el medio por medio de cultivo celular con una concentración de bacterias de 2×10^6 bacterias/ml de la cepa *M. bovis* BCG-GFP. Se utilizó una MOI de 10:1, se colocaron en un pozo solo células como control negativo de infección.

- Infección de macrófagos bovinos para la detección de Fragmentación de ADN asociada al proceso de apoptosis.

Una alícuota de 3.5×10^6 macrófagos fueron infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 usando una multiplicidad de Infección (MOI) de 10:1 en matraces de teflón conteniendo a las células, por 16 hrs. a 37 °C con 5% CO₂. Se utilizaron como controles, macrófagos sin infectar y sin estimular.

Al final de la incubación de 16 hrs. pi los macrófagos infectados con *M. bovis*, fueron lavados 2 veces con PBS para eliminar las bacterias extracelulares y fijados con 5 ml de paraformaldehído al 1% en PBS durante 30 min. a 4 °C, se cosecharon las células de la forma antes descrita, al igual que las células que se utilizaron como testigo.

5.9.- Tratamientos:

- 1.-NI (No infectados y No estimulados)
- 2.-Estimulados con IL-4
- 3.- IL-4 + *M.bovis* BCG
- 4.- IL-4 + *M.bovis* 9926.
- 5. - IL-4 + (IL-4+*M.bovis* BCG.)*
- 6.- IL-4 + (IL-4+*M.bovis* 9926.)*

* Los macrófagos fueron estimulados por 22 hrs. preinfección y el tratamiento se mantuvo durante la infección.

5.10.- Extracción de RNA.

Variación del método de paso simple (Chomczynski, 1993)

Se decantó el medio de cultivo (Caja de cultivo de 25 cm²), y se agregaron 3ml del reactivo de lisis celular TriPure¹. (Boehringer Mannheim) (1 ml de TriPure/10 cm²) homogenizándose con una pipeta de transferencia estéril, se depositó 1 ml del lisado en tres microtubos de 1.5 ml dejándose incubar durante 5 min. a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TriPure mezclándose vigorosamente y se dejó incubar de 5 a 15 min, se centrifugó la muestra a 12000 Xg durante 15 min; se transfirió la fase acuosa alrededor de 0.7 ml en cada uno de los microtubos nuevos, se agregaron 0.5 ml de isopropanol a la fase acuosa y se mezcló invirtiendo el tubo, se incubó por 5-10 min. a temperatura ambiente para permitir la precipitación y se volvió a centrifugar a 12000 X g durante 10 min a 4°C. Se observó la presencia de un botón blanco en el fondo del tubo al finalizar la centrifugación, se decantó el sobrenadante con cuidado de no perder la pastilla de RNA y se lavó con etanol al 75%, invirtiendo el tubo o mediante vórtex, se repitió una centrifugación a 7500 X g durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante eliminando el exceso de etanol y se dejó secar al aire, ya por último se resuspendió el pellet en agua libre de nucleasas, se dejó incubar la muestra a 60 °C durante 10-15 min y se cuantificó la pureza y

¹ **TriPure:** Guanidium Thiocinato para lisis de células, solubilización de sus componentes y desnaturalización de RNAsas endógenas simultáneamente.

concentración por espectrofotometría mediante el uso de nanodrop 1000, la muestra se mantuvo a -80 °C en alícuotas de 1-2 µg de RNA hasta su uso.

5.11.- Síntesis de ADN complementario (cDNA)

El ADN complementario (cDNA), fue sintetizado usando 4 U de enzima transcriptasa reversa Omniscript® (QIAGEN® Valencia, CA USA) en un volumen final de 20 µl conteniendo Buffer RT (1x), mezcla de dNTPs (0.5 mM cada uno), iniciador oligo-dT (1µM), templete de ARN (1µg) y agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen necesario. La mezcla fue incubada durante 60 min a 37 °C y la enzima inactivada a 95 °C durante 5 min. El volumen final se ajustó a 400 µl con agua libre de nucleasas y fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

5.12.- Cuantificación de mRNA de citocinas por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (q-PCR)

Para la detección de las citocinas se diseñaron los iniciadores específicos (ver tabla 1) y para el control interno en el programa IDT's PrimerQuestSM desarrollado por Whitehead Institute for Biomedical Research. El PCR en tiempo real se realizó en un equipo LyghtCycler 480 Roche usando SYBR® Green I (10,000X Cambrex Bio Science Rockland Inc USA) como sistema de detección. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl los cuales contenían SYBR® Green I (0.165X), Buffer PCR 1X (20 mM Tris-HCL pH 8.4 y 50 mM KCl), MgCl₂ (4 mM), dNTPs (200 µM cada uno), iniciadores (0.5 nM de cada uno), Platinum® Taq ADN polimerasa (1.25 U) (Invitrogen™ São Paulo, SP Brasil) y 5 µl del ADNc diluido. Se colocaron en placas ópticas de 96 pozos después de una activación de la enzima a 95°C por 10 min bajo las siguientes, extensión a 72°C por 40 s; al final de los 35 ciclos se dio una extensión de 5 min a 72°C. Finalizado el PCR, la temperatura fue incrementando de 60°C a 95°C para construir una curva de disociación. Se colocó una reacción control sin templete de cDNA (NTC) en cada placa y cada muestra se ejecutó por triplicado. Utilizando los siguientes juegos de iniciadores:

Sentido.	Antisentido.
G3PDH 5'-CAT GTT TGT GAT GGG CGT GAA CCA-3'	3'-TAA GTC CCT CCA CGA TGC CAA AGT-5'
Arginasa II 5'-ATG CAT TTG ACC CTA CAC TGG-3'	3'-AGG TCA GTC CCC CTA CAA CA-5',
Interleucina-1β: 5'-CTA GCC CAT GTG TGC TGA AG-3'	3'-CCA CTT CTC GGT TCA TTT CC-5'
Interleucina-6: 5'-GCC TGA GAG CTA TTC GGA TG-3'	3'-TGC CCA GGA ACT ACC ACA AT-5'
Interleucina 10: 5'-ACT CTG TTG CCT GGT CTT CC-3'	3'-GAC AGG GTG CTC GCA TCT-5'
Interleucina 12p40: 5'-TTG CTC TCA GCA GAG AAG GTC-3'	3'-CTG CCC TCC TGA CAC TCC-5'
Interleucina-18: 5'-CAC GTT TCC TCT CCT AAG AAG C-3'	3'-TAC TTG TTC TGC AGC CAT CTT T-5'
Oxido Nítrico Sintasa Inducible: 5'-CCA TGG AAC ATC CCA GGT A-3'	3'-GCA GGG CGT ACC ACT TGA-5'
Proteína Quimiotáctica de Macrófago-1: 5'-CCA GAT GCA ATT AAC TCC CAA G-3'	3'-GCA TGG AGA TCT TCT TAC TGT TGA-5'
Proteína Quimiotáctica de Macrófago-2: 5'-AAG CAG AAG TGG GTC CAG ACT-3'	3'-CTT CGG TGT TCG GGA CTT T-5'
Proteína inflamatoria de Macrófago-1: 5'- ACC ATT TGG CGC TGA CAC-3'	3'-CGA TTT TGC GAG AAA GCT G-5'
Proteína inflamatoria de Macrófago-3: 5'- GCA AGT CAG AAG CAA GCA ACT-3'	3'-TGG GGT GAA GTA TTC GTT CTG-5'
Factor Transformante de crecimiento-β: 5'- CCG AAC CTG TGT TGC TCT CT-3'	3'-CGT GCT GCT CCA CTT TTA ACT-5'
Factor de Necrosis Tumoral-α: 5'- GTG TGA AGC TGG AAG ACA ACC-3'	3'-CCC TGA AGA GGA CCT GTG AG-5'
Molécula señalizadora y act. de linfocitos 5'-AGG GGA CCA CGT GAC TTA CA-3'	3'-AGC TAT TGG TGG GAC TCA GC-5'
Receptor de manosa del macrófago 5'-GCT CAT GTC AAC TGC ATT CAA-3'	3'- GGT AAC AAG TCT TTG GAA TCT CCT-5'
Receptor scavenger 1 del macrófago 5'-TCT GTG AAG TTC GAT GCT CGC TCA-3'	3'- TTT CAG GAG CTG AGC TGC CAC TAT-5'
Receptor tipo Toll-2 5'- TCC ACG GAC TGT GGT ACA TGA AGA-3'	3'-GCT TAA AGG GAG GGT TGA AGT GCT-5'
Receptor tipo Toll-4 5'- TCA GAG TTT CCT GCA GTG GGT CAA-3'	3'-ACT AAG CAC TGG CAT GTC CTC CAT-5'

5.13.- Método de cuantificación.

Existen dos métodos para la cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real, cuantificación absoluta y cuantificación relativa. El método de cuantificación relativa fue el empleado en esta investigación, éste consiste en comparar el (threshold cycle o ciclo umbral) C_T de la muestra desconocida con una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestras provenientes de células no infectadas no estimuladas). Todas las cuantificaciones, también fueron normalizadas con un control endógeno, en este caso G3PDH, para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de ARN y la eficiencia de reacción en la transcripción reversa. Este método fue seleccionado debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido.

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

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

$$C_T \text{ de la muestra} - C_T \text{ G3PDH} = \Delta C_T.$$

$$\Delta C_T \text{ de la muestra} - \Delta C_T \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_T.$$

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

5.14.- Desarrollo del Ensayo Bactericida.

En placas de Terasaky se colocaron por triplicado 10 μ l de una suspensión de macrófagos con una concentración de 1×10^6 células por μ l, (1×10^6 células/pozo). Las cuales se incubaron por 12 hrs. a 37 °C, con humedad y 5% de CO₂; después de este tiempo el medio se retiró a cada uno de los pozos y fue sustituido por medio de cultivo celular con una concentración de bacterias de 2×10^7 bacterias/ml. Se utilizó una MOI de 10:1 como control, se colocaron en un pozo sin células de cada una de las placas la misma cantidad de bacterias más 5 μ l de medio de cultivo celular. Este procedimiento se realizó de forma similar para cada una de las cepas utilizadas, *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926. Las placas se incubaron por 4 hrs. en las condiciones antes mencionadas y antes de ser introducidas a la incubadora, se verificó que las gotas de agua colocadas en las esquinas no se hubieran secado. Mientras tanto se corroboró la concentración del inóculo utilizado. Se agregaron 5 μ l de la suspensión de bacterias a 195 μ l de PBS, a partir de ese tubo se realizó una serie de 3 diluciones décuples (1:10). 100 μ l 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 2-3 semanas a 37 °C. Una vez transcurridas la 4 hrs. de incubación 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 donde solo se colocan las cepas bacterianas. Los pozos se lavaron 5 veces con 10 μ l de medio de cultivo celular fresco. En los pozos de la caja se adicionaron 10 μ l de solución de lisis (Tween 20 al 0.5% (Sigma Chemical CO, St Luis MO USA)) y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 10 min. Mientras transcurrían los 10 min, del pozo donde solo hay bacterias, se tomaron éstas y se adicionaron a un tubo en el que previamente se colocaron 170 μ l de PBS, se realizaron dos lavados con medio de cultivo celular. A partir de este tubo se realizaron 3 diluciones décuples. De cada una de las diluciones se tomaron 100 μ l, los cuales fueron sembrados en placas de agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC, este volumen se dispersó por toda la superficie de la placa y se incubó por 2-3 semanas a 37 °C. Transcurridos los 10 min, de cada uno de los tres pozos se tomaron 10 μ l del lisado y se transfieren a tres tubos respectivamente, a cada tubo previamente se les había colocado 170 μ l de

PBS, de la misma forma que el control, se realizaron dos lavados con 10 μ l de medio de cultivo celular. Con el procedimiento antes descrito se realizaron dos series de diluciones décuples de cada pozo y se sembr  un volumen igual de cada una de las diluciones de los tres pozos en las en placas de agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC, las cuales e incubaron por el mismo periodo de tiempo. Transcurridas las 24 hrs. de incubación, de los pozos de células más bacterias, se tomó el medio y se adicionó a tres tubos en los cuales se había colocado un volumen de 160 μ l de PBS. Las células de estos pozos fueron lisadas con 10 μ l de la solución de lisis por un periodo de 10 min. Mientras tanto, se realizó 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 tiempo de lisis de las células, se recuperó el lisado de cada uno de los pozos y se adicionó a cada uno de los tres tubos respectivos en los que se había colocado con anterioridad el medio de cultivo celular. Se realizan dos lavados y la serie de dos diluciones decuples correspondientes a cada uno de los tres pozos. Se sembraron 100 μ l 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 hrs. postinfección, dado así para cada fenotipo entre Resistentes y Susceptibles.

5.15.- Detección intracelular de *M. bovis* BCG-GFP.

En placas de 24 pozos se colocaron por triplicado 200 μ l de una suspensión de macrófagos con una concentración de 1×10^6 células por μ l, (2×10^5 células/pozo) sobre un cubreobjeto redondo dentro de cada pozo. Las células se incubaron por 22 hrs. a 37 °C, con humedad y 5% de CO₂, después de este tiempo el medio se retiró de los pozos y fue sustituido por medio de cultivo celular conteniendo 10 ng/ml de rIL-4, 50 μ g/ml de LPS y otro control de células sin tratamiento durante 22 hrs, bajo las mismas condiciones de incubación, al término de este tiempo se volvió a sustituir el medio por medio de cultivo celular con una concentración de bacterias de 2×10^6 bacterias/ml de la cepa *M. bovis* BCG-GFP. Se utilizó una MOI de 10:1, se colocaron en un pozo solo células como control negativo de infección. Una vez transcurrido el tiempo de fagocitosis (4 hrs.) fueron lavados 2 veces con PBS 1x para eliminar las bacterias extracelulares y fijados con 2 ml de paraformaldehído al 1% en PBS durante 30 min a 4 °C. Una vez fijadas las células, se procedió a permeabilizar por medio de triton 1x y fueron lavadas 2 veces con PBS 1x; una vez esto, se procedió a hacer la tinción con yoduro de propidio como tinción de contraste por media hora cubriendo la placa de la luz, una vez transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados con PBS para eliminar el exceso de tinción y se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Vectashield. Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia a un aumento de 100x para poder visualizar las bacterias fluorescentes dentro del macrófago y se realizó el conteo de campos hasta completar 100 células por tratamiento, por cada uno de los animales.

5.16.- Detección de Apoptosis.

La detección de células en apoptosis se determinó mediante la fragmentación de una o ambas cadenas de ADN nuclear, efectuada por las enzimas ADNasas activadas durante la apoptosis, lo cual fue detectado con la técnica de TUNEL (**T**erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling). Los cortes en la posición 3'(OH) se marcan con nucleótidos conjugados con Bromo, adicionados mediante la acción específica de la enzima **N**ucleotidil **T**ransferasa **T**erminal (TdT). Posteriormente, los nucleótidos se revelaron con anticuerpos monoclonales anti-Bromo conjugados con Alexa Flúor 488.

Se usó un grupo control positivo de macrófagos en apoptosis inducida mediante el uso de camptotecina 20 µg/ml durante 16 hrs (Sigma, St Louis, MO) para facilitar la identificación de las características apoptóticas de las células bovinas (Gutiérrez-Pabello, 2002). Asimismo, se usó un grupo control negativo de células sin tratamiento, lo cual facilitó diferenciar las características morfológicas de tamaño y granularidad, así como identificar el límite de discriminación con respecto a las células apoptóticas. (Fig. 20)

5.17.- Fragmentación del ADN nuclear (FADN)

Una alícuota de 3.5×10^6 macrófagos fueron infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 usando una MOI de 10:1 en matraces de teflón conteniendo a las células, previamente estimulados por 22 hrs con rIL-4 a 37°C con 5% CO₂. Se utilizaron como controles, macrófagos sin infectar y sin estimular.

Al final de la infección por 16 hrs. fueron lavados 2 veces con PBS para eliminar las bacterias extracelulares y fijados con 5 ml de paraformaldehído al 1% en PBS durante 30 min. a 4 °C, se cosecharon las células de la forma antes descrita (35 minutos en hielo) y se depositaron en tubos de poliestireno de 12 x 75 mm (Falcon Test Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ EUA), al igual que las células que se utilizaron como testigo. Posteriormente, se conservaron en etanol al 70% por un mínimo de 12 hrs. a -20 °C y después fueron lavadas tres veces con PBS 1x. La técnica de TUNEL se realizó con el Kit comercial APO-BrdU (Pharmingen, San Diego, CA EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante y lo descrito por otros autores (Gutiérrez-Pabello, 2002; Esquivel, 2003). Se añadieron 50 µl de solución de marcaje de ADN (10µl de buffer de reacción, 0.75 µl de enzima TdT, 8µl de Bromo-dUTP's y 32.25 µl de agua destilada) y se incubaron a 37 °C durante 60 min en baño María agitando cada 15 min, se agregaron 500µl de buffer de enjuague al final de la incubación y se retiró el sobrenadante después de centrifugar a 300 Xg durante 5 min. Se repitió una vez más el lavado y se agregaron 100 µl de solución de anticuerpo (5 µl de anticuerpo anti-Bromo conjugado con Alexa Fluor 488 y 95 µl de buffer de enjuague) se incubó por 30 min. en la oscuridad a TA. Al final de la incubación se pasaron las células en un citómetro de flujo marca DB modelo FACS Canto II .y se analizaron los datos con el programa Software Flowjo 2.1.1 (Tree Star Inc. Oregon Corporation).

6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cada experimento se realizó por triplicado y de forma independiente, los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. Se utilizó la prueba de *t* de *student* como prueba paramétrica y ANOVA de dos colas como prueba no paramétrica seguida de la prueba estadística de *Bonferroni*.

7.- RESULTADOS.

7.1.- Los macrófagos bovinos de animales resistentes muestran mayor producción de Óxido Nítrico bajo el tratamiento con LPS.

La producción de óxido nítrico (ON) se midió como indicador de activación de los macrófagos. Diferentes monocapas de macrófagos se incubaron con 50 ng/ml de LPS para verificar la concentración in vitro antes descrita de activación de los macrófagos en forma clásica (Esquivel. 2003). Después de 22 hrs. de incubación con 50 ng/ml de LPS la concentración de óxido nítrico fue de 8.5 ± 0.5 nM de nitritos para las células resistentes y 5 ± 0.04 nM para los susceptibles mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.0001$). En consecuencia, se utilizó dicha concentración de 50 ng/ml de extracto puro de LPS, durante 22 hrs. de cultivo para dar el efecto de activación clásica de los macrófagos concordando con lo reportado por Esquivel (2003) (Fig. 1).

7.2.- La Interleucina-4 recombinante bovina disminuye la producción de ON en macrófagos bovinos

Una vez que se demostró que los macrófagos resistentes producían cantidades superiores de ON comparados con los susceptibles, se procedió a activarlos por la vía alterna mediante la incubación con Interleucina recombinante bovina (rbIL-4). La disminución en la producción de ON se utilizó como indicador de activación alterna de los macrófagos. Se tituló la concentración óptima de rbIL-4 que indujera este fenómeno. La incubación con rbIL-4 disminuyó un 20% la producción del ON en el caso de macrófagos estimulados con LPS y en un 33% en donde se combinó con el $\text{INF-}\gamma$ utilizado como inductor de activación clásica, siendo este efecto más evidente en macrófagos de animales resistentes comparados con el control negativo, lo cual evidenció la activación alterna de los macrófagos en una forma independiente al tipo de activador. Inicialmente, se utilizó una concentración de 50 ng/ml de rbIL-4 para verificar si existían diferencias en la producción de ON dadas por los diferentes tratamientos de los macrófagos (LPS, $\text{INF-}\gamma$ e rbIL-4) (Fig. 2 y 2b).

Una vez que se verificó que la rbIL-4 disminuía la producción de ON ($p \leq 0.0001$) se procedió a verificar cuál era la mejor concentración de rbIL-4 y que produjera el mismo efecto. La incubación con diferentes concentraciones de rbIL-4 a 10, 25, 50, 100 y 200 ng/ml a las 24 horas demostró que no había

diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas por lo que se seleccionó 10 ng/ml de rIL-4 como la concentración de trabajo (Fig.3).

Por otra parte, se midió la actividad de la enzima arginasa en los sobrenadantes de los macrófagos tratados con la rIL-4 para identificar su uso como marcador de activación alterna, sin embargo dicha producción (20 y 22 μ moles de L-arginina para macrófagos resistentes y susceptibles respectivamente) no mostró diferencias estadísticas, lo cual sugiere al menos en el modelo bovino no se podría considerar como un marcador específico de activación alterna como se ha mencionado en el modelo de ratón (Mantovanni. 2004) o bien que pudiera ser una enzima con actividad a largo plazo bajo las condiciones de activación alterna.

7.3.- La activación alterna del macrófago promueve la transcripción incrementada de receptores de superficie en macrófagos bovinos.

Se realizó la determinación en la expresión génica de receptores de superficie en los macrófagos, utilizando macrófagos incubados con rIL-4, LPS y células no tratadas, mediante PCR de tiempo real. En las células tratadas con rIL-4 la concentración del mRNA para el Receptor de Manosa del Macrófago (MMR), el Receptor Scavenger A del Macrófago (MSR-A), el Receptor Tipo Toll-2 (TLR-2) y el Receptor Tipo Toll -4 (TLR-4) se incrementó 650, 400, 40 y 65 veces respectivamente, comparados con las células no tratadas. Mientras que el incremento en células activadas por la vía clásica fue de 4,1, 1 y 3 veces para los mismos receptores (Fig. 4). Por lo tanto, se sugiere que los macrófagos activados de forma alterna muestran un patrón diferencial en la expresión génica de receptores en comparación con macrófagos activados de forma clásica, siendo los animales resistentes quienes muestran una mayor expresión sobre los susceptibles (Fig. 4b y 4c). Por otra parte, es importante mencionar que el tratamiento con rIL-4, indujo la fusión de macrófagos con hasta 7-10 núcleos por célula, tanto en macrófagos de animales resistentes como susceptibles bajo las mismas condiciones de activación (Fig. 5).

7.4.- La infección con *M. bovis* no rescata la producción de ON ni modifica la concentración de arginasa bajo condiciones de activación alterna.

Se procedió a medir la producción de ON y arginasa en el sobrenadante del medio de cultivo de los macrófagos desafiados con las cepas de *M. bovis* BCG

y *M. bovis* 9926 previamente incubadas con rIL-4. El tratamiento con rIL-4 disminuyó la producción de ON en macrófagos infectados con *M. bovis*, aunque el fenotipo de resistencia influyó en la concentración dando lugar a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.0083$) entre fenotipos; sin embargo, no mostró diferencias entre tratamientos, adicionalmente se observó que los macrófagos de animales susceptibles no respondieron al estímulo de activación alterna de la misma manera que los macrófagos de animales resistentes pues en estos últimos se presentó una clara disminución en la producción de ON. (Fig. 6)

En el caso de la producción arginasa no se observaron diferencias significativas inducidas por rIL-4 y la infección por *M. bovis* en forma general; sin embargo, en el caso del tratamiento donde se mantuvo la estimulación y se desafío con la cepa de *M. bovis* 9926 encontraron diferencias significativas en comparación con las células control ($p \leq 0.0003$) (Fig. 7).

7.5.- La activación alterna del macrófago disminuye la expresión génica de citocinas proinflamatorias en macrófagos infectados con *M. bovis*.

A nivel de mRNA se observó una disminución en la expresión génica de todas las citocinas y quimiocinas en comparación con macrófagos activados de forma clásica, siendo este efecto más evidente en los macrófagos de animales resistentes.

En los macrófagos de animales resistentes estimulados con rIL-4 y desafiados con *M. bovis* se observó un aumento en la expresión de todas las citocinas pro-inflamatorias y una disminución en las quimiocinas, en comparación con el tratamiento donde solo se estimuló con la rIL-4. En el caso de SLAM y la IL-10 no sufrieron cambios por efecto de la presencia de la micobacteria, dichos valores se mantuvieron por debajo de los niveles dados solo por la estimulación con rIL-4, un dato interesante es que la IL-4 por sí misma no promueve la expresión de la IL-12p40, pero al enfrentar al macrófago con la cepa de *M. bovis* 9926 ésta tuvo un aumento de 150 veces más, de igual manera para MIP-3 con el mismo número de veces sugiriendo que dichas moléculas son dependientes de la presencia de la micobacteria.

En el tratamiento donde se mantuvo la estimulación de los macrófagos con la rIL-4 más la cepa de *M. bovis* BCG todas las citocinas pro-inflamatorias

aumentaron su expresión, mientras que todas las quimiocinas, arginasa, IL-6 e IL-18 disminuyeron. Bajo las mismas condiciones pero con la cepa virulenta se observó un aumento en todas las citocinas incluyendo a la IL-12p40, así como en las quimiocinas, algunas citocinas como IL-1b e IL12p40 parecen tener una mayor expresión por efecto de la virulencia ya que su expresión es superior en comparación con la cepa *M. bovis* BCG. Cuando estos resultados son comparados con la vía clásica de activación sugieren que la presencia de la rIL-4 tiene un efecto modificador de las capacidades de los macrófagos de animales resistentes principalmente, disminuyendo la capacidad de producir un efecto pro-inflamatorio, siendo dicho efecto más evidente al mantener la estimulación con rIL-4 (Fig. 8 y Tabla 2).

7.6.- La expresión de IL-1b, TNF- α y MIP-1 es superior en macrófagos de animales susceptibles por la presencia de la micobacteria y no por efecto de la IL-4.

En macrófagos de bovinos susceptibles la estimulación con la rIL-4 no tuvo efecto significativo sobre la expresión de los mensajeros de IL-1b, TNF- α y MIP-1, ya que sólo se observó el aumento al ser desafiados con la micobacteria, por ejemplo la IL-1b aumenta en presencia de *M. bovis* BCG, pero al mantener la estimulación disminuye, caso contrario al TNF- α el cual aumenta hasta 12 veces al mantener la estimulación en presencia de la bacteria, estas citocinas muestran un efecto totalmente opuesto en presencia de la cepa virulenta, es decir, IL-1b y TNF- α aumentan al solo estimular de forma simple, pero al mantener la estimulación la expresión de TNF- α disminuye, en el caso de MIP-1 muestra una expresión alta con la rIL-4 disminuyendo en presencia de *M. bovis* BCG, la expresión de la molécula SLAM pareciera no ser influenciada por el efecto del fenotipo animal o por el efecto de virulencia. (Fig. 9 y Tabla 2)

Estos datos muestran una tendencia en el comportamiento de macrófagos procedentes de animales susceptibles, ya que al igual que en la producción de ON, no se ven afectados por la presencia de la rIL-4 o de la micobacteria, lo cual podría sugerir una respuesta inferior hacia estímulos exteriores; en base a los resultados anteriores (arginasa, producción de ON y expresión de citocinas pro-inflamatorias)

7.7.- Los macrófagos de animales resistentes muestran una mayor expresión de citocinas y quimiocinas bajo el efecto de activación alterada por la rblL-4.

Al incubar macrófagos procedentes de animales resistentes con rblL-4 se pudo observar que muestran una mayor expresión de todas las citocinas y quimiocinas a excepción de SLAM, en la cual no hay diferencias entre fenotipos. Otro caso es la expresión de la enzima arginasa la cual en macrófagos de animales resistentes muestra una expresión de 15 veces mayor en comparación con macrófagos de animales susceptibles. Las citocinas tales como IL-1b, IL-10 e IL-12p40 parecen no ser dependientes del tipo de activación o del fenotipo animal, sino a la presencia de la micobacteria, ya que no se observaron diferencias dependientes del efecto individual de la rblL-4 (Fig. 10-14 y tabla 2).

7.8.- La estimulación sostenida con rblL-4 disminuye el índice fagocítico en macrófagos de animales resistentes.

La incubación corta con rblL-4 mostró un aumento en el índice fagocítico en ambos fenotipos y con ambas cepas, siendo este aumento más significativo en macrófagos de animales resistentes ($p \leq 0.05$), la virulencia de la cepa jugó un papel importante en la fagocitosis dado que la cepa virulenta indujo un mayor índice fagocítico; sin embargo el índice se vió afectado en aquellos tratamientos donde la incubación con rblL-4 se mantuvo hasta el final del experimento, reduciendo los niveles de fagocitosis en ambos fenotipos aún con ambas cepas, siendo este efecto más evidente con la cepa de *M. bovis* 9926. Se observaron diferencias estadísticas con un valor de $p \leq 0.05$ en los tratamientos donde se preestimuló con la rblL-4 en animales resistentes (Fig. 16).

Para comprobar el efecto de rblL-4 se utilizó *M. bovis* BCG conteniendo el inserto de la proteína verde fluorescente (BCG-GFP) lo cual permitió localizar a las bacterias intracelulares, se contaron 100 macrófagos por cada tipo de activación y un control sin estímulo de cada uno de los animales, observando que en los macrófagos sin ningún tratamiento y desafiados con la BCG-GFP, no mostraron diferencias estadísticas entre los rangos de bacterias localizadas intracelularmente (0, 0-5, 5-10, 10-20 y más de 20 bacterias) ni entre

tratamientos, aunque se observó un porcentaje del 32% de macrófagos con 5-10 bacterias y el mismo porcentaje con más de 20 bacterias intracelulares, de igual forma sin diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos (Fig. 16a y 16b).

En el tratamiento donde se estimuló por vía alterna, se observó una disminución del 13% para el rango de 10-20 bacterias y un 20% en el rango de más de 20 bacterias en macrófagos de animales resistentes y un 10% en susceptibles en el mismo rango con respecto al tratamiento anterior mostrando este rango (> a 20 bacterias) diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Bajo el esquema de activación clásica, se observó un aumento del 10% en animales susceptibles con respecto al tratamiento sin estimulación, sin diferencias en resistentes en el rango de > de 20 bacterias y una disminución del 7 y 8% en el rango de 10-20 bacterias para resistentes y susceptibles respectivamente; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre fenotipos, en los casos donde los macrófagos contenían menos de 10 bacterias (0, 0-5 y 5-10) no se observaron diferencias entre tipos de activación, a excepción del tratamiento con rIL-4, donde se observó un porcentaje del 20% de macrófagos resistentes sin bacterias intracelulares; esto es, un 15% más con respecto a los demás tratamientos.

7.9.- La estimulación sostenida con rIL-4 mejora el control de la replicación de *M. bovis* por macrófagos de animales susceptibles.

La tasa de supervivencia intracelular mostró un mejor control en la proliferación intracelular por parte de los animales resistentes sobre los susceptibles en aquellos tratamientos donde sólo se preestimuló con la rIL-4 bajo el desafío con ambas cepas; sin embargo, al mantener la estimulación con rIL-4, los macrófagos de animales resistentes disminuyeron su capacidad microbicida, de tal manera que la proliferación intracelular de *M. bovis* BCG fue similar entre ambos fenotipos con un 80% de supervivencia intracelular sin diferencias estadísticas. En el caso de los macrófagos infectados con la cepa de *M. bovis* 9926 los niveles de supervivencia intracelular por parte de la bacteria fueron inferiores al 85% en comparación con los macrófagos de animales resistentes los cuales mostraron una permisividad del 130%, este dato nos sugiere una modificación en las capacidades microbicidas de los macrófagos bajo

condiciones de activación alterna; no obstante, al realizar el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, aunque en el tratamiento donde se preestimuló con rIL-4 y se desafió con *M. bovis* BCG se lograron observar diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Asimismo, el fenotipo de resistencia mostró un tener efecto a nivel de supervivencia intracelular de manera estadísticamente significativa, no así el efecto que pudiera tener el tratamiento; es decir, que los macrófagos de animales resistentes mostraron un mejor control intracelular cuando fueron estimulados con la rIL-4, ahora bien al mantener la estimulación con la rIL-4 durante el desafío con la cepa virulenta, dicho fenotipo pareciera ser modificado ya que los animales susceptibles, mostraron un mejor control del crecimiento intracelular en comparación con los macrófagos de animales resistentes, pero sin manifestarse diferencias estadísticas significativas entre los fenotipos (Fig. 17).

7.10.- El fenotipo de resistencia y susceptibilidad juega un papel determinante en la inducción de apoptosis en macrófagos bovinos activados por la vía alterna e infectados con *M. bovis*.

Antes de realizar el desafío con la micobacteria se realizó la estandarización del método de la técnica de TUNEL para verificar las diferencias entre macrófagos bovinos con cambios asociados a apoptosis y macrófagos en reposo para lo cual se utilizaron como controles, macrófagos sin infectar y sin estimular, macrófagos con inducción de apoptosis por medio de camptotecina y un control de macrófagos para medir la autofluorescencia (Fig. 20)

El desafío con *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926 a una MOI de 10:1, indujo la fragmentación de ADN (FADN) de las poblaciones de macrófagos susceptibles y resistentes. Cabe destacar que en los macrófagos infectados, se presentó la FADN tanto en macrófagos con bacilos localizados intracelularmente, como en macrófagos sin bacilos aparentes. Además, el número de macrófagos con FADN fue mayor en los estimulados con rIL-4 e infectados que en los macrófagos testigo sin desafiar.

En animales susceptibles se observó un índice de apoptosis basal del 3% con un ligero aumento por efecto de la rIL-4 (6%), observándose que el desafío con la micobacteria aumenta esta fragmentación a niveles de 20-25% siendo independiente de la virulencia de la cepa y del tratamiento, ya que los niveles de apoptosis observados fueron similares sin diferencia estadística entre

tratamientos pero sí mostrando diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.001$) y al tratamiento con rblL-4 ($p \leq 0.003$) (Fig. 18).

En macrófagos de animales resistentes sin ningún tratamiento se observó un porcentaje de macrófagos con FADN del 9%, mientras que macrófagos bajo el tratamiento con rblL-4 se observó un aumento significativo ($p \leq 0.0002$) en el porcentaje de FADN y aquellos macrófagos que recibieron el pre-estímulo y se desafiaron tanto con la cepa de *M. bovis* BCG y la cepa *M. bovis* 9926 se observó aumento ($p \leq 0.0002$). Al mantener la estimulación en los macrófagos con la rblL-4 y al ser desafiados con *M. bovis* BCG, el porcentaje de FADN bajó a niveles similares a los del control ($p \leq 0.015$) mostrando diferencias estadísticas con respecto a los demás tratamientos donde se involucró la micobacteria, al desafiar con la cepa virulenta este porcentaje aumentó significativamente con respecto al control ($p \leq 0.0002$) y con la cepa *M. bovis* BCG ($p \leq 0.002$). De igual manera se observó que los macrófagos de animales resistentes presentan una FADN basal superior en macrófagos no estimulados no infectados en comparación con macrófagos de animales susceptibles ($p \leq 0.002$) (Fig.19).

8.- DISCUSIÓN

La respuesta a microorganismos patógenos por parte del hospedero está dada por complejos mecanismos de defensa. Estos incluyen mecanismos físicos e inespecíficos con la participación de células fagocíticas. La producción de ON, citocinas, quimiocinas y la apoptosis se ha observado en el curso de infecciones por micobacterias y por agentes infecciosos en células mononucleares. En este estudio se analizó la expresión génica de citocinas y quimiocinas, índice de fagocitosis, supervivencia intracelular así como la apoptosis en macrófagos bovinos derivados de monocitos e infectados por *Mycobacterium bovis* bajo un esquema de activación alterna. Se buscó una asociación entre el fenotipo de resistencia natural a la infección del hospedero y la respuesta hacia la micobacteria, involucrando la virulencia de la bacteria y el efecto del tipo de activación del macrófago como célula blanco de la infección.

Se sabe que el macrófago puede adoptar un fenotipo de activación alterna así como de activación clásica bajo condiciones naturales dependiendo el tipo de célula presentadora de antígeno que se trate, influyendo entre otros factores el ambiente de las citocinas que se esté dando en el momento de la infección, dicho fenotipo de activación puede estar siendo afectado por el tipo de antígeno o patógeno, la regulación mediada por citocinas a partir de células T diferenciadas, la concentración del antígeno y la afinidad por el receptor de la célula T y el nivel de señales co-estimuladoras liberadas por la interacción de la célula presentadora de antígeno y el linfocito T, que como consecuencia resultará en la regulación mediada por el sistema inmune.

La importancia del tipo de activación del macrófago radica en que de ella dependerá el tipo de respuesta que se montará ante la infección, por una parte una activación clásica proveerá de una respuesta netamente pro-inflamatoria con la producción de citocinas del tipo Th1 encaminadas a la activación del sistema inmune para eliminar o controlar la infección y por otro lado se podría dar una respuesta de activación alterna con citocinas del tipo Th2, la cual estará encaminada a la reparación de tejido, delimitación del daño causado por

la respuesta inflamatoria, adicionalmente algunos autores han mencionado que puede actuar en la contención de la infección ya proporciona un mayor soporte a los granulomas ya formados.

Aunque no se conoce a ciencia cierta la función de algunos genes que regulan esta polarización en el macrófago debido a que las investigaciones están más orientadas a la diferenciación a nivel de linfocitos, se podría hipotetizar que dichos genes actúan de manera similar tanto en el linfocito, como en el macrófago. En primer lugar va a depender del estímulo que se dé a la célula presentadora de antígeno, por un lado un estímulo dado por el $\text{INF-}\gamma$, la IL-12 o por LPS y por otro lado un estímulo derivado de la IL-4 o IL-13.

De este tipo de estímulos van a depender los factores transcripcionales que regulen la señalización intracelular y por lo tanto los genes que se transcriban modificando el fenotipo que adoptara el macrófago. Por un lado la activación clásica influenciada por el efecto de la IL-12 mediante la activación de *stat4*, que a su vez activara la producción de $\text{INF-}\gamma$ el cual induce a través de la vía de *stat1* para activar al factor de activación *t-bet* que se asocia con el factor de transcripción HLX, para incrementar la expresión de $\text{INF-}\gamma$ y de la subunidad $\beta 2$ del receptor de IL-12. A su vez el ON también induce esta diferenciación ya que estimula la expresión de IL-12R $\beta 2$ el cual favorece la producción de IL-12 y por lo tanto la expresión de *t-bet* formándose una retroalimentación positiva, desencadenando la subsecuente translocación del factor nuclear $\kappa\beta$ al núcleo y finalmente la activación de genes pro-inflamatorios.

Una activación alterna está dada por la señalización vía *stat6* activando al factor regulador 4 del $\text{INF-}\gamma$ (IRF4), dichos factores regulan la expresión del factor *GATA-3* que es indispensable para promover cambios a nivel de la cromatina y la subsecuente activación de factores nucleares como es *c-MAF* y *NFAT1*. (Lohoff, 2005; Glimcher, 2000; Van Ginderachter, 2006). Dichos eventos sugieren que en el macrófago se da una regulación transcripcional similar al dado por el efecto de las citocinas que estimulan al macrófago, ya

que dependiendo del estímulo será el fenotipo celular que desencadenará el macrófago.

El primer paso en esta investigación fue inducir el efecto de la activación alterna en los macrófagos; esto se logró por medio de la rIL-4 utilizando como marcador de activación la producción de ON en el sobrenadante de las células en monocapas. Diferentes estudios han reportado la competencia por la *L-arginina* entre la enzima iNOS y la enzima arginasa disminuyendo en una activación alterna la producción del ON y la expresión de receptores de superficie celular como el MMR y el MSR (Moosser, 2003; Gordon, 1999; Mantovanni, 2004; Goerdts, 1999).

La incubación con rIL-4 disminuyó a nivel basal la producción de ON inducida por el LPS bacteriano de igual forma sucedió al utilizar el rINF- γ y la combinación del LPS con el rINF- γ , este efecto de antemano se esperaba por la competencia que hay por el sustrato que utiliza el macrófago entre la enzima arginasa y la oxido nítrico sintetasa inducible en este caso la *L-arginina*, dado que dicho sustrato es utilizado por ambas enzimas. En el caso de la activación alterna dicho sustrato es requerido para la producción de poliaminas y prolina como precursor de colágena, así como la producción de proteínas de matriz extracelular como es MMP-9, MMP12, β IG-H3 las cuales están relacionadas con eventos de reparación celular y formación de tejido de reparación. Por otra parte en la activación clásica, la iNOS utiliza el mismo sustrato para la formación de ON, el cual es de suma importancia en la eliminación de patógenos intracelulares y la promoción de una respuesta inmune de tipo Th1.

A nivel *in vitro* el efecto de la rIL-4 se observó como la formación de células gigantes multinucleadas por el efecto de la estimulación con la rIL-4 y en macrófagos bajo condiciones de infección logrando observar la misma fusión de macrófagos aunque en condiciones de infección adicionalmente se logró observar un gran número de bacterias fluorescentes contenidas en este tipo de células multinucleadas.

Por otra parte, se verificó la expresión génica de los receptores de superficie como fue el receptor de Manosa, Scavenger A, receptores tipo Toll-2 y Toll-4.

Los cuatro receptores mostraron una alta expresión por efecto de la rIL-4, el incremento de los 2 primeros se esperaba ya que la expresión de estos receptores se ha postulado como una de las características de la activación alterna tanto en el modelo de ratón así como en el de humano, adicionalmente se conocen genes que han sido postulados como marcadores de activación alterna, ya bien establecidos en el modelo murino tal es el caso de *Ym1* y *Fizz1*, (Mantovanni, 2004). En nuestro trabajo intentamos comprobar la presencia de dichos genes, haciendo una búsqueda de las secuencias por medio de homologías entre estos dos modelos y diseñando iniciadores específicos para estos genes, sin lograr observar expresión de algunos de estos, adicionalmente se realizó la cuantificación en cuanto a expresión de genes que creíamos específicos para activación clásica intentando hacer una diferenciación en el tipo de activación basándonos en los receptores de superficie, tal es el caso de receptores tipo Toll cuya expresión se ha asociado a la activación clásica de los macrófagos, sin embargo, nuestros resultados no nos permitieron asociar este par de genes a un tipo de activación clásica, al menos bajo nuestros tratamientos de activación ya que su expresión se vio favorecida también bajo un esquema de activación alterna.

Un aumento en la producción de arginasa también se ha reconocido como un indicador de activación alterna en el modelo murino, no obstante, bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación no se encontraron cambios en la concentración de dicha enzima. Esto podría deberse a la poca duración de nuestros experimentos, la baja concentración de ésta en el sobrenadante o al método de detección (Kit comercial), aunque a nivel de transcritos se encontraron diferencias a nivel de expresión de dicha enzima bajo el esquema de activación alterna con diferencias entre los fenotipos con un promedio de 12 veces mas expresión en macrófagos de animales resistentes sobre macrófagos de animales susceptibles aunque esto sólo a nivel de expresión de mRNA. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que en el modelo bovino la producción de arginasa no podría ser considerada como marcador específico de activación alterna o al menos a nivel de proteína.

En cuanto a la expresión de citocinas se manifestó la formación de patrones expresados por el puro efecto de la estimulación con rIL-4, tal es el caso de la ARG II, MIP-1 y MCP-1 en ambos fenotipos, que en animales resistentes la expresión fue superior en comparación a los susceptibles. En cuanto a la expresión de otros patrones, se observó que el efecto dado por la presencia de la micobacteria aumentó la expresión de citocinas pro-inflamatorias, donde se preestimuló y se enfrentó a *M. bovis* BCG se produjo una alta expresión de IL-1b, TNF- α e iNOS, expresándose las mismas citocinas con la cepa de *M. bovis* 9926, siendo menor esta expresión en animales resistentes con respecto a lo mostrados por animales susceptibles.

Esto sugiere que los macrófagos de los animales resistentes montan una mejor respuesta ante diferentes estímulos, en este caso activación alterna o clásica, basándonos en resultados anteriores (Aranday, comunicación personal) donde se ha logrado observar que cuando se les estimula de forma clásica la expresión es mayor en macrófagos de animales resistentes, y que bajo condiciones de activación alterna no se muestra una expresión de las proteínas inflamatorias del macrófago (MIP-1 y MIP-3) e IL-12p40 las cuales solo se observan en presencia de la cepa virulenta no así para la cepa de *M. bovis* BCG sugiriendo que dicha expresión podría depender de factores de virulencia que solo están en la cepa de *M. bovis* 9926 o que dicha virulencia favorece una respuesta inmune del tipo pro-inflamatorio.

También se logró observar una disminución en la expresión de todas las citocinas y quimiocinas asociadas a procesos inflamatorios donde se mantuvo la estimulación con la rIL-4, los macrófagos infectados con la cepa virulenta aumentaron la expresión del TNF- α , IL-1b, iNOS y de manera específica la IL-12p40, siendo estos procesos más significativos en animales resistentes que en susceptibles. Estos datos obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Aldwell (1996) donde muestran diferencias en la expresión relacionada a la virulencia de la cepa utilizada siendo que la IL-1, TNF- α e IL-6 se expresan solo con cepas vivas mientras que la cepa virulenta aumenta esta expresión en comparación con la cepa de *M. bovis* BCG, sin diferencias en la supervivencia entre cepas a las 24 horas de infección aunque a las 72 y 96

horas la cepa virulenta muestra una mayor replicación intracelular, evaluando la viabilidad del macrófago sin encontrar diferencias entre cepas ni entre MOI's a las 24 hrs pi.

Estos resultados parecieran apoyar los obtenidos en el presente trabajo donde observamos que bajo el tipo de activación alterna las diferencias en cuanto a expresión, supervivencia intracelular y apoptosis a tiempos tempranos de infección no son tan evidentes como los mostrados por otros autores (Aldwell, 1996), dichos resultados sugieren que muchos de los eventos que estudiamos no muestran resultados significativos a tiempos tempranos dado que en el presente trabajo se manejaron tiempos máximos de 24 horas de infección, siendo que posiblemente no se dio el tiempo suficiente para evidenciar dichos eventos, aun así, se mantienen las diferencias entre fenotipos y el mantener la estimulación aumenta dichos mecanismos.

Otros autores ya han mencionado de igual manera que las cepas virulentas aumentan la expresión de citocinas y quimiocinas aunque no mencionan diferencias en cuanto al tipo de activación o fenotipo de resistencia. Wedlock (2006) menciona que las cepas virulentas manifiestan una replicación intracelular superior a la cepa BCG y que la regulación a nivel de citocinas es diferente entre rumiantes y otros modelos como el murino y en el humano.

Un ejemplo de regulación a nivel de citocinas y su interacción en los macrófagos bajo un desafío con *M. bovis*, se observa en el trabajo de Boddu-Jasmine quienes a diferentes MOI's mencionan que citocinas como $INF-\gamma$ y $TNF-\alpha$ aumentan el nivel de expresión de forma MOI dependiente, aunque otras como IL-4 e IL-10 también aumentan y en esa medida los niveles de $TNF-\alpha$ disminuyen, al ser controlados por las citocinas anti-inflamatorias. (Boddu-Jasmine, 2008).

En el presente trabajo no fue posible determinar ese efecto ya que las diferencias dadas por el fenotipo de resistencia fueron muy evidentes, lo cual muestra que de alguna manera el fenotipo modifica la regulación entre citocinas, ya que citocinas que actúan como anti-inflamatorias en el modelo murino no parecieran funcionar de igual forma en el bovino. Por otro lado algunos autores han demostrado que en los macrófagos pre-estimulados con

antígenos específicos de la micobacteria en especial las proteínas de secreción ESAT-6 y CFP-10 muestran una respuesta inmune más específica, es decir, un efecto inflamatorio específico dado por la estimulación con dichas proteínas y que los niveles de citocinas expresados bajo este esquema son menores en comparación con los observados donde se pre-estimula con el PPD bovino el cual contiene un gran número de péptidos que desencadenan una respuesta inespecífica, mencionando que los niveles de TNF- α , iNOS e IL-10 son superiores cuando se enfrentan al PPD-B bajo un esquema de vacunación *in vivo*, sugiriendo que dichos niveles de expresión aumentan en etapas tardías de infección.

Los resultados mostrados por estos autores difieren a los nuestros basados en el hecho de que fue llevado a cabo estimulando con fracciones proteicas, las cuales no estimulan una respuesta inmune como se observaría en presencia de la micobacteria completa o que algunos componentes celulares de la bacteria podrían modificar o manipular al macrófago, por lo tanto, el mecanismo de acción es diferente, resultando en una expresión a nivel de citocinas diferente en comparación con nuestro trabajo, el cual se llevo a cabo a tiempos tempranos de infección bajo condiciones *in vitro* y con bacterias vivas.

Thacker *et al*, mencionan que en los bovinos no infectados, las citocinas como IFN- γ , iNOS, TNF- α , IL-10 y MIP-1 presentan una expresión génica inferior que en aquellos bovinos que fueron desafiados sin pre-estimulación, mostrando una clara patología asociada a la infección, mientras que animales no infectados muestran una expresión mayor de IL-4 con una patología menor, lo cual de alguna forma apoya la hipótesis de que la IL-4 podría actuar como mediador de la respuesta inflamatoria disminuyendo la severidad de la respuesta inmune hacia la micobacteria, esta hipótesis podría ajustarse a lo mostrado en nuestros resultados ya que al estimular con la rIL-4 los niveles de citocinas inflamatorias y producción de ON fueron disminuidos en gran medida (Thacker, 2007).

Otros autores utilizan macrófagos de animales estimulados previamente con *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) y desafiados con

Mycobacterium avium los cuales muestran una menor expresión de citocinas inflamatorias como $\text{INF-}\gamma$, IL-1 α e IL-6, mientras que al ser solo desafiados con *M. avium avium* aumentan la expresión de $\text{INF-}\gamma$, IL-6, IL-8 e IL-10 sugiriendo que la presencia de la micobacteria disminuye la expresión de citocinas Th1, aumentando así la expresión de IL-10 como citocina anti-inflamatoria (Coussens, 2004); tales resultados están relacionados con nuestra investigación ya que al estimular con la rIL-4, la expresión de citocinas inflamatorias disminuye de manera significativa, aunque al estar en contacto con la cepa virulenta aumenta la expresión y en menor medida en presencia de *M. bovis* BCG.

Un estudio donde trabajan con bovinos de la raza Nelore y fenotipo de resistencia y susceptibilidad en base al nivel de nemátodos o huevos del nemátodo eliminados en heces, muestran una mayor expresión de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 por parte de animales resistentes mientras que los animales susceptibles una mayor expresión de citocinas Th1 como IL-2, IL-12p35, $\text{INF-}\gamma$ y MIP-1, concluyendo que la respuesta inmune contra el parásito podría estar dado en animales resistentes por una respuesta Th2 y en susceptibles por una respuesta Th1 (Bricarello, 2008).

Por otra parte en el presente trabajo pudimos observar que los macrófagos de animales resistentes muestran un porcentaje basal de FADN sin presencia de estimulación o de la micobacteria mayor a los susceptibles y que en macrófagos con este fenotipo de susceptibilidad la presencia de la micobacteria induce los eventos de muerte celular en los macrófagos de bovinos susceptibles, ya que la presencia de la micobacteria desencadena la apoptosis en niveles similares entre tratamientos siendo independiente a la virulencia de la cepa; siendo que en animales susceptibles se observo un porcentaje de apoptosis entre el 20 al 25% en aquellos tratamientos donde estuvo involucrada la micobacteria y un 6% por efecto de la rIL-4. En los animales resistentes se observó una FADN del 9% por efecto de la rIL-4, mientras que en los tratamientos donde se desafió con la micobacteria dicho porcentaje aumentó en presencia de la cepa BCG y la cepa 9926 en un 15 y 17%

respectivamente, ya que al mantener la estimulación con la rblL-4 el porcentaje de FADN para la cepa BCG, disminuyó a niveles similares al del control sin infección y sin estimulación (9%); esto sugiere que al mantener la estimulación se reduce la actividad apoptótica dado por la cepa BCG, mientras que el desafío con la cepa 9926 aumentó el porcentaje de apoptosis de un 14% a un 22%, siendo similares a los obtenidos bajo un esquema de activación clásica, en resultados previos de este laboratorio se ha observado que la cepa BCG muestra un menor índice en la inducción de apoptosis en comparación con la cepa 9926 con una activación clásica del macrófago (Esquivel, 2003),

Al comparar nuestros resultados con otros autores se encontraron similitudes, siendo que la infección de macrófagos infectados con *M. avium* o *M. tuberculosis* muerto por calor, fallan en la inducción de apoptosis (Placido, 1997). Adicionalmente se ha demostrado, que el desafío con bajas multiplicidades de infección (1:1) son insuficientes para inducir la apoptosis de los macrófagos (Dürbaum-Landmann, 1996), indicando que la carga bacteriana, la especificidad de especie y la virulencia son factores clave en la inducción de apoptosis en la patogenia de la enfermedad. Igualmente, se menciona que macrófagos de ratones resistentes a *M. bovis* BCG, *Leishmania donovani* y *S. typhimurium*, son más propensos a sufrir apoptosis que los macrófagos de ratones susceptibles a los mismos agentes, tras la exposición de *M. tuberculosis* H37Rv y PPD, siendo que los macrófagos de ratones resistentes presentan mayor apoptosis como mecanismo de control sobre la micobacteria que los susceptibles.

De este modo, se postula que el fenotipo de los macrófagos resistentes muestra una mayor producción de ON y de TNF- α , correspondiendo a su vez a una mayor inducción de apoptosis y control de *M. tuberculosis* (Rojas, 1997), lo anterior apoya los resultados obtenidos en el presente trabajo dado que los niveles de TNF- α y ON fueron superiores en presencia de la cepa virulenta, sugiriendo que el fenotipo también participa en el balance entre apoptosis y supervivencia del macrófago, además del control intracelular de la micobacteria.

Por lo tanto, se propone que la virulencia de *M. bovis*, la resistencia natural del hospedero a la infección y el tipo de activación de los macrófagos participan dinámicamente en la apoptosis, siendo mayor en los macrófagos de bovinos resistentes que en los macrófagos de bovinos susceptibles.

Cabe señalar que los eventos de regulación inmunológica varían entre las especies, ya que hay esquemas muy bien definidos en el modelo murino, pero que al ser comparados con el modelo bovino no cumple con lo propuesto por los autores que los describen (Ma, 2003; Kanhert, 2006; Mooser, 2003; Gratchev, 2001; Mills, 2000; Mantovani, 2004; Gordon, 2003).

Por ejemplo la expresión aumentada de la enzima arginasa que es inducida por efecto de la IL-4, siendo que esta enzima en el modelo bovino esta se expresa solo en etapas tardías de infección (30 días),(Vordermeier, 2008), y que la producción de ON no es dependiente del estímulo de el IFN- γ como se ha demostrado en el modelo de ratón (Barletta, 2006), la presencia de clonas co-expresando IL-4 e IFN- γ al mismo tiempo siendo estas antígeno-específicas y pueden coexistir sin mantener una polarización establecida a diferencia del modelo de ratón y en el humano, esto observado en infecciones con diferentes patógenos como *Babesia bovis* donde observan que el 68% de las clonas expresan ambas citocinas, *B. bigemina* un 63%, *F. hepatica* un 94% y *Mycobacterium bovis* un 25% de clonas co-expresando ambas citocinas.

Esto reportes sugieren que en el bovino la polarización no es tan estricta como en otros modelos y que esta depende de otros factores intrínsecos del modelo donde se incluye: (i) el tipo de célula presentadora de antígeno (ii) el ambiente de las citocinas que se esté dando en el momento de la infección ya que puede estar siendo afectado por el tipo de antígeno o patógeno (iii) regulación mediada por citocinas a partir de células T diferenciadas (iv) la concentración del antígeno y la afinidad por el receptor de la célula T (v) el nivel de señales co-estimuladoras liberadas por la interacción de la CPA y el Linfocito T, ya que de esto dependerá la regulación mediada por citocinas (vi) la eliminación de la respuesta específica de células T y B a través de la muerte celular mediada por

Fas y su ligando factores que en el modelo bovino influyen de manera significativa (Brown, 1998).

En el humano se ha mencionado que las células secretoras de IL-4 están fuertemente asociadas con lesiones de cavitación aunque raramente son altas las concentraciones como para ser detectadas en el suero y esto solo en pacientes con desórdenes asociados a una respuesta Th2, como en los casos de asma atópica, aunque se ha encontrado una alta expresión de IL-4 en pacientes con tuberculosis progresiva, a estos pacientes se les midió el nivel de IL-4 y observaron que aquellos donde disminuía el nivel de IL-4 también aumentaba el nivel de una variante de splicing de esta misma citocina (IL-4 δ 2) mencionando que esta variante podría estar asociada a un efecto protector, sugiriendo que bloquea la señalización dada por la IL.4 (Gilleece, 1992).

Este mismo efecto ha sido observado por otros autores que reportan que los individuos con infección crónica pero con un menor grado de lesiones muestran una expresión mayor de esta variante IL-4 δ 2 con un rol protector al inhibir la polarización a una respuesta Th2 permitiendo un ambiente Th1 (Huang-Pin, 2007).

Otro autor propone que la micobacteria podría desencadenar la producción de IL-4 y que el organismo en respuesta produce la variante como medida de control para asegurar un ambiente Th1 ya que miden la expresión de ambas variantes IL-4 δ 2 e IL-4 δ 3, en células de lavado broncoalveolar y de sangre periférica observando que pacientes con tuberculosis crónica manifiestan una expresión superior de la variante IL-4 δ 2 en comparación con los controles sin infección, tanto en macrófagos de sangre periférica como en los de lavado broncoalveolar (Dheda, 2005).

Otro grupo de investigación demostró que los bovinos desafiados con la micobacteria muestran una mayor expresión del variante de splicing pero esta

vez de la IL-4 δ 3 y menor grado de patología asociada a la infección, bajo diferentes esquemas de desafío (Rhodes, 2007). Del mismo modo Waldvogel (2004) encontró que aquellos animales con niveles altos de INF- γ mostraban niveles superiores de las variantes de IL-4 (IL-4 δ 2 e IL-4 δ 3), sin diferencias significativas entre ambas variantes, aunque los niveles de IL-4 completa disminuían, por lo cual, dichas variantes se han propuesto como inhibidores competitivos de la IL-4 permitiendo una respuesta Th1 dada por efecto del INF- γ (Waldvogel, 2004). Del mismo modo en ratones infectados a bajas dosis de *M tuberculosis* presentan una fuerte respuesta Th1 y a dosis altas predomina una respuesta Th2 con una alta expresión de IL-4 (Rook-Graham, 2007).

En el modelo murino se han realizado experimentos donde se demuestra que la utilización de anticuerpos contra la forma completa de la IL-4 reduce significativamente la replicación intracelular de la micobacteria tanto en fases tempranas, como en fases tardías de infección, por lo cual el autor propone que el suprimir la actividad de la IL-4 puede ser una arma importante del sistema inmune en contra de la infección (Roy, 2008).

En el presente trabajo demostramos la plasticidad de los macrófagos de origen bovino, los cuales pueden adoptar un estado de activación alterna dado por la estimulación con la rbIL-4; dicho estado de activación muestra diferencias con la activación clásica y a nivel de producción de ON encontramos una disminución por efecto de la rbIL-4, un aumento en la expresión de receptores de superficie a nivel de transcritos. Una vez que dichos macrófagos fueron estimulados con la rbIL-4 y desafiados con cepas de *Mycobacterium* se observó que los animales resistentes disminuían su capacidad inflamatoria, reflejándose en una disminución en la expresión de citocinas inflamatorias por ejemplo IL-1 β , TNF- α , IL-12p40 e iNOS las cuales son necesarias para el óptimo control de la infección.

También se determinó el porcentaje de fagocitosis y supervivencia intracelular de *M. bovis* en los macrófagos bajo condiciones de activación alterna siendo estos porcentajes superiores con los observados bajo condiciones de

activación clásica; ya que al mantener el estímulo con la rIL-4 disminuye la supervivencia intracelular, de igual manera se logró determinar el porcentaje de apoptosis encontrando que los animales susceptibles son mas propensos a la FADN por efecto de la presencia de la mycobacteria mientras que los macrófagos de animales resistentes muestran porcentajes inferiores con excepción del tratamiento donde se mantiene el estímulo con la rIL-4 y el desafío con la cepa de *M. bovis* 9926 siendo superior al porcentaje mostrado por los animales susceptibles, todos estos resultados sugieren que la activación alterna modifica la respuesta del macrófago hacia la micobacteria siendo este efecto mas evidente en macrófagos de animales resistentes.

9.- CONCLUSIONES.

1.- Los macrófagos bovinos adoptan un fenotipo de activación alterna por efecto de la rbIL-4 siendo este efecto más evidente en macrófagos procedentes de animales resistentes.

- La rbIL-4 reduce la producción de ON por efecto del LPS y del INF- γ
- Aumenta la expresión a nivel de transcritos de receptores de superficie celular MMR y SMR-1 siendo ambos efectos más evidentes en macrofagos resistentes

2.- La activación alterna:

- ✓ Induce la disminución en la producción de ON y Arginasa bajo condiciones de infección, siendo mayor el efecto en macrófagos de animales resistentes.
- ✓ Provoca la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias en comparación con la vía clásica, con un mayor efecto en macrófagos de animales resistentes, aunque la presencia de la micobacteria estimula la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. .
- ✓ Induce un aumento en el índice de FADN en animales Susceptibles, aunque los animales Resistentes manifiestan una FADN basal mayor, siendo menor en presencia de *M. bovis* en comparación con Susceptibles.
- ✓ Los macrófagos de animales resistentes muestran un índice de fagocitosis superior con ambas vías de activación celular.
- ✓ Se observó un mejor control de la proliferación micobacteriana con la estimulación con rbIL-4, ya que al mantener la estimulación con esta citocina los animales susceptibles mostraron un control en la proliferación bacteriana similar al de los animales resistentes.

10. - Bibliografía:

Adams GL. Natural disease resistance in domestic animals with emphasis on intracellular bacterial disease: functional and genetics basis. J Am Vet Med Assoc. 1988;192(9):1306-1315.

Aderem A Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD. Toll-like receptor-2 mediates mycobacterial induced proinflammatory signaling in macrophages. Proc Natl Acad Sci, USA, 1999; 96:14459-14463.

Adler. H. B., Frech. M., Thony. H., Pfister. E., Peterhans. Jungi. T.W.,. Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. J. immunol. 1995;154:4710-4718.

Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophages cytotoxicity and apoptosis. Cancer Metastasis Rev 1998;17: 39-53.

Aldwell F.E., Wedlock. D.N., Buddle. B.M.. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcripción and viability of bovine aveolar macrophage infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. Immunol and Cell Biol 1996;74:45-51.

Alliprantis AO. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like Receptor-2. Science, 1999;285:736-739.

Antje Kahnert, Seiler P, Stein M, Bandermann S, Hahnke K, Mollenkopf H, Kaufmann SH.. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. J.immunol. 2006;36:631-647

Applied Biosystems. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Relative quantification of gene expression. Applied Biosystems. 2001. User Bulletin #2.

Aranday CE. (Comunicación personal, Laboratorio de Investigación en Tuberculosis y Brucelosis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México)

Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect. Immun.* 2000;68:767–778.

Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold H. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J Immun* 1998;161:6236-6241.

Barletta. RG., Thoen.CO. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* Cap. 4 in *Mycobacterium bovis* Infection in animals and humans 2th Edition Thoen. CO., Steele. JH., Gilsdorf. MJ Blackwell Publishing 2006.

Barnes PF, Mehra V, Hirschfield R, Fong J, Abou-Zeid GA, Rook W, et al. Characterization of T cell antigens associated with the cell wall protein-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1989;143:2656-2662.

Bhardwaj A and Aggarwal BB. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 2003;23:317-332.

Blanchard DK, Michelini-Norris MB, Friedman H, Djeu JY. Lysis of mycobacteria-infected monocytes by IL-2 activated killer cells: role of LFA-1. *Cell Immunol*1989;119:402-411.

Boddu-Jasmine H.C. Cytokine mRNA expression in cattle infected with different dosages of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 2008 doi:10.1016/j.tube.2008.06.003 (en impresión).

Brennan PJ. Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis* 1989;11:S420-S430.

Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285:732–736.

Bricarello. P.A. Zaros. L.G. Coutinho. L.L. Rocha. R.A.. immunological response and cytokines gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. *Vet parasit* 2008;155:95-103.

Brosch. R., Pym AS, Brodin P, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*. 2002;46(3):709-717.

Brown W.C.. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet immunol and immunopathol*. 1998;63:45-55.

Campbell G.A. Adams G.L. The long-term culture of bovine monocyte derived macrophages and their use in the study of *Brucella abortus*. *Vet immun* 1992; 34:291-305.

Carter GR, Chengappa MM. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Fourth edition 1986.

Chan J, Flynn JL. Nitric oxide in Mycobacterium tuberculosis infection. In: Fang FC, editor. Nitric oxide and infection. New York: Kluwer Academic Plenum 1999:281-310.

Cohn ML, Waggoner R, McClathy J. The 7H11 medium for the cultivation of Mycobacteria. *Am J Clin Pathol* 1968;98:295-296.

Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2002;148(Pt 10):2919-2928.

Collins HL, Kaufmann SH. Prospects for better tuberculosis vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(1):21-28.

Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997;186:39-45.

Cooper RL, Hart PH, Finlay-Jones JJ. IL-4 suppresses IL-1 beta, TNF-alpha and PGE2 production by human peritoneal macrophages. *Immunology.* 1991;72(3):344-349.

Cousins D V, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1305-1314.

Coussens P.M., Verman. N., Coussens. M.A., Elfman.M.D., McNulty. A.M.. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infection and immunity* 2004:1409-1422.

Costello ED, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF. A study cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Vet J* 1998;155:245-250.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune-cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. The definitive proof that IFN- γ is a 'classical activator' of macrophage anti-microbial activity and is an inducer of the expression of MHC class II molecules and NOS2. *Science* 1993;259:1739-1742 .

Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, Wittmer S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med* 2000;192(1):117-122.

Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toossi Z. Selective induction of transforming growth factor- β in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996;64:399-405.

Denis M. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis. *J Leukoc Biol.* 1991;50(5):495-501.

Dheda K, Jung-su Chang et al. In vivo and in Vitro Studies of novel cytokine, interleukine 4 δ 2, in pulmonar tuberculosis. *Am J. Respire. Crit. Care Med.* 2005. 172:501-508.

Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stulhr DJ, Srimal S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factor beta 1-beta 2 and beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol* 1990;145:940-944.

Dubos J, Davis D. Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Reseach 1946.

Dürubaum-Landmann I, Gercken J, Flad HD, Ernst M. Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect Immun* 1996; 64:5384-5389.

Dussurget, O, Stewart G, Neyrolles O, Pescher P, Young D, Marchal G. Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxidedismutase. *Infect Immun* 2001;69:529–533.

Esquivel S.H. Apoptosis por *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino: efecto de la virulencia bacteriana y de la resistencia natural del hospedero

(tesis de maestría) (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.

Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Remold HG. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4 infected macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immun* 1997;158:4320-4327.

Fenhalls G, Wong A, Bezuidenhout J, van Helden P, Bardin P, Lukey PT. In situ production of gamma interferon, interleukin-4 and tumour necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect Immun* 2000;68:2827-2836.

(a) Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes *Infect. Immun.* 1996;64: 683-690.

(b) Fenton MJ, Savedra R Jr, Delude RL, Ingalls RR, Golenbock DT. Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system. *J Immunol.* 1996;157(6):2549-2554.

Ferguson JS, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 2000;80(6):293.

Gause. C. William. Memory TH2 cells induce alternative activated macrophages to mediated protection against nematode parasites. *Nature medicine* 2006;12:955-960.

Gilleece M. H., Scarffe J. H., Ghosh A., Heyworth C. M., Bonnem E., Testa N., Stern P., Dexter T. M. Recombinant human interleukin 4 (IL-4) given as daily subcutaneous injections: a Phase I dose toxicity trial. *Br J Cancer* 1992;66: 204-210.

Glimcher, LH Murphy K.M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and development* 2000;14:1693-1711.

(a) Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 1999;67(5-6):222-226.

(b) Goerdt, S., Orfanos, C.E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 1999;10:137-142.

Gordon, S. in *Fundamental Immunology* 4th edn Ch. 15 (ed. Paul, W.) 533-545 (Lippincott Raven, Philadelphia, 1999).

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology* 2003; 3: 23-35.

Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, Goerdt S. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14(5):272-279.

Gutiérrez-Pabello JA, McMurray DN, Adams LG. Upregulation of thymosin β -10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infect immun* 2002;70:2121-2127.

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

Hamilton, T. *The Macrophage* 2nd ed (ed Burke, B. & Lewis, C. E.) 73-102 (Oxford Univ. Press, 2002).

Harth G, Horwitz M.A. An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. *J Exp Med* 1999;189:1425–1436.

Harth G, Horwitz MA. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy in vivo. *Infect Immun* 2003;71:456–464.

Hestvik. A. L. K., Hmama. Z, Av-Gay. Y. Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol Rev* 2004;29:1041-1050.

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of oxide nitric synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 2001;167:6533-6544.

Hickman SP, Chan J, Salgame P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J. Immunol.* 2002;168(9):4636-4642.

Hirsch CS, Ellner J, Russel DG, Rich EA, Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* 1994; 52:743-753.

Hirsch CS, Toossi Z, Vanham G, Johnson JL, Peters P, Okwera A, Mugerwa R, Mugenyi P, Ellner JJ. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1999;179:945-953.

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13853–13858.

Huang Pin Wu , Wu CL, Yu CC, Liu YC, Chuang DY. Efficiency of interleukin-4 expression in patients with tuberculosis and nontubercular pneumonia. Hum Immunol. 2007;68(10):832-838.

Hutt Fb Genetics resistance to disease in domestic animals. New York; Comstok Publishing Associates 1958.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol. 2004;5(10):987-995.

Kahnert A, Seiler P, Stein M, Bandermann S, Hahnke K, Mollenkopf H, Kaufmann SH. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Immunol 2006;36(3):631-47.

Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infect Immun 1997; 65(1):298-304.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26:239-257.

Kilburn J, Stottmeier K, Kubica G. Aspartic acid as a precursor for niacin synthesis by tubercle bacilli grown on 7H10 agar medium. Am J Clin Pathol 1968;50:582-586.

Klinger K, Tchou-Wong KM, Brandli O, Aston C, Kim R, Chi C, Rom WM. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. Infect immune 1997;65:5272-5278.

Knowles V. Tuberculosis: diagnosis and care. Prof Nurse. 2002 ;18(4):193-194.

Korbel D.S., Schneider B.E., Schaible. U.E. Innate immunity in tuberculosis. myth and truth. Microbes infect. 2008;10(9):995-1004.

Kwon O.J. The role of nitric oxide in the immune response of tuberculosis. *J Korean Med Sci.* 1997;12(6):481-487.

Li, Kelley ZC, Collins F, Rouse D, Morris S. Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* 1998;177:1030–1035.

Lian-Yong G, Kwak YA. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 2000;8:306-313.

Lohoff M, Lohff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper cell differentiation. *Nature reviews Immunology* 2005;5:128-135.

López-Macias C, Salinas R., Estrada-Parra S., Maldonado-Bernal C, Isibasi A. *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC-II expression in human macrophages. *Tuberculosis* 2008;88:212-220.

Ma J. Regulation of macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Science.* 2003;60:2334-2346.

MacFarlane M and Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports* 2004;7:674-678.

Mackness G.B. The immunological basis of acquired cellular resistance. An early delineation of macrophage activation by intracellular infection. *J. exp. Med.* 1964;120:105 .

McKinney J, Höner KB, Muñoz-Elias J, Miczak A, Chen B, Chan T, Swenson D, Sacchetti JC, Jacobs WR, Russell DG. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000;406:735-738.

Mantovani A. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology.* 2004;25(12):677-686.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, *Trends Immunol* 2002;23:549–555.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25(12):677-86.

Marcinkeviciene, J. A., R. S. Magliozzo, and J. S. Blanchard. Purification and characterization of the *Mycobacterium smegmatis* catalase-peroxidase involved in isoniazid activation. *J Biol Chem* 1995;38:22290–22295.

Mills C.D.. M-1/M-2 macrophage and the Th1/Th2 paradigm. *the Journal of immunology.* 2000;164:6166-6173.

Molloy A, Laochumroomvorapong P, Kalplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infect monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Güerin. *J Exp Med* 1994;180:1499-1509.

Milner R, Stottmeier K. Formaldehyde: a photothermal activated toxic substance produced in middelbrook 7H10 medium. *Am Rev Respir Dis* 1969;99:603-607.

Mitchison DA., Allen B. W, Carrol L., Dickinson JM Aber VR. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. *J Med Microbiol* 1971;5:165-175.

Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995 ;25(4):1101-1104.

Mosser D.M. The many faces of macrophage activation, *J. Leukoc. Biol.* 2003 (73):209–212.

Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr M. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 2002;186:74-80.

Mozo L, Suarez A, Gutierrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(3):406-412.

Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 1999;163(7):3771-3777.

Murray PJ, Wang L, Onufryk C, Tepper RI, Young RA. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol* 1997; 158: 315-21.

Nathan C. A commentary: inducible nitric oxide synthase. *Res Immunol*. 1991;142(7):600-602.

Ottenhof TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998; 19: 491-4.

Piddington, Fang, Laessig T, Cooper M, Orme IM, Buchmeier NA. Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infect Immun* 2001;69:4980–4987.

Piercy. J., Werling .D., Coffey. T.J. Differential responses of bovine macrophage to infection with bovine-specific and non-bovine specific micobacteria. *Tuberculosis* 2007;87:415-420.

Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, Sanduzzi A, Bocchino ML, Zembala M, Colizzi V. Apoptosis of human

monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Pathol 1997;181:31-38.

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

Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev Sci Tech 2001;20:21-54.

Raynaud C, Papavinasasundaram KG, Speight RA, Springer B, Sander P, Bottger EC, Colston MJ, Draper P. The functions of OmpA Tb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 2002;46:191–201.

Rhodes. S.G Hewinson. G, Vordermeier M.H.. Is interleukin-4 δ 3 splice variant expression in bovine tuberculosis a marker of protective immunity? Infection and immunity 2007. 3006-3013.

Rojas M, Barrera LF, Puzo G, García LF. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. J Immun 1997; 159:1352-1361.

Rojas M, Barrera LF, Garcia LF. Induction of apoptosis in murine macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* is reactive oxygen intermediates-independent. Biochem Biophys Res Commun 1998; 247:436-442.

Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, García LF. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. J Immun 1999; 162:6122-6131.

Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell

responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun.* 1999;67(12):6461-72.

Rojas M, Garcia LF, Nigou J, Puzo G, Olivier M. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*- induced macrophage apoptosis by altering Ca²⁺-dependent cell signaling. *J Infect Dis* 2000; 182:240-251.

Rook. Graham A.W. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Current molecular medicine.* 2007; 7. 327-337.

Roy. E., Brennan. J., Jolles., Lowrie. D.B.. Benefical effect of anti-interleukin-4 antibody when administered in murine model of tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2008. 88. 197-202.

Ruscetti F, Varesio L, Ochoa A, Ortaldo J. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 685: 488-500.

Schlesinger LS, Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptor in addition to complement receptors. *J Immunol* 1993; 150: 2920-2930.

Schlesinger LS, Kaufman T, Lyer S, Hull S, Marchiando LK. Differences in mannosse receptor-mediates uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol.* 1996; 157: 4568-4575.

Schluger NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res.* 2001;2(3):157-63. Epub 2001 Mar 29. Review.

Selvaraj P, Venkata N, Vijavan V.K, Prabhakar R, Narayanan PR. Alveolar macrophages in patients with pulmonary tuberculosis. *Lung India,* 1988; 6: 71-4.

Senaratne RH, Mobasher H, Papavinasasundaram KG, Jenner P, Lea EJ, and Draper P. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. J Bacteriol 1998;180:3541–3547.

Skamene E. Genetic regulation of host resistance to bacterial infection. Rev infect Dis 1983; 4: S823-832.

Song R, Ning W, Liu F, Ameredes BT, Calhoun WJ, Otterbein LE, Choi AM. Regulation of IL-1beta -induced GM-CSF production in human airway smooth muscle cells by carbon monoxide. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003;284(1):L50-6. Epub 2002 Aug 23.

Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker alternative immunologic macrophage activation J. Exp. Med. 1992 176,287-292.

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

Van Ginderachter J,A, Movahedi K, Hassanzadeh.G.G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. Immunobiology. 2006: 211. 487-501

Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. Infect Immun. 2002;70(3):1033-1041.

Vordermeier M. Boddu-Jasmine HC, Witchell J, , Wangoo A, Goyal M. Cytokine mRNA expression in cattle infected with different dosages of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis 2008 Nov;88(6):610-5.

Waldvogel. A.S.. Expression of interleukin-4, interleukin-4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Veterinary immunology and immunopathology. 2004;97:52-63.

Watson VE, Hill LL, Owen-Schaub LB, Davis DW, McConkey DJ, Jagannath C, Hunter RL, Jr., Actor JK. Apoptosis in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice exhibiting varied immunopathology. J Pathol 2000; 190:211-220;65:5272-5278.

Wedlock. D.N., Kawakami. R.P., Koach.J., Buddle.B.M., Collins. D.M. Differences of gene expression in bovine alveolar macrophages infected with virulent and attenuated isogenic strain of *Mycobacterium bovis*. International Immunopharmacology. 2006;6:957-961.

Wedlock. D.N., Aldwell. F.E., Collins. M.D., Lisle. G.W., Wilson. T., Buddle. B.M... Immune response induced in cattle by virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* strains: correlation of delayed-type hypersensitivity with ability of strains to grow in macrophage. Infection and Immunity. 1999:2172-2177.

Williams-Ashman HG, Canellakis ZN. Polyamines in mammalian biology and medicine. Perspect Biol Med. 1979 Spring;22(3):421-453.

Wilson TM, de Lisle GW, Collins DM. Effect of inhA and katG on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. Mol Microb 1995;15:1009-1015.

Winau F, Kaufmann S H E and Scccchaible UE. Apoptosis paves the detour path for CD8T cell activation against intracellular bacteria. Cell Microbiol 2004;6: 599-607.

Yuan Y, Crane DD, Barry III CE. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. J Bacteriol 1996;178:4484–4492.

11.- FIGURAS.

FIGURA 1

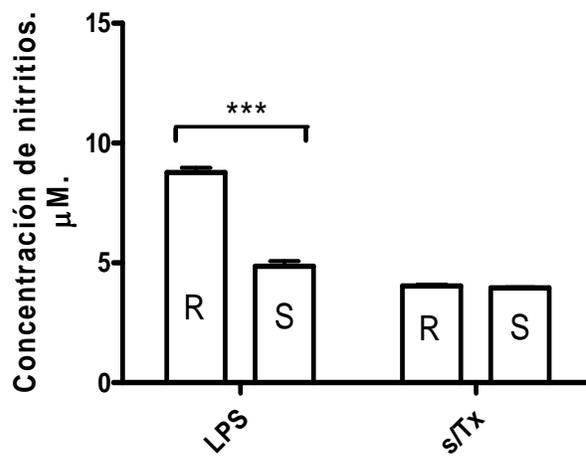


Fig. 1.- Producción de ON a partir de sobrenadante de macrófagos bovinos de animales susceptibles y macrófagos bovinos de animales resistentes estimulados con 50 ng/mL de LPS y sin tratamiento $p \leq 0.0001$.

FIGURA 2

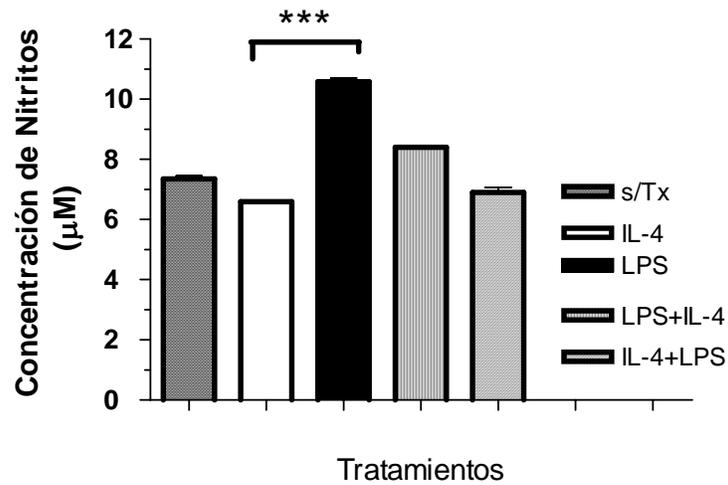


Fig. 2.- Producción de ON a partir de sobrenadante de macrófagos bovinos estimulados con 50 ng/mL de LPS y rbIL-4 a concentración de 10 ng/mL $p \leq 0.0001$

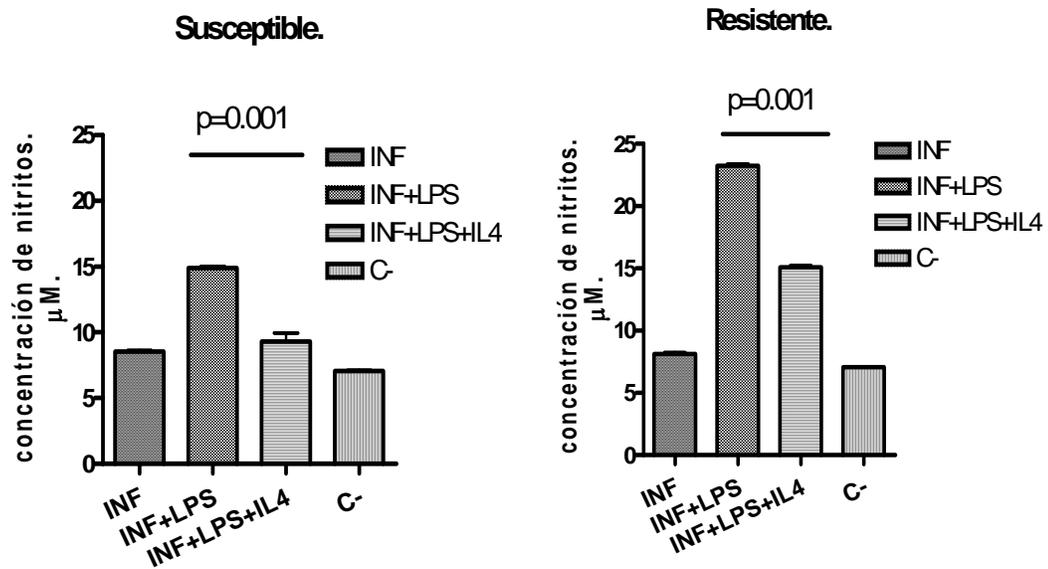


Fig. 2b.- Producción de ON a partir de sobrenadante de macrófagos bovinos de animales susceptibles y macrófagos bovinos de animales resistentes estimulados con 100 ng/mL de rbINF- γ y 50ng/ml de LPS mas rbIL-4 a concentración de 10 ng/mL. $p \leq 0.0001$

FIGURA 3

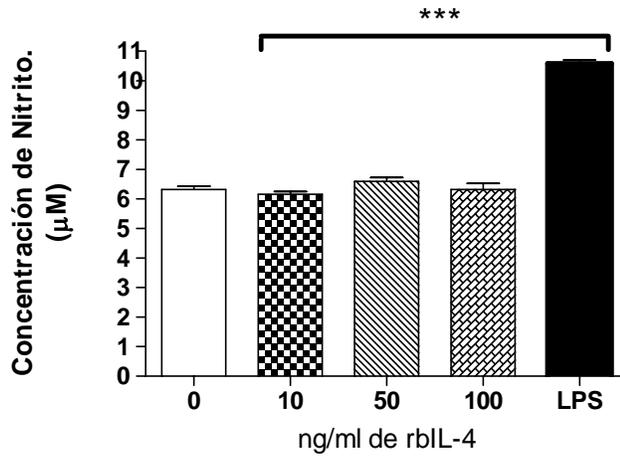


Fig. 3.- Curva de concentración de rbIL-4 para activar de forma alterna a los macrófagos, mostrándose que dicha activación es independiente a la concentración de rbIL-4 utilizada $p \leq 0.0001$.

FIGURA 4

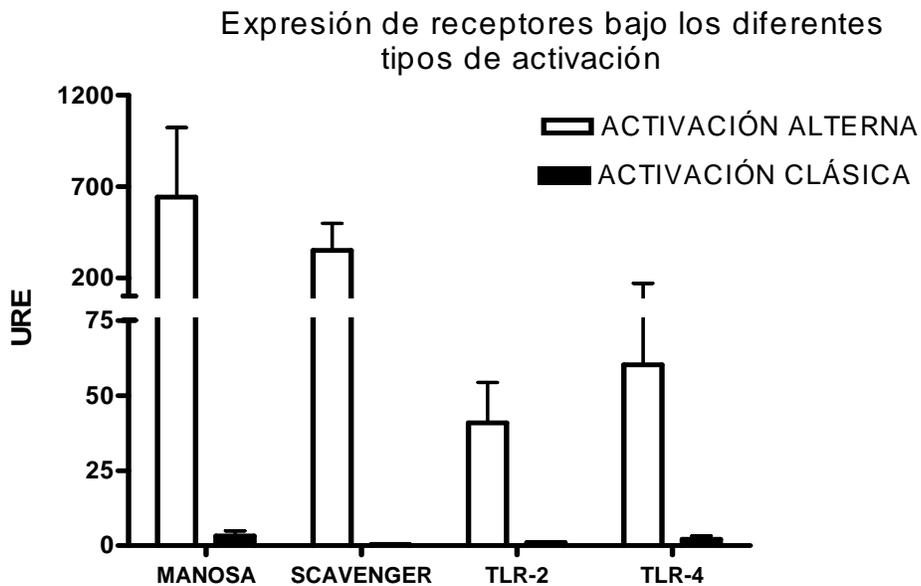


Fig. 4a Expresión de receptores a nivel de superficie celular en macrófagos activados por las diferentes vías de activación celular, donde se observa el efecto de la rbIL-4 aumentando la expresión de MMR-1, MSR-1, TLR-2 y TLR-4 sobre macrófagos estimulados con LPS.

Expresión de receptores entre animales resistentes y susceptibles bajo el estímulo de activación alterna.

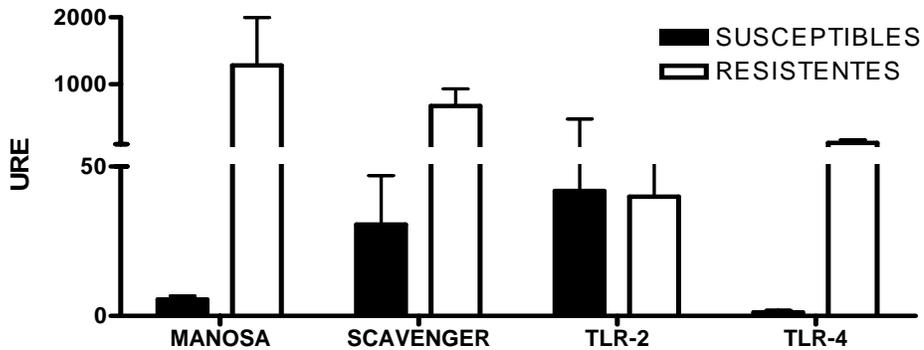


Fig. 4b Expresión génica de receptores de superficie celular en macrófagos activados por las vía alterna.

Expresión de receptores entre animales resistentes y susceptibles bajo el estímulo de activación clásica.

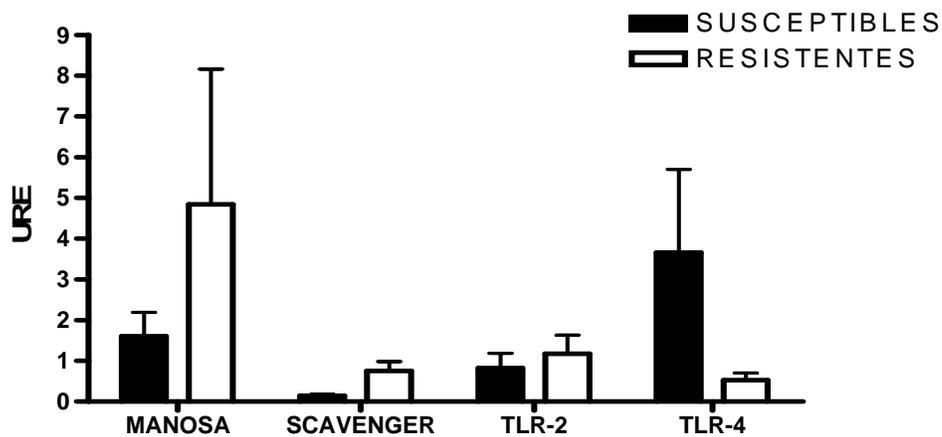


Fig. 4c Expresión génica de receptores de superficie celular en macrófagos activados por las vía clásica.

FIGURA 5

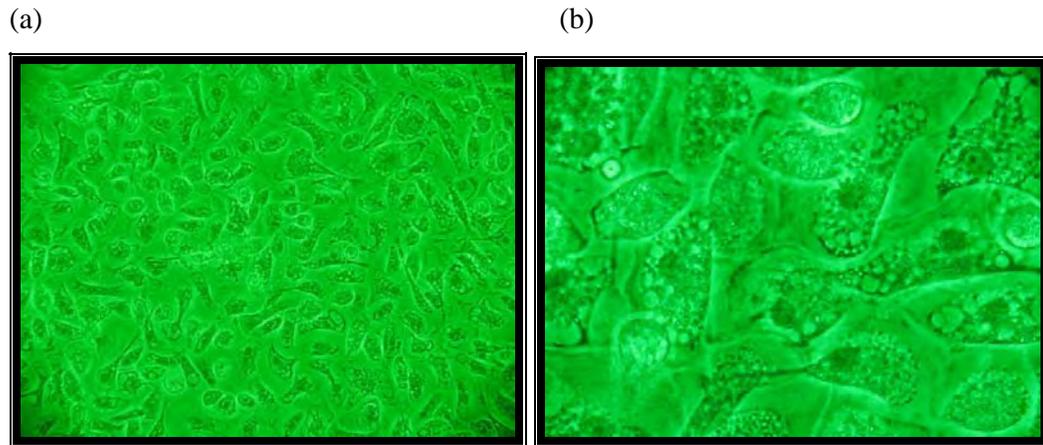


Fig.5 Micrografías de luz de macrófagos bovinos bajo el efecto de LPS a 50 ng/ml se logra observar cambios morfológicos típicos de activación clásica, como es agrandamiento, elongación de pseudópodos e incrementada granularidad intracitoplásmica. (a) aumento a 20X (b) aumento a 40X.

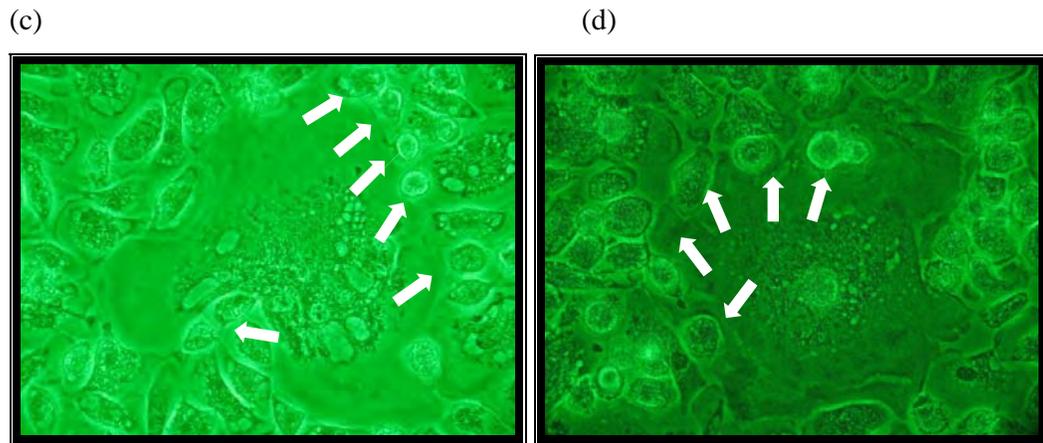


Fig. 5b. Micrografías de luz de macrófagos bovinos bajo el efecto de rbIL-4 a 10ng/ml, donde se puede observar la fusión de macrófagos, dados por efecto de activación alterna, se logran observar macrófagos fusionados con 7 núcleos (c) y 6 núcleos (d) con agrandamiento y fusión del citoplasma con los núcleos situados a la periferia de la célula (flechas). Aumento a 40X

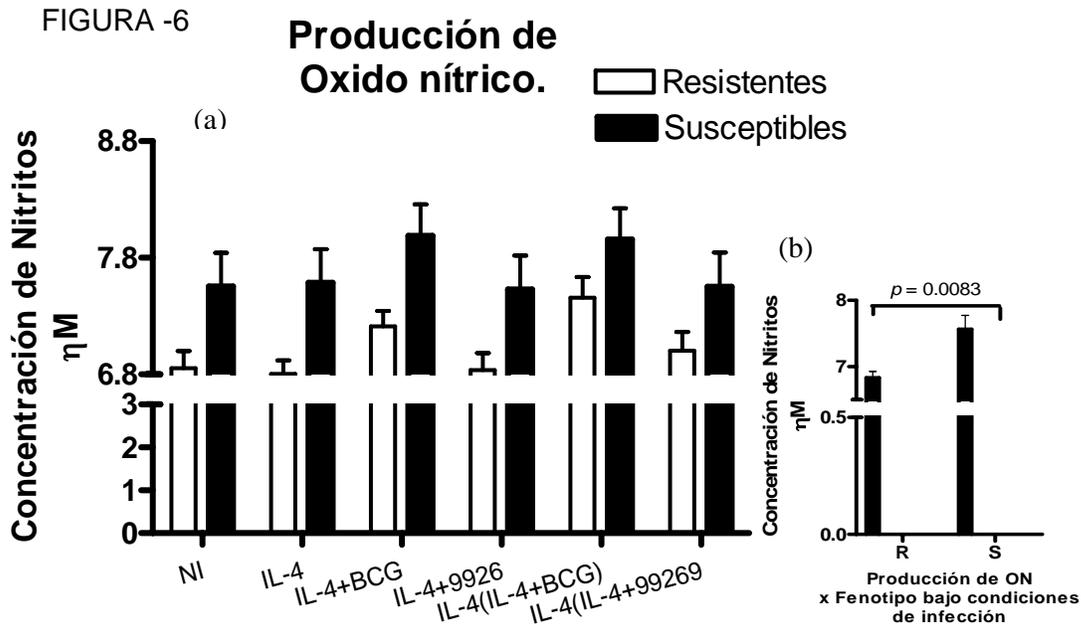


Fig.6 Producción de ON en macrófagos activados en forma alterna e infectados con *M. bovis* a una MOI de 10:1, (a). Producción general de ON en macrófagos R y S activados en forma alterna e infectados con *M. bovis* (b). $p \leq 0.005$

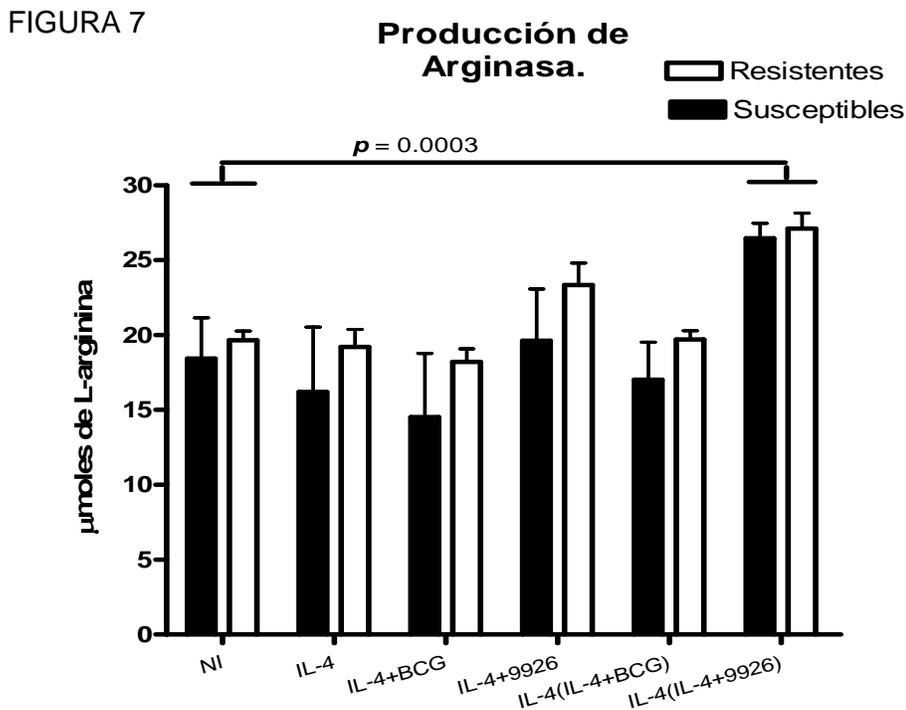


Fig 7. Producción de arginasa en macrófagos activados por la vía alterna e infectados con *M. bovis* a una MOI de 10:1.

FIGURA.-8 **Animales Resistentes.**

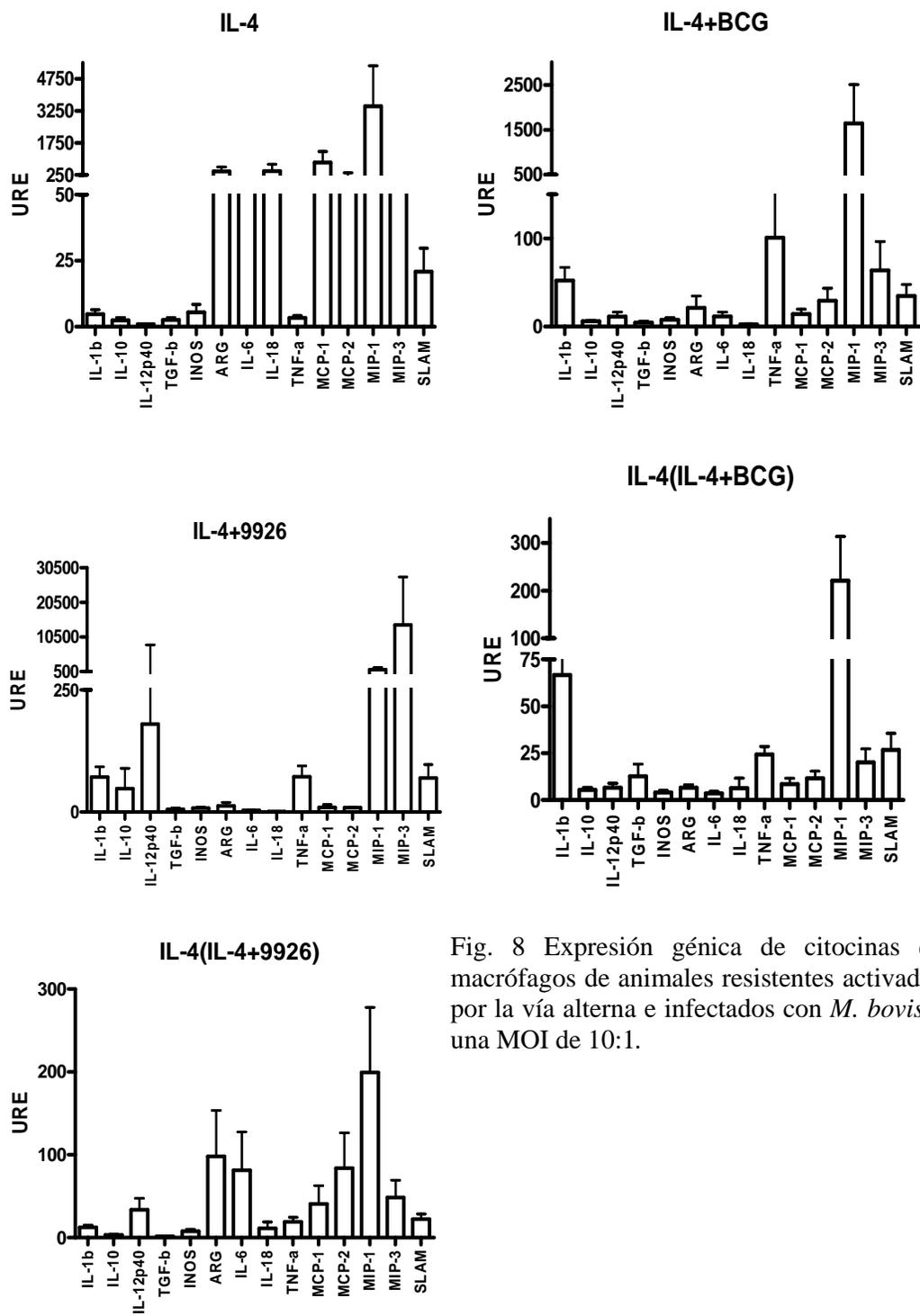


Fig. 8 Expresión génica de citocinas de macrófagos de animales resistentes activados por la vía alterna e infectados con *M. bovis* a una MOI de 10:1.

FIGURA 9

Animales Susceptibles

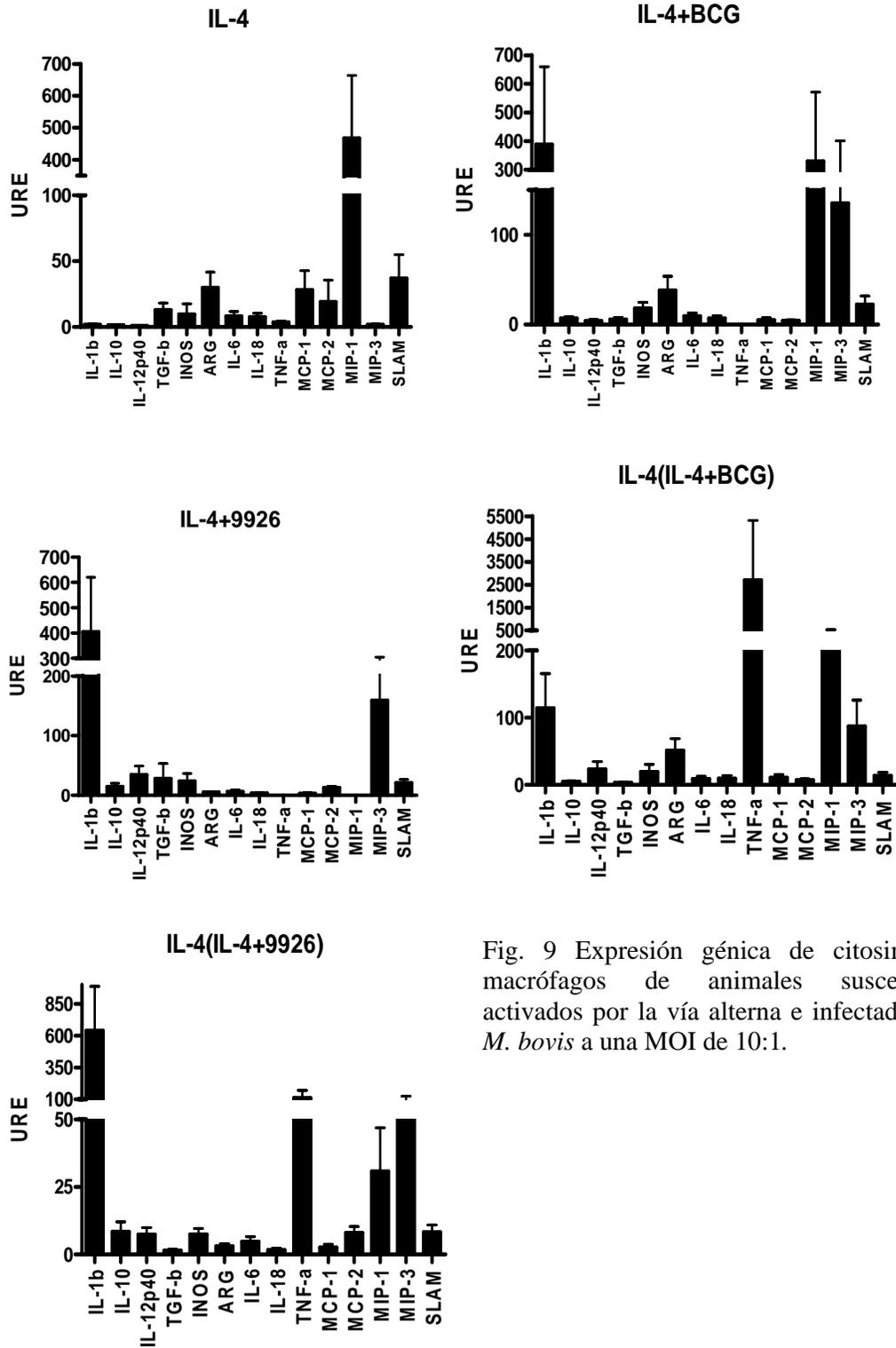


Fig. 9 Expresión génica de citosinas de macrófagos de animales susceptibles activados por la vía alterna e infectados con *M. bovis* a una MOI de 10:1.

Tabla.2 Expresión génica en unidades relativas de citocinas procedentes de macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles activados por la vía alterna e infectados con *M. bovis* a una MOI de 10:1.

Tratamientos						
CITOCINAS		IL-4	IL-4-BCG	IL-4 + 9926	IL-4(IL-4+ BCG)	IL-4(IL-4 +9926)
		Susc/Resist	Susc/Resist	Susc/Resist	Susc/Resist	Susc/Resist
	IL-1b	5 / 5	400 / 50	420 / 70	110 / 70	650 / 20
	IL-12	5 / 0	10 / 15	40 / 150	20 / 15	15 / 40
	INOS	12 / 5	20 / 12	30 / 15	25 / 5	15 / 10
	IL-18	10 / 500	12 / 5	12 / 0	20 / 10	10 / 20
	TNF-a	8 / 10	220 / 110	220 / 80	2600 / 25	120 / 25
	MCP-1	30 / 1000	10 / 20	10 / 20	25 / 20	10 / 45
	MCP-2	25 / 215	10 / 40	10 / 20	20 / 22	20 / 80
	MIP-1	450 / 3500	380 / 2000	300 / 1150	380 / 250	40 / 220
	MIP-3	5 / 100	80 / 75	80 / 14300	120 / 30	100 / 60
	IL-6	10 / 120	15 / 20	15 / 5	20 / 5	15 / 80
	IL-10	5 / 3	10 / 10	10 / 45	10 / 10	15 / 5
	ARGII	32 / 500	35 / 25	35 / 20	50 / 10	10 / 100
	SLAM	42 / 40	38 / 50	35 / 85	30 / 35	30 / 40

FIGURA 10.

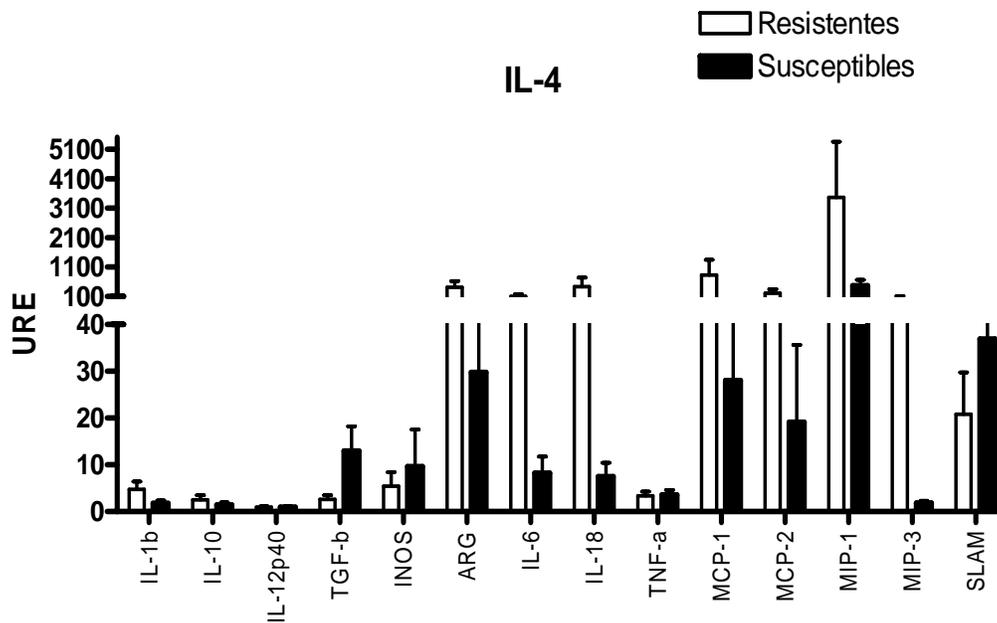


Fig.10 Expresión génica de citocinas de macrófagos bovinos activados por la vía alterna mediante la incubación con rbIL-4. Niveles de expresión de citocinas y quimiocinas por el efecto de la rbIL-4, donde los animales Resistentes muestran una expresión mayor en ARGII, IL-6, IL-18, MCP-1, MCP-2, MIP-1 y MIP-3, mientras que los animales Susceptibles muestran una expresión mayor para TGF-b, INOS y SLAM, sin diferencias en el fenotipo para IL-1b, IL-10 IL-12p40 y TNF-a.

FIGURA. 11

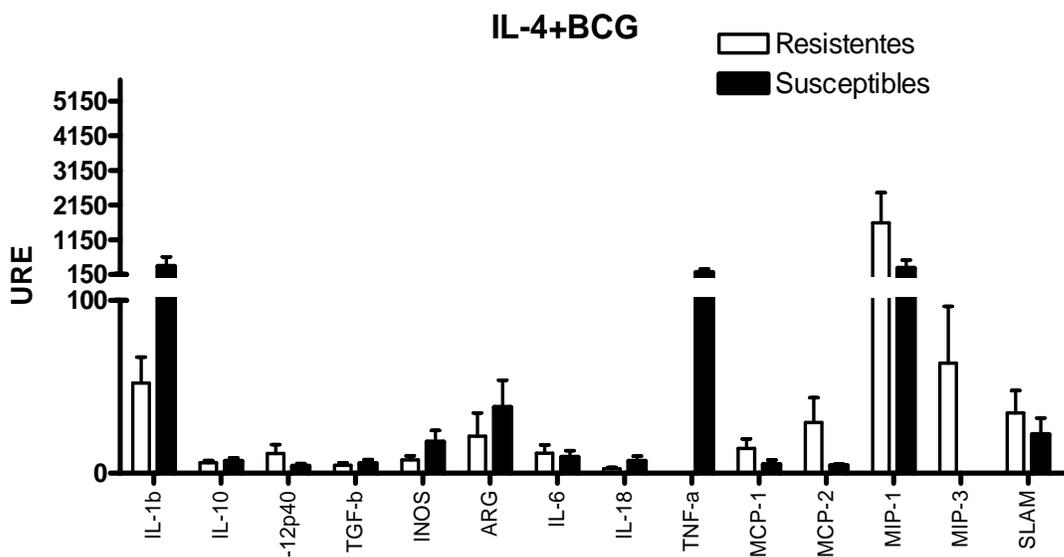


Fig.11 Expresión génica de citocinas de macrófagos bovinos activados por la vía alterna mediante la incubación con rIL-4 e infectados con *M. bovis* BCG a una MOI de 10:1.

FIGURA. 12

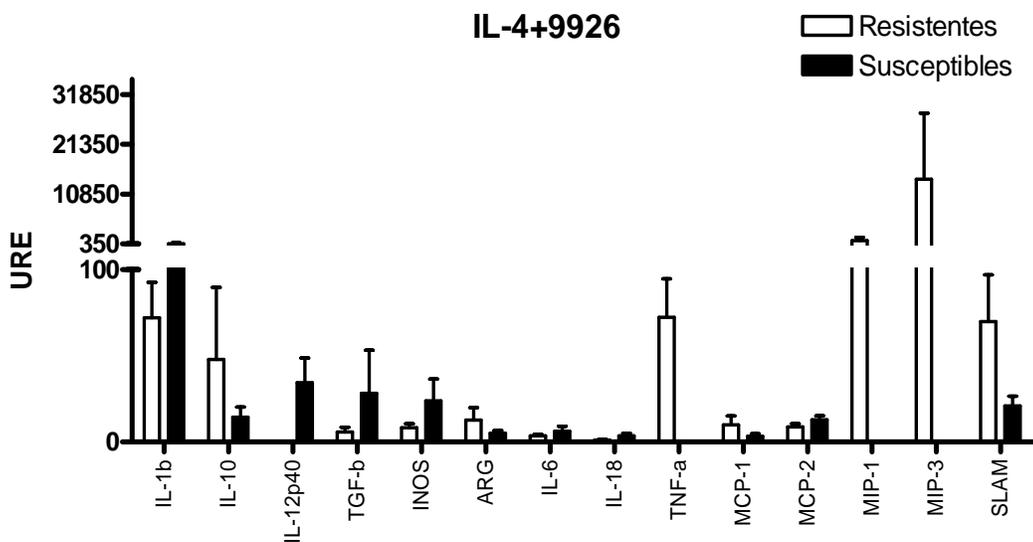


Fig. 12 Expresión génica de citocinas de macrófagos bovinos activados por la vía alterna mediante la incubación con rIL-4 e infectados con *M. bovis* 9926 a una MOI de 10:1.

FIGURA. 13

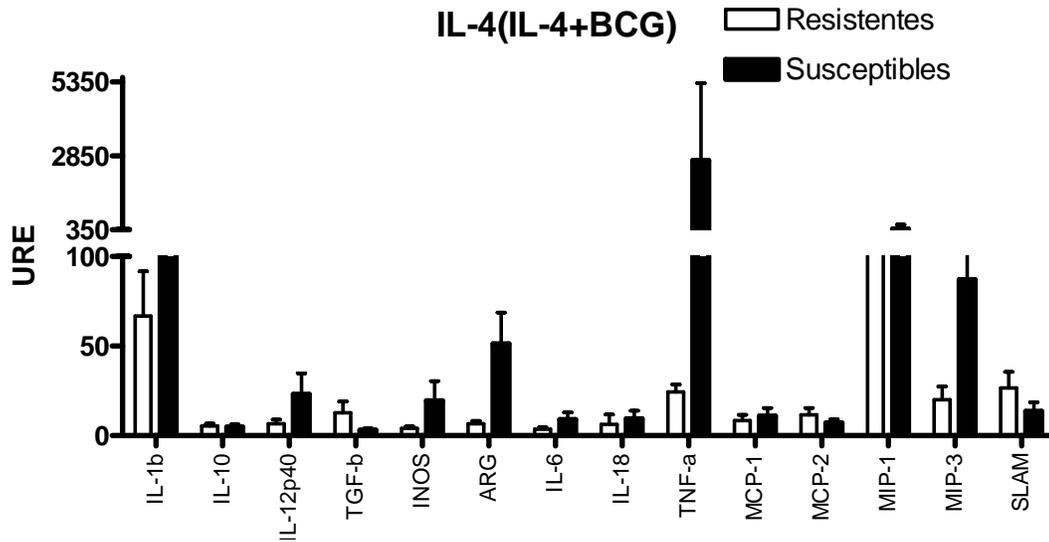


Fig. 13 Expresión génica de citocinas de macrófagos bovinos activados por la vía alterna y mantenidos bajo incubación sostenida de rbIL-4 e infectados con *M. bovis* BCG a una MOI de 10:1.

FIGURA.14

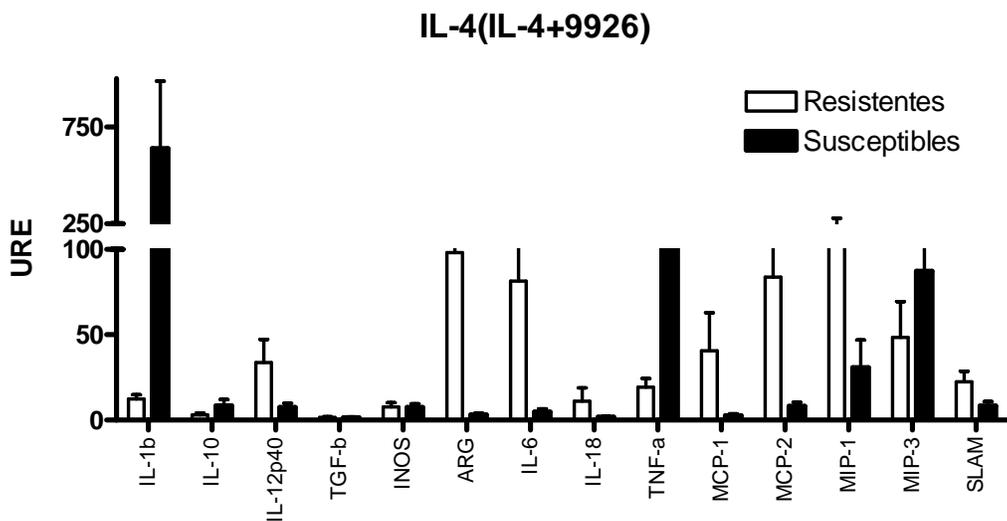


Fig. 14 Expresión génica de citocinas de macrófagos bovinos activados por la vía alterna y mantenidos bajo incubación sostenida de rbIL-4 e infectados con *M. bovis* 9926 a una MOI de 10:1.

FIGURA. 15

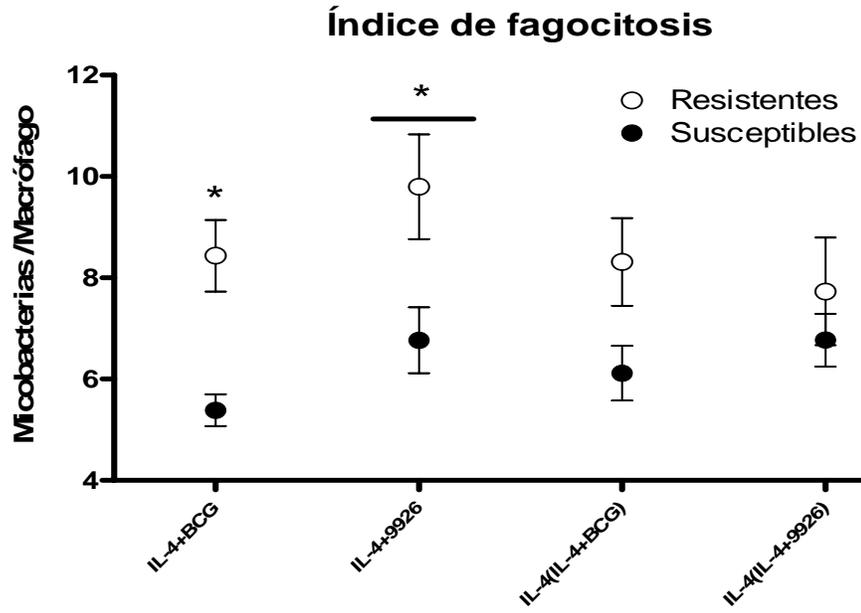


Fig. 15 Índice de fagocitosis de macrófagos bovinos activados por la vía alterna mediante la incubación con rbIL-4 e infectados con *M. bovis* 9926 a una MOI de 10:1 cambio al mantener la estimulación sin diferencias entre cepas. $p \leq 0.05$

Figura 16

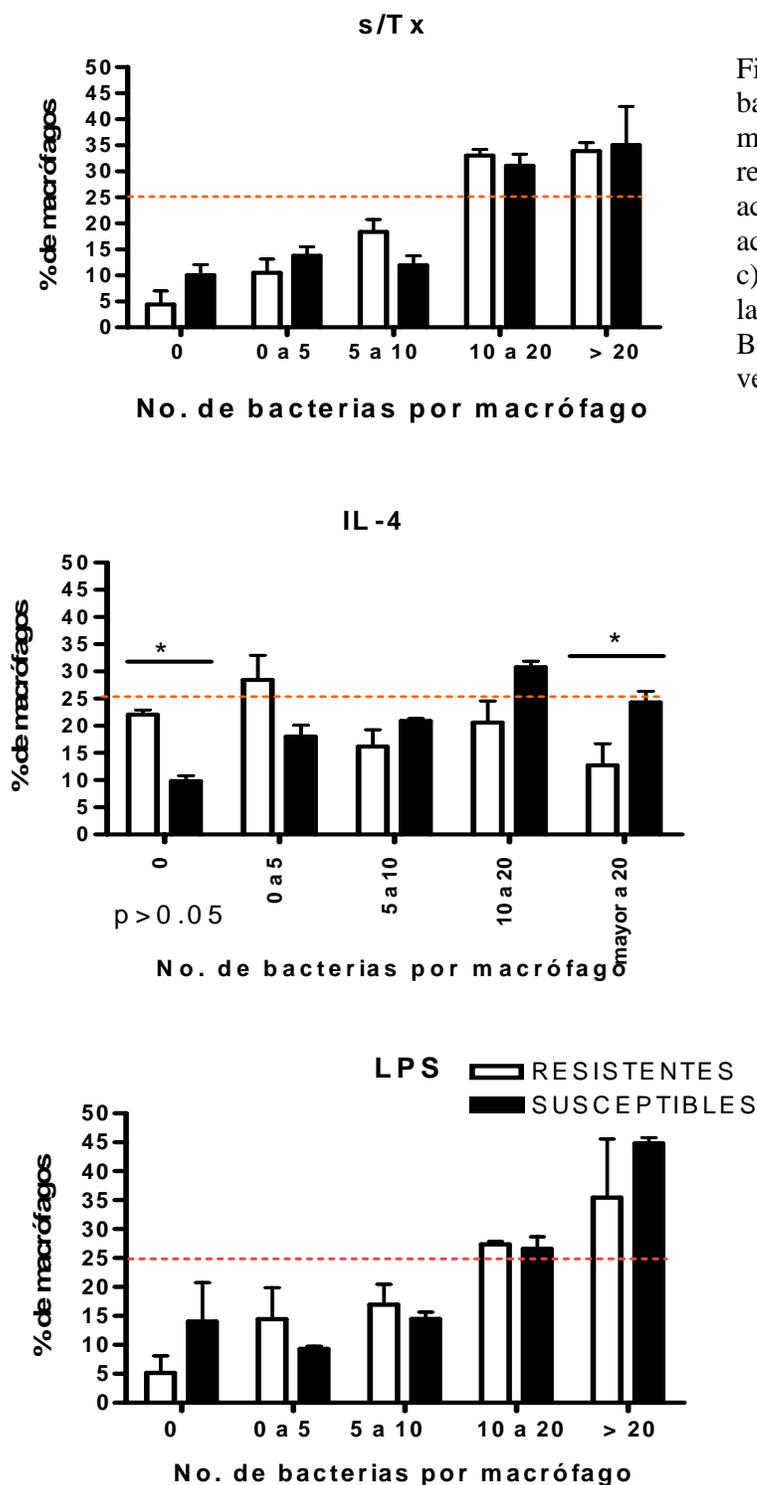


Fig. 16a Porcentaje de bacterias fagocitadas por macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles; a) activados por la vía alterna, b) activados por la vía clásica y c) sin tratamiento después de la infección con *M. bovis* BCG expresando la proteína verde fluorescente. $p > 0.05$

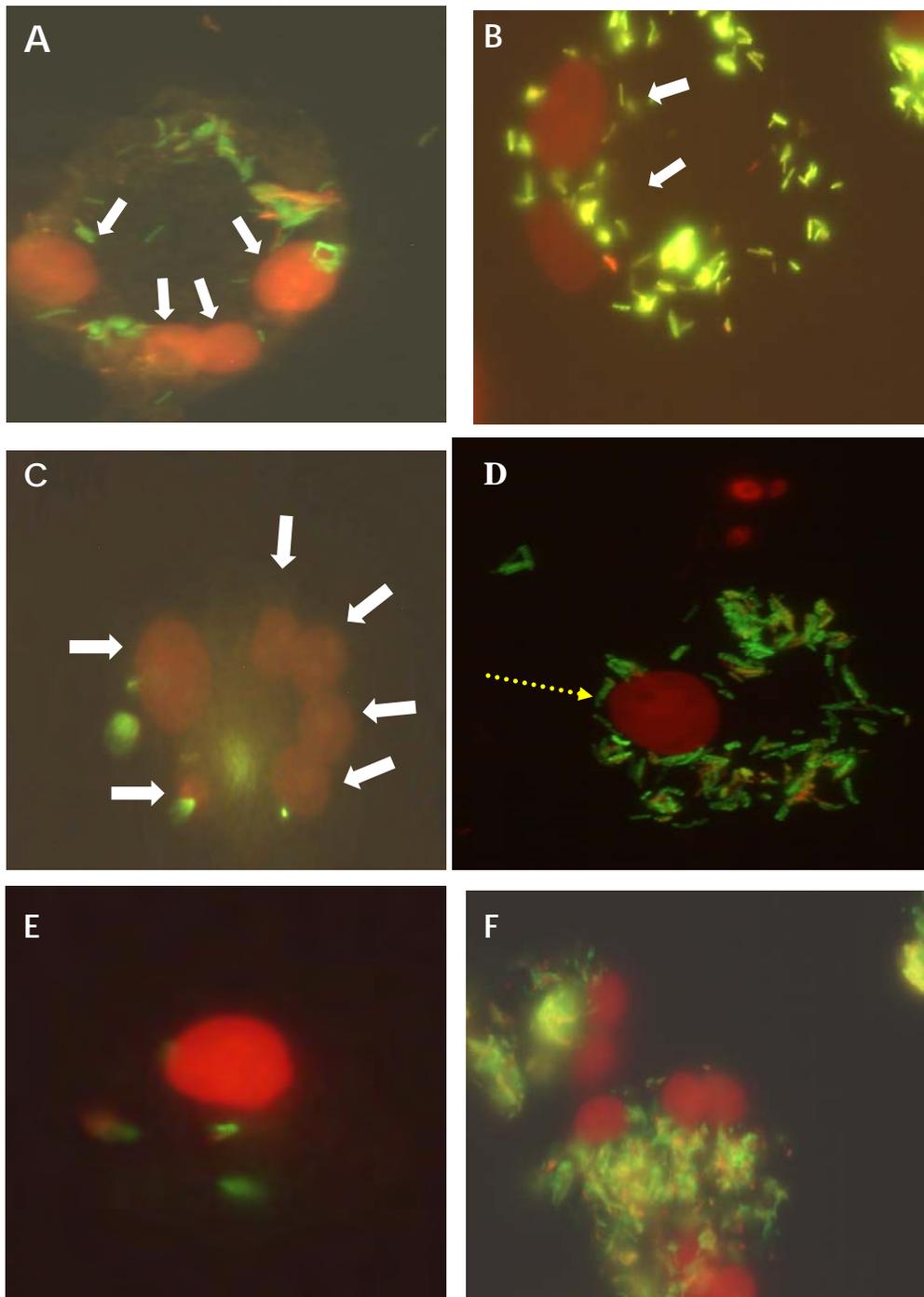


Fig. 16(b) Formación de células gigantes multinucleadas con núcleos a la periferia (flechas) y citoplasmas fusionados conteniendo a *Mycobacterium bovis* BCG-GFP (en verde) (A, B y C), de igual manera se observan a las micobacterias contenidas en los macrófagos bovinos, nótese el numero de bacterias contenidas en un solo macrófago bajo el tratamiento con LPS (D), macrófago bajo estimulación con rbIL-4 con solo dos bacterias intracelulares (E) y macrófagos sin ningún tratamiento conteniendo a las micobacterias intracelulares (F). Aumento 100X

FIGURA 17.

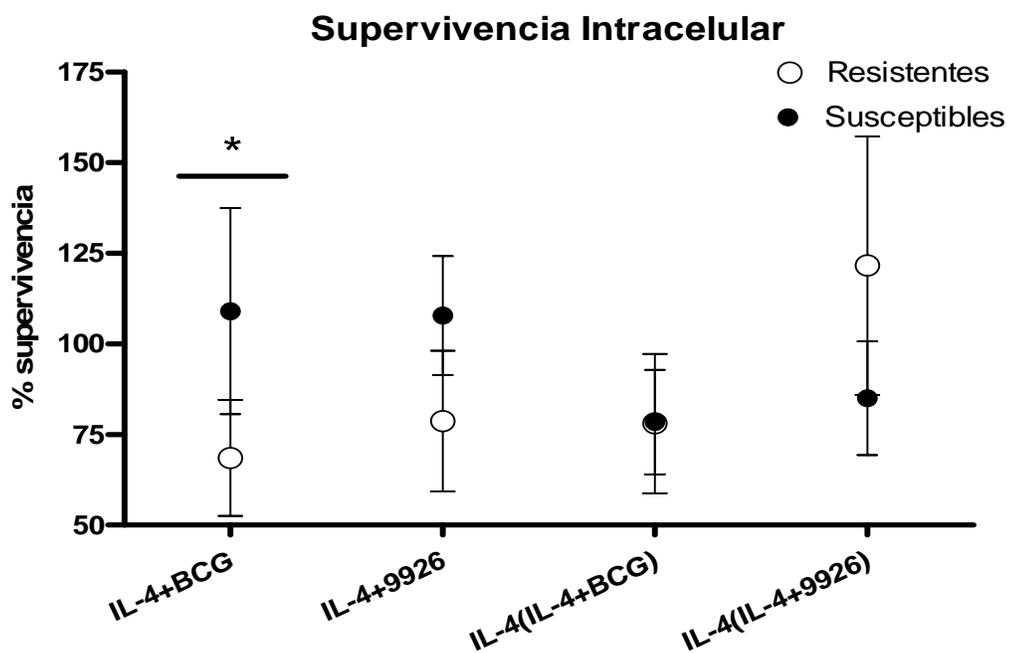


Fig 17 Porcentaje de supervivencia intracelular de macrófagos bovinos activados por la vía alterna mediante la incubación con rbIL-4 e infectados con *M. bovis* 9926 a una MOI de 10:1. $p \leq 0.01$

FIGURA 18.

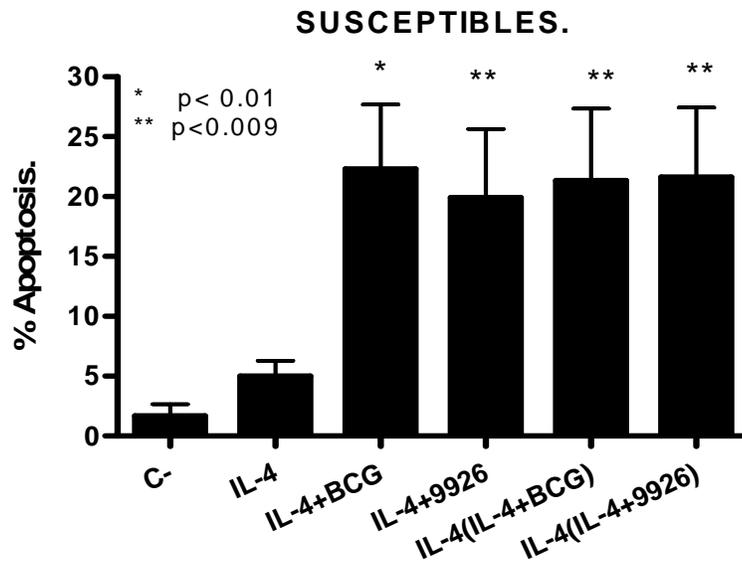


Fig.18. Porcentaje de fragmentación de DNA en macrófagos procedentes de animales susceptibles activados por la vía alterna mediante la incubación con rbIL-4 e infectados con *M. bovis* 9926 a una MOI de 10:1. $p \leq 0.01$.

FIGURA 19.

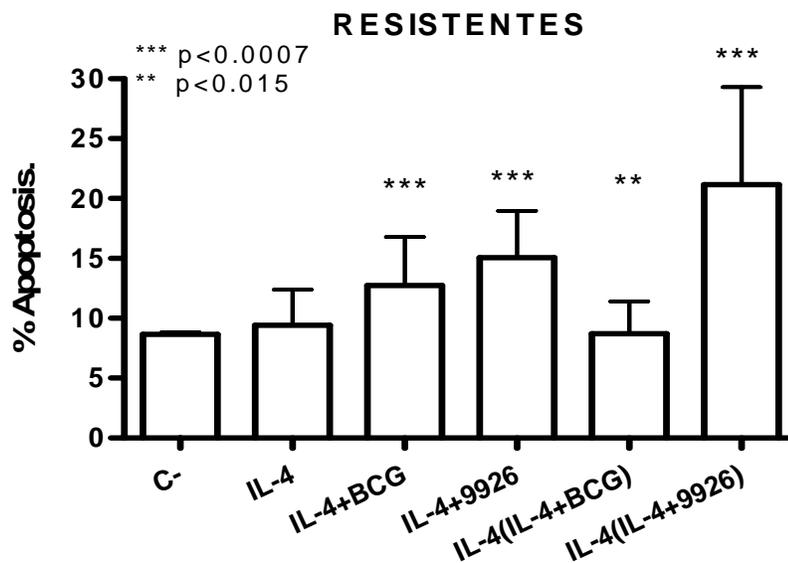


Fig. 19. Porcentaje de fragmentación de DNA en macrófagos procedentes de animales resistentes activados por la vía alterna mediante la incubación con rbIL-4 e infectados con *M. bovis* 9926 a una MOI de 10:1. $p \leq 0.0002$

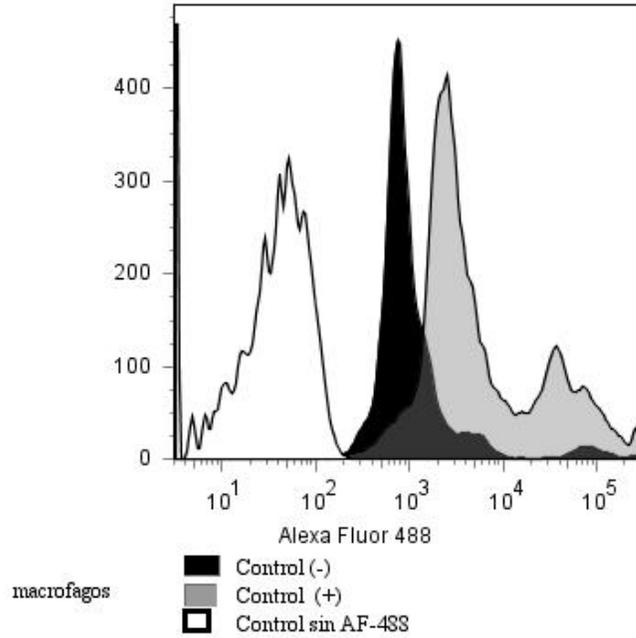


Fig 20.- Se muestra en el grafico las medias de florescencia de macrófagos bovinos sin tratamiento los cuales sirvieron como controles positivo y negativo así como un control sin tinción de Alexa Flúor 488 para observar la autoflorescencia de dichas células.

12.- SOLUCIONES.

ANTICOAGULANTE ACD

Citrato trisódico	22.0	g
Acido cítrico	8.0	g
Glucosa (dextrosa)	24.5	g
Agua destilada c.b.p.	1000.0	ml

pH inicial 5.0

PBS 10 X

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

PBS 1 X

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

Ajustar a pH 7.4 y filtrar en poro de 22 μ m.

CITRATO

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

PBS-CITRATO

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

Ajustar a pH 7.4.

NaCl 1.5 M + NaH₂PO₄

Cloruro de sodio	8.77	g
Fosfato de sodio monobásico	1.20	g
Agua c.b.p.	100.00	ml

CRPMI

RPMI medium 1640	500.0	ml
L-glutamina	5.5	ml
MEM-no aminoácidos esenciales	5.5	ml
Piruvato de sodio	5.5	ml
Bicarbonato de sodio al 7.5%	12.0	ml

BSA 5% (p/v)

Albúmina sérica bovina cristalina	50.0	g
Agua destilada estéril c.b.p.	1000.0	ml

TWEEN 20 AL 0.5%

Tween20	0.5	ml
Agua destilada estéril c.b.p.	99.5	ml

PERCOLL-STOCK

Percoll comercial	10	partes
NaCl 1.5 M + NaH ₂ PO ₄	1	parte

Esterilizar todas las soluciones por filtrado en poro de 0.22 μ m.

17.- GRADIENTE DE PERCOLL.

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

Se requiere utilizar la suspensión de Percoll-trabajo a una gravedad específica (SG) de 1.0770. Para obtener esta gravedad específica se añade al Percoll-stock una serie de soluciones en donde cada una de ellas posee una SG particular y así finalmente se obtiene la SG deseada. Sin embargo, las SG de cada solución adicionada puede equivaler al Índice de Refracción (RI) de las mismas y con éste índice obtener los mismos resultados que al utilizar las SG. El RI del Percoll-trabajo equivalente a la SG=1.0770 es el RI=1.3460 y es el que se busca obtener al final para poder realizar la centrifugación isopícnica con Percoll.

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

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

* Variación máxima deseada de ± 0.0001 .

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

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

X= ml de PBS por ml de suspensión final

a = SG del PBS - 1

b = SG de la BSA - 1

c = SG del Citrato - 1

d = SG del Percoll - 1

Determinar los volúmenes de cada sustancia:

Volumen en ml		
PBS	=	(X)(Volumen final en ml)
BSA	=	0.1(Volumen final en ml)
Citrato	=	0.1(Volumen final en ml)
Percoll	=	(0.8 - X)(Volumen final en ml)

Realizar todas las mediciones de índice de refracción y el cálculo de los volúmenes de las soluciones y preparar la suspensión de Percoll-trabajo el mismo día que se utilizará.