



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

ASOCIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE VITAMINA D
(25(OH)D₃) CON LA CONDICIÓN DE REACTOR A LA TUBERCULINA Y EL
CONTROL DEL CRECIMIENTO INTRACELULAR DE *Mycobacterium bovis*
EN MACRÓFAGOS DE BOVINOS NATURALMENTE EXPUESTOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

SOFÍA LÓPEZ CONSTANTINO

TUTOR

EDGAR ALFONSECA SILVA, FMVZ UNAM

COMITÉ TUTOR

GLADYS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALEZ I.I.B, UNAM

JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO, FMVZ UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi madre Lic. Teresa de Jesús Constantino López, las palabras no alcanzan para explicar la gratitud que te tengo, gracias por tus enseñanzas porque en mi mundo tu eres yoda y yo soy un jedi.

A mi padre Lic. Exal López Ventura que está a solo una llamada de distancia de su princesa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, proyecto PAPIIT-IN220615 “Evaluación del efecto inmunomodulador de la vitamina D en la viabilidad de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino” por el financiamiento para la realización de esta investigación.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología por la beca económica otorgada a la estudiante para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Beatriz Arrellano Reynoso por su asesoría como académico invitado en el comité tutor.

A Ricardo, Pedro y Paloma por ser la familia que formas estando fuera de casa.

A Pedro Pablo Vera por su amistad incondicional

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. Introducción.....	9
2. revisión de literatura.....	13
2.1 Agente etiológico	13
2.2 Patogenia de la tuberculosis bovina	14
2.3 Interacción de Mycobacterium bovis con el sistema inmune del hospedero	16
2.4.1 Vitamina D y la inmunidad innata	18
2.4.1.1 Síntesis de la vitamina D	18
2.4.1.2 Significancia inmunológica de la vitamina D	20
2.5 Situación actual de la tuberculosis bovina	21
2.6 Diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	22
2.6.1 Prueba de hipersensibilidad retardada	22
2.6.2 Prueba de Interferón Gamma (IFN- γ)	25
2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
3. HIPÓTESIS	27
4. objetivos	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. diseño experimental	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1 Localización de la zona de estudio.	29
6.2 Objeto de estudio.....	29
6.3 Evaluación de la concentración sérica de calcidiol (25(OH)D ₃).....	30
6.3.1 Determinación del tamaño de muestra para medir la concentración sérica de calcidiol	30
6.4 Técnicas de muestreo para confirmar el resultado de la prueba de tuberculina	31
6.6 Macrófagos derivados de Monocitos de Bovino (MDMB)	34

6.7 Cosecha de Macrófagos	35
6.8 Preparación de inóculo	35
6.9 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	36
6.10 Inmunomodulación del calcidiol en macrófagos infectados con M. bovis ..	36
6.11 Tratamientos	37
6.12 Ensayo microbicida	38
6.13 Ensayo de producción de ON	40
6.14 Asociación la concentración sérica de 25(OH)D ₃ con el estatus PPD y asociación de la concentración de calcidiol con la capacidad microbicida de los macrófagos	40
6.15 Determinación de la capacidad microbicida utilizando plasmas de animales PPD- y PPD+	41
7. RESULTADOS	42
7.1 Confirmación de la exposición natural a Mycobacterium bovis	42
7.2 Confirmación de la condición a la prueba de tuberculina (PPD)	43
7.3 Asociación de la concentración sérica de vitamina D con la condición de PPD	44
7.4 El plasma de los bovinos PPD (-) mejora la capacidad de controlar el crecimiento intracelular de M. bovis AN5 en MDMSP	45
7.5 La producción de ON en MDMSP infectados con Mbo AN5 es mayor utilizando plasma de bovinos PPD(-)	47
7.6 Asociación de la alta concentración sérica de calcidiol con una mejor capacidad del macrófago bovino para controlar el crecimiento intracelular de M. bovis	48
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIÓN	54
10. BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. PCR anidada para el gen <i>Mpb70</i>	42
Figura 2. Producción de interferón gamma y medición con el Kit BOVIGAM®.	43
Figura 3. Concentraciones séricas de vitamina D (calcidiol)..	44
Figura 4. Porcentaje de sobrevivencia de <i>M. bovis</i> AN5 en MDMSF con una MOI de 2:1..	45
Figura 5. Producción de ON en macrófagos de bovino infectados <i>M. bovis</i> AN5 a una MOI de 5:1.....	47
Tabla 1. Resultados PCR.....	42

RESUMEN

La vitamina D es un importante modulador de la respuesta inmune innata y concentraciones inferiores a 30 ng/mL en bovinos son insuficientes para inducir una respuesta inmune adecuada contra patógenos intracelulares; lo cual sugiere que la eficacia de la respuesta inmune es altamente dependiente de la biodisponibilidad de la vitamina D (25-OH-D₃). Este trabajo ofrece un panorama tanto *in vitro* como *in vivo* de la modulación de la respuesta inmune mediada por vitamina D en una población de ganado bovino lechero de la raza Holstein Friesian naturalmente expuesta a *M. bovis*. Se confirmó el estatus PPD de los animales por medio de un ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA) y se demostró la exposición natural a *M. bovis* por PCR punto final. Se observó que los bovinos PPD negativos también se muestran negativos a IGRA y tienen mayor concentración sérica de Vitamina D ($\bar{x}=87.12$ ng/ μ L \pm 18.54) en comparación con los PPD positivos ($\bar{x}=45.86$ ng/ μ L \pm 13.43). Se demostró en los animales de este estudio, que la concentración de la vitamina D está relacionada a la reactividad al PPD. Para evaluar *in vitro* la modulación que produce la vitamina D en los macrófagos bovinos para restringir el crecimiento intracelular de *M. bovis*, se realizaron ensayos microbicidas y se determinó la sobrevivencia intracelular de la micobacteria y la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos expuestos a diferentes concentraciones de vitamina D. Se encontró que altas concentraciones de vitamina D (>87.12 ng/mL) mejoran la capacidad microbicida de los macrófagos bovinos para combatir a *M. bovis*. La vitamina D modula la respuesta inmune innata del bovino y favorece la actividad micobactericida de sus macrófagos.

Palabras clave: Vitamina D, PPD, *Mycobacterium bovis*, ensayo microbicida

Vitamin D is an important modulator of the innate immune response and concentrations lower than 30 ng/mL in cattle are insufficient to induce an adequate immune response against intracellular pathogens; which suggests that the efficacy of the immune response is highly dependent on the bioavailability of Vitamin D (25-OH-D₃). This study shows a panorama both *in vitro* and *in vivo* of the modulation of the immune response mediated by Vitamin D in a population of Holstein Friesian breed dairy cattle naturally exposed to *M. bovis*. The PPD status of the animals was confirmed by an interferon gamma release assay (IGRA) and natural exposure to *M. bovis* was demonstrated by endpoint PCR. It was observed that PPD negative cattle is also IGRA negative and has a higher serum concentration of Vitamin D ($\bar{x} = 87.12 \text{ ng} / \mu\text{l} \pm 18.54$) compared to PPD positive ($\bar{x} = 45.86 \text{ ng} / \mu\text{l} \pm 13.43$). It was shown in the animals of this study, that the concentration of Vitamin D is related to the PPD reactivity. In order to evaluate *in vitro* modulation produced by Vitamin D in bovine macrophages to restrict the intracellular growth of *M. bovis*, kill assays were performed and the intracellular survival of mycobacteria and the production of nitric oxide (ON) in exposed macrophages were determined at different concentrations of Vitamin D. It was found that high concentrations of Vitamin D (>87.12 ng/mL) improve the microbicidal capacity of bovine macrophages to fight *M. bovis*. Vitamin D modulates the innate immune response of cattle and favors the mycobactericidal activity of its macrophages.

Key words: Vitamin D, PPD, *Mycobacterium bovis*, kill assay

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina causada por *Mycobacterium bovis* afecta a una gran variedad de animales domésticos y silvestres, se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos. Es frecuente en países subdesarrollados en donde ocasiona pérdidas económicas graves, ya sea por la muerte del ganado bovino, por la presencia de la enfermedad crónica y por restricciones en la comercialización (1).

En México se han estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan solo por el desecho de ganado enfermo. Se estima además que la tuberculosis disminuye la producción de leche en un 17%. Por otra parte, la exportación de ganado bovino en pie, puede verse afectada por la presencia de esta enfermedad, representando una pérdida de divisas de 450 millones de dólares anuales (2).

El diagnóstico de la tuberculosis bovina se realiza por medio de la prueba de intradermoreacción o tuberculina, por cultivo de las micobacterias y el análisis histopatológico. Además, se disponen de técnicas moleculares para la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano (2).

México, dentro de sus políticas de control, tiene vigente la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995: Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) (2). La cual menciona la cuarentena de los animales reactivos y la eliminación de los animales infectados, unidos al decomiso y examen bacteriológico e histopatológico de todo granuloma que se detecte en los rastros.

En cuanto a la prevención de la tuberculosis bovina en producciones ganaderas, oficialmente se dispone de medidas zoonosanitarias que tienen por objeto evitar la introducción y diseminación de la tuberculosis en la unidad de producción (2, 3). También se han implementado medidas para la identificación de las fuentes de infección, sin embargo, ninguna de estas medidas oficiales de

control y prevención de la tuberculosis bovina tiene por objetivo mejorar la respuesta inmune del animal ante el patógeno.

El apropiado funcionamiento de la respuesta inmune en una infección por *M. bovis* en bovinos, es un tema polémico debido a los diversos factores que intervienen para un correcto funcionamiento del sistema inmune, que dependerá tanto del patógeno, del medio ambiente y de las características del animal como la edad, la variabilidad genética y la desnutrición que son factores clave para el desarrollo de la tuberculosis activa (4,5).

La respuesta inmune innata, es la primera línea de defensa del hospedero, está compuesta fundamentalmente de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés). Estos receptores se encuentran en la mayoría de las células del sistema inmune, especialmente en los macrófagos; los cuales son células involucradas en la respuesta inmune a la infección por *M. bovis*. Se sabe que la activación de estos PRRs en los macrófagos resulta en la producción de moléculas de actividad antimicrobiana como catelicidinas, defensinas y óxido nítrico, las cuales son dependientes de la vía de señalización de la vitamina D (5).

Se sabe que la vitamina D ó calcidiol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) es un regulador de la inmunidad innata en el ganado bovino. Ya que células del sistema inmunitario, como el macrófago, tienen la capacidad de hidroxilar la molécula a su metabolito activo el calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), el cual se une a su receptor (VDR), que es un transcriptor nuclear que se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes que codifican para la producción de péptidos antimicrobianos y óxido nítrico (ON) (5,6). El ON es una molécula ampliamente conocida por sus efectos micobactericidas. Ensayos *in vitro* han demostrado que la producción de ON en el macrófago se incrementa en presencia de Vitamina D. El macrófago es la célula de mayor importancia en la infección por *M. bovis*, por lo que su actividad microbicida puede ser potencializada por la presencia de la vitamina D (7).

En cuanto a la concentración sérica de la vitamina D, estudios recientes han demostrado que los niveles séricos bajos de vitamina D se asocian con mayor

incidencia de tuberculosis en humanos (8). También se ha demostrado que la población afroamericana presenta menor concentración sérica de vitamina D y esto la hace más susceptible a padecer tuberculosis. Se encontró que los macrófagos obtenidos de las personas afroamericanas y que fueron infectados *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis* no fueron tan eficientes para controlar el crecimiento bacteriano en comparación con la eficacia de los macrófagos de las personas caucásicas. Finalmente, esto se pudo asociar a la concentración de vitamina D presente en el suero utilizado para el cultivo de los macrófagos, el cual era más elevado en las personas caucásicas. Se demostró que esta capacidad de controlar el crecimiento intracelular está relacionada con una mayor concentración de vitamina D en personas caucásicas (7, 8).

El metabolismo de la vitamina D en el organismo inicia cuando el animal se expone a rayos UV a una longitud de onda de 280-320 nm y promueve que el ergosterol en la piel se convierte en provitamina D, posteriormente ésta pasa al torrente sanguíneo y llega al hígado donde es hidroxilada. Después de este proceso regresa al torrente sanguíneo para llegar a riñón. Dicho proceso favorece que la concentración sérica de vitamina D se encuentre en concentraciones apropiadas, pero se ha demostrado en bovinos que concentraciones séricas inferiores a 30 ng/mL puede comprometer su sistema inmunológico. Esta idea surgió desde la época de los pre-antibióticos donde la incidencia de personas enfermas de tuberculosis se incrementaba en el invierno cuando la exposición a rayos UV era menor (9).

La óptima concentración sérica de vitamina D, para un apropiado funcionamiento del sistema inmune en bovinos, todavía no ha sido determinado. Aunque existen estudios *in vitro* con macrófagos donde se demuestra que los efectos de la vitamina D, se hacen evidentes a una concentración sérica mínima de >30 ng/mL y una óptima que oscila entre los 100 ng/mL; pero esto solo ha sido probado *in vitro* con la forma sintética de la vitamina D. Además, se ha demostrado en bovinos, que concentraciones séricas inferiores a 30 ng/mL pueden comprometer su sistema inmunológico (10).

Actualmente, existen estudios que demuestran que los bovinos enfermos de paratuberculosis tienen menor concentración de vitamina D. Y que la localización geográfica y la época del año están relacionadas a la concentración sérica de vitamina D. Se observó que a finales del verano las concentraciones séricas de vitamina D son superiores en comparación con las encontradas en el invierno. Esta condición se podría relacionar con una mayor incidencia de enfermedades que se presentan en la época de invierno en las producciones bovinas (10,11,12). Sin embargo, en la actualidad no se sabe con certeza, si la concentración sérica de vitamina D en los bovinos está asociada con el estatus a la prueba de la tuberculina y si ésta se relaciona con una mejor capacidad microbicida de los macrófagos de bovinos que se encuentran naturalmente expuestos a *M. bovis*.

En el presente trabajo se estudió tanto *in vitro* como *in vivo* de la modulación de la respuesta inmune mediada por vitamina D (calcidiol), en una población de ganado bovino lechero, de la raza Holstein Friesian, naturalmente expuesta a *M. bovis*. Como parte del estudio se confirmó el estatus de PPD de los animales por medio de la respuesta inmune medida por células a antígenos micobacterianos, con la subsecuente detección de interferón gamma (IFN- γ) y por un PCR punto final de muestras de exudado nasal; que demostró la presencia de la micobacteria en el hato. Así mismo, se estudió *in vitro* la modulación que produce el calcidiol a diferentes concentraciones, en los macrófagos de bovino para restringir el crecimiento intracelular de *M. bovis*, mediante ensayos microbicidas y determinación de la producción de ON.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

M. bovis pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) el cual está constituido por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprea* y *M. pinnipedii*. Las bacterias de este complejo son genéticamente similares. *M. tuberculosis* infecta más de un tercio de la población mundial humana y también es capaz de infectar animales. *M. bovis* tiene amplio espectro de hospederos afectando entre otros a bovinos, perros, cabras y al hombre (13).

Es un bacilo que mide aproximadamente 0.5 μm y longitud variable. No producen esporas y carecen de flagelos. Las micobacterias contienen abundantes lípidos, especialmente en su pared celular que explican la ácido-resistencia y también las propiedades patógenas e inmunológicas. Los micósidos de superficie (principalmente los glucolípidos y los peptidoglucolípidos) determinan las características de las colonias, la especificidad serológica y la sensibilidad a los bacteriófagos de las micobacterias. Se considera que cooperan en asegurar la supervivencia de las bacterias en el interior de los macrófagos (14).

Las capas subsuperficiales de ácidos micólicos ramificados de cadena larga y sus ésteres constituyen la mayoría de los lípidos de la pared celular. En cierto modo, la ácido resistencia depende de estos constituyentes de la pared celular. Los ácidos micólicos están enlazados con la capa más interna de peptidoglucano por medio de arabinogalactanos. Los sulfolípidos (o sulfátidos) y un fosfolípido, el fosfatil inositol manósido (PIM), mano-oligosacáridos (Man-LAM), lipomananos (LM) y manoglicoproteínas constituyen también la pared bacteriana (14).

Se estima que el 25% del peso seco de las micobacterias corresponde a lípidos o glucolípidos; el 40% de ellos son moléculas de ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, que es un disacárido de α -D-glucosa formado por residuos de α -D-glucopiranosil (1-1)- α -glucopiranososa (15).

2.2 Patogenia de la tuberculosis bovina

Mycobacterium bovis es propagada por vía horizontal mediante inhalación o ingestión, ya sea directamente de animales infectados o indirectamente de pastos contaminados, agua o fómites. La transmisión vertical es posible pero no es muy común; por lo tanto, la inhalación de *M. bovis* es la ruta más importante de infección (16).

La infección inicia con la acumulación de *M. bovis* en el pulmón o sobre las mucosas de la faringe o intestino. En cuanto a la dosis de infección experimentos *in vivo*, han demostrado que con la administración intranasal de *M. bovis* a una concentración de 10^4 - 10^7 de UFC es posible desarrollar la enfermedad en bovinos. Aunque otros autores mencionan que administrando menores dosis de *M. bovis* se puede desarrollar experimentalmente la enfermedad de manera similar a la presentación natural (17).

M. bovis tiene propiedades que le permiten invadir, sobrevivir y multiplicarse en células del hospedero. En cuanto a su capacidad de invadir, se ha demostrado que *M. bovis* tiene adhesinas como la hemoaglutinina de unión a heparina (heparin-binding hemagglutinin: HBHA) y las proteínas de entrada a células del mamífero (mammalian cell entry: MCE) que son cruciales para la virulencia del microorganismo. Las adhesinas facilitan la unión de la bacteria con células epiteliales y fagocíticas como son los macrófagos alveolares (18). Dentro del macrófago, *M. bovis* se encuentra en el fagosoma, el cual madura propiciando un ambiente hostil para la bacteria, posteriormente se lleva a cabo la unión fago-lisosomal que contribuye a la destrucción del microorganismo. Se sabe que *M. bovis* puede manipular el tráfico fago-lisosomal, mediante el bloque de la bomba de protones, evitando la maduración del fagosoma y la eventual unión con el lisosoma. Además, se ha demostrado que *M. bovis* puede escapar al citoplasma o permanecer dentro de un fagosoma inmaduro por un largo tiempo donde también puede replicarse (19).

Una vez que la micobacteria se localiza en el interior de las células fagocíticas (principalmente células dendríticas), éstas viajan a través del sistema linfático hacia los linfonodos regionales, donde ocurre la presentación de antígenos a los linfocitos T vírgenes. Los posteriores eventos inmunológicos ayudan a que los macrófagos mejoren su capacidad de destruir bacterias y también ayuda a la quimiotaxis de los diferentes grupos celulares que se localizaran alrededor del foco de infección para desarrollar una respuesta inflamatoria y poder contener a la micobacteria (20).

Microscópicamente las lesiones se observan en una disposición celular concéntrica alrededor del agente patógeno. Predominan desde adentro hacia fuera: macrófagos activados y modificados (células epitelioides y de Langhans), linfocitos T y fibroblastos. Pasado algunos días, se observa al centro del granuloma un proceso de necrosis de caseificación determinado por la muerte sucesiva de células inflamatorias. Al cabo de algunas semanas, la lesión es encapsulada por tejido conectivo que más tarde puede mineralizarse en un proceso de esterilización de la lesión. (14)

Si el sistema inmune no detiene la multiplicación de la bacteria, la infección se propaga y puede ocurrir necrosis y erosión de la pared alveolar del pulmón (puerta abierta). Esto trae como consecuencia la excreción de *M. bovis* por aerosol y deglución de micobacterias y por consiguiente eliminación por las heces. También puede existir difusión por vasos linfáticos o sanguíneos a tejidos linfoides y parenquimatosos causando una tuberculosis generalizada, teniendo como consecuencia la eliminación de micobacterias en moco, orina y leche (15).

Una vez que el bovino se ha expuesto a *M. bovis* tiene la capacidad de resistir el desafío ó puede desarrollar la enfermedad. Esto depende varias características como la edad, el funcionamiento del sistema inmune, la desnutrición o la presencia de ciertas enfermedades (4). Por lo que se pueden encontrar animales que desarrollan cambios patológicos notables en la inspección

post-mortem ó pueden existir animales que no desarrollan evidencia de la infección.

2.3 Interacción de *Mycobacterium bovis* con el sistema inmune del hospedero

El control inmunológico de la infección por *M. bovis* empieza con el reconocimiento de los componentes estructurales de la pared celular que entre otros son peptidoglucano, ácidos micólicos, arabinogalactán, lipoarabinomananos (LAM), fosfatidil inositol manosido (PIM) y manoglucoproteínas (21). El reconocimiento de estos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) es posible a través de los receptores reconocedores de patrones (PRR) dentro de éstos hay un grupo de proteínas transmembranales que se llaman receptores semejantes a Toll (TLR), los recetores tipo NOD (NLR), lectinas tipo C, scavenger y receptores complemento (22).

La interacción de los PAMPs de *M. bovis* con los PPR causa la activación de diversos mediadores de la inmunidad innata relacionados con la fagocitosis de la micobacteria y vías de señalización relacionadas con la producción de IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-18, TNF- α y IL-1 β (23, 24). Los TLR 2 y 4 tienen un papel importante en la respuesta de la inmunidad innata contra *M. bovis* (25). La activación de los macrófagos por TLR 2 activa el factor nuclear- κ B (NF- κ B), responsable de la expresión de genes de citosinas para iniciar una respuesta inmune eficiente contra la micobacteria (26).

La respuesta inmunológica celular hacia *M. bovis* se inicia con la participación de los linfocitos T (α/β CD4+ y CD8+ γ/δ) siendo el principal efector el linfocito CD4+, involucrado en el reconocimiento de los antígenos que son procesados en el fagosoma y presentados como pequeños fragmentos peptídicos anclados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) II en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Al ocurrir la presentación de antígenos, los linfocitos T CD4+ se activan, proliferan y diferencian hacia un perfil tipo Th1 (26)

El establecimiento de una respuesta inmunitaria tipo Th1, se caracteriza por la producción de IFN- γ , IL-12, IL-2 y TNF- α . IFN- γ es esencial para la activación los macrófagos y la presentación de antígenos, promueve la diferenciación celular, adhesión y apoptosis. En macrófagos el IFN- γ induce estallido respiratorio por medio de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI). La función de TNF- α en un ambiente Th1 es la regulación de la respuesta inflamatoria y estimulación de la producción de IL-1. Además, contribuye a la inducción de RNI y ROI en los macrófagos para combatir a *M. bovis*. En conclusión, el perfil de citosinas Th1 está relacionado con la activación de la respuesta microbicida y la migración de diferentes tipos celulares a los tejidos infectados por *M. bovis*. Además, promueve la migración a los espacios bronco-alveolares de monocitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y linfocitos T CD4+ y CD8+ (27,28).

Por otra parte, los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos que han sido procesados en el citosol y que son presentados por moléculas MHC I. Estos se encargan de la lisis de las células infectadas por medio de la liberación de granzimas y perforinas que ejercen un efecto directo en la micobacteria y en las células infectadas a través del ligando FAS (26).

Con respecto a las funciones específicas de las células B en la respuesta inmune a la tuberculosis, generalmente se consideran de apoyo, más que esenciales. Las funciones atribuidas a las células B en la respuesta a la tuberculosis incluyen presentación de antígenos, acciones inmunomoduladoras de complejos inmunes y citotoxicidad dependiente de anticuerpos (28).

Por lo tanto, la respuesta inmune celular es tanto el mecanismo de defensa y la causa de formación de granulomas observados en las infecciones por *M. bovis*. Y el conjunto de mecanismos inmunológicos desarrollados en el huésped y la eficacia para poder combatir la enfermedad puede variar. Debido a que, una vez dentro del macrófago *M. bovis* puede ser destruida por los diferentes mecanismos microbicidas o sobrevivir y utilizar al macrófago para multiplicarse, viajar dentro de

éste y ganar acceso a otros tejidos por medio de la circulación sanguínea o linfática. El éxito de contener y en algunos casos, eliminar a la bacteria dentro del macrófago, depende de muchos factores inherentes a la bacteria, al hospedador y al ambiente que rodea a ambos (27).

2.4.1 Vitamina D y la inmunidad innata

La vitamina D fue descubierta hace más de un siglo como un factor en la leche que impide el raquitismo. Por mucho tiempo se ha asociado al mantenimiento del balance del calcio, pero la vitamina D contribuye a otros procesos fisiológicos como activación de moléculas antimicrobianas en células de la respuesta inmune. La concentración en el suero de vitamina D (calcidiol) es utilizada para el diagnóstico y tratamiento de la osteomalacia y osteoporosis sin embargo, recientemente ha tomado interés su papel en enfermedades crónicas como: diabetes, síndrome metabólico y tuberculosis. En estudios recientes en humanos, se han encontrado bajas concentraciones de vitamina D en el suero que se han asociado con un alto riesgo de desarrollar tuberculosis activa (8,29).

2.4.1.1 Síntesis de la vitamina D

La vitamina D incluye varios componentes (calciferoles) de estructura esteroide. Los miembros más importantes son: ergocalciferol (vitamina D₂), colecalciferol (D₃), 25-hidroxicolecalciferol (25-D₃), las provitaminas ergosteroles (pro-vitamina D₂), 7-dehidrocolesterol (pro-vitamina D₃) y la forma biológica activa 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol). Esta última puede ser completamente sintetizada a través del metabolismo y esta es la razón porque la forma activa de la vitamina D ó calcitriol no se define como una vitamina en el sentido más estricto; debido a que su síntesis y modo de acción la clasifican como una hormona esteroide (9).

El metabolismo de la vitamina D empieza con el 7-dehidrocolesterol el cual se rompe por la radiación UV (longitud de onda 290-315 nm) en la piel. En este proceso y en casos de exposición larga a los rayos UV se forma el colecalciferol y otros metabolitos como luministerol y taquisterol; estos últimos dos no tienen actividad sobre el metabolismo de la vitamina D. Por lo tanto, la intoxicación con vitamina D por exposición excesiva no es posible. Una vez formado el colecalciferol en la piel se dirige a torrente sanguíneo donde circula unida a la proteína de unión a vitamina D (DBP) y es transportada al hígado. En las células del parénquima hepático el colecalciferol es hidroxilado en su posición C-25 a calcidiol (25-OH-D₃). La reacción es catalizada por el citocromo P450. En esta etapa del proceso la síntesis de la vitamina D se regula de manera ineficiente. Por lo tanto la concentración en plasma de la 25(OH)D₃ es proporcional a la vitamina D obtenida de los alimentos y de la exposición a los rayos UV. Por esto la concentración en plasma de 25(OH)D₃ es considerado el marcador más importante del estatus de la vitamina D (9,29).

El último paso de la activación de la vitamina D ocurre en los túbulos contorneados proximales del riñón. En donde el complejo 25-OH-D₃ y DBO es internalizada por el receptor megalina, el cual es un miembro de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad. La 25-OH-D₃ es hidroxilada en el C-1, lo que resulta en la forma biológica activa calcitriol. La enzima responsable es la 1 α -hidroxilasa la cual es controlada estrictamente por la 1,25-dihidroxitamina D₃ 24-hidroxilasa (24-hidroxilasa). Calcio y fosfato son los represores más importantes y la parathormona es el más eficiente inductor de la enzima. En consecuencia, la síntesis de calcitriol es incrementada en casos de insuficiencia de calcio y fósforo en la dieta, en contraste la síntesis de calcitriol es inhibida en el caso de suficiente suplemento de estos minerales. La síntesis es adicionalmente controlada por la actividad de la 24-hidroxilasa que es incrementada por calcio y fósforo. Esta enzima cataliza la oxidación del C-23 y C-24 del calcitriol que conduce al estado inactivo del metabolito (30).

Además de la síntesis por UV, la comida contribuye al suministro de la vitamina D. Las fuentes son: ergocalciferol proveniente de las plantas y colecalciferol de origen animal. Pero la mayoría de los alimentos contienen relativamente pequeñas cantidades de esta vitamina. Las grandes cantidades pueden obtenerse de aceite de hígado de bacalao, sardina, arenque y salmón. Los Alimentos de origen vegetal tienen poco contenido de vitamina D. Únicamente los hongos, levaduras, espinacas y algunos tipos de repollo contienen trazas de vitamina D₂ o su precursor ergosterol. La vitamina D no es termoestable y es alterada cuando se expone al oxígeno o la luz. La dieta contribuye únicamente con una pequeña porción del suministro sistémico (9).

2.4.1.2 Significancia inmunológica de la vitamina D

La forma activa de la vitamina D (calcitriol) dentro de las células como macrófagos y neutrófilos incrementa la expresión de proteínas antibacteriales y óxido nítrico. El efecto neto de esas acciones es para incrementar la destrucción bacteriana en una variedad de tipos celulares. La eficacia de esta respuesta es altamente dependiente de la biodisponibilidad de la vitamina D, en otras palabras, la disponibilidad en circulación de 25-hidroxivitamina D para su conversión intracrínica a 1,25(OH)₂D₃ por la enzima 25-hidroxivitamina D-1α-hidroxilasa (Gen *CYP27B1*) (30).

La activación de moléculas microbicidas dentro de las células por parte de la vitamina D tiene suma importancia en las células fagocíticas como el macrófago. La célula principalmente involucrada en la infección en tuberculosis son los macrófagos alveolares por lo tanto los mecanismos moleculares involucrados en estas células en la modulación de la respuesta inmune por parte de la vitamina D son de suma importancia (31).

La vía de señalización de la vitamina D empieza con la fagocitosis de *M. bovis*, los macrófagos pueden iniciar respuestas celulares para *M. bovis* debido que expresan un heterodímero de TLR1 y TLR2. Los cuales reconocen a sus ligandos, que son los lipopolipéptidos bacterianos. Entre los genes inducidos por la unión de ligandos bacterianos a los heterodímeros TLR (bovinos TLR4) es *CYP27B1* y el receptor de vitamina D (*VDR*). La inducción de estos genes estimula la expresión intracrina de catelicidinas, proteínas antimicrobianas potentes. Las cuales son cruciales en la defensa de los macrófagos para matar a *M. bovis* después de haberlo fagocitado (10).

Cuando la 25-OH-D₃ cuando entra al macrófago es convertida a la forma activa Calcitriol (1,25(OH)₂D₃) en la mitocondria por *CYP27B1* y se une a los *VDR*. El calcitriol unido a los *VDR* es capaz de actuar como un factor principal de transcripción de catelicidinas, defensinas y ON. En el sistema inmune innato del bovino la 1,25(OH)₂D₃ incrementa el óxido nítrico (NO) y *RANTES/CCL5* en respuesta de los monocitos activados vía TLR4. Los monocitos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) a concentraciones de 1 y 10 nM de 1,25(OH)₂D₃ incrementan potencialmente la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la expresión de los genes *RANTES/CCL5*. *RANTES* es una potente quimiocina, que mejora el reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección (6).

2.5 Situación actual de la tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina tiene una distribución mundial en muchos países de América sigue siendo una de las mayores preocupaciones zoonosológicas. En México después de 29 años de campaña para el control y erradicación de la tuberculosis bovina, existen 25 estados con una prevalencia <0.50% de tuberculosis bovina. El departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) ha reconocido a esas 25 regiones de baja prevalencia permitiendo que 13 regiones puedan exportar con una sola prueba de tuberculina del lote y 11 regiones con prueba de lote y prueba de hato origen, solo la región

norte no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos (32).

En México se han estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan solo por el desecho de ganado enfermo. Se estima que la tuberculosis bovina además disminuye la producción de leche en un 17%, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia hasta en 15%, y la fertilidad en un 6%. Por otra parte, la exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América, puede verse afectada por la presencia de esta enfermedad, representando una pérdida de divisas de 450 millones de dólares anuales (32,33).

2.6 Diagnóstico de la tuberculosis bovina

La infección del ganado bovino con *M. bovis* se diagnostica por lo general en el animal vivo mediante reacciones de hipersensibilidad retardada. Habitualmente, la infección es subclínica; cuando se presenta, los síntomas clínicos no son específicamente distintivos de esta enfermedad y pueden incluir debilidad, anorexia, extenuación, disnea, inflamación de los nódulos linfáticos y tos, particularmente en casos de tuberculosis avanzada. Tras la muerte del animal, se diagnostica por técnicas histopatológicas y bacteriológicas. También se pueden utilizar técnicas con sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estas últimas no están oficialmente autorizadas en México. El cultivo bacteriano tradicional continúa siendo el método rutinario de confirmación de la infección (34).

2.6.1 Prueba de hipersensibilidad retardada

La prueba de tuberculina es un monitoreo de la reacción inmune a la inoculación de derivado proteico purificado (PPD); es la prueba más utilizada para la detección de animales infectados con *M. bovis* desde su desarrollo en 1930 (34). La prueba mide la inflamación cutánea como resultado una reacción de hipersensibilidad tardía después de la inoculación intradérmica del PPD. El PPD,

es un extracto antigénico derivado del cultivo de un bacilo tuberculoso en un medio sintético. Los PPDs que se producen son tres, obtenidos de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium*, Estas últimas, tuberculina bovina y aviar tienen aplicación veterinaria (33).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina NOM 031-ZOO-1995 (*Mycobacterium bovis*) y su modificación, para la realización de la prueba de tuberculina se emplean el PPD (derivado proteico purificado) bovino, y el PPD aviar, elaborados a partir de *M. bovis* y *M. avium* respectivamente. Y la cual se menciona que existen tres pruebas oficiales:

- Pliegue caudal. Se utiliza el PPD bovino, y es la prueba básica operativa de rutina, para los hatos que se desconoce su situación zoonosanitaria con respecto a Tuberculosis bovina.
- Cervical comparativa. En esta prueba se emplea el PPD bovino y el PPD aviar, es la única prueba autorizada para confirmar y descartar animales reactivos a la prueba del pliegue caudal. Se aplica en hatos ubicados en zonas en las se sospecha de la existencia de *M. bovis* y/o *M. avium*. Una vez confirmada la presencia de la infección por el laboratorio, esta prueba no se realiza.
- Cervical simple. Se hace uso del PPD bovino y su empleo está indicado para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis* o bien para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con animales infectados de *M. bovis*.

Para la clasificación de los resultados se emplean las siguientes categorías:

- Verdaderos positivos: Animales tuberculosos positivos a la prueba.
- Verdaderos negativos: Animales no tuberculosos negativos a la prueba.
- Falsos negativos: Animales tuberculosos, negativos a la prueba.
- Falsos positivos: Animales no tuberculosos, positivos a la prueba.

Aunque la prueba de tuberculina es la más usada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina tiene ciertos inconvenientes como: sensibilidad al Complejo *Mycobacterium avium*, lesiones en la piel, *Mycobacterium paratuberculosis* (Enfermedad de Johne), *Mycobacterium tuberculosis*, otros organismos del género *Mycobacterium*, otros organismos como *Nocardia* y causas fisiológicas (2, 32).

Las causas antes mencionadas son inconvenientes atribuidos a la PPD pero también existe anergia a la prueba. La anergia es definida simplemente como la falla de un animal con evidencias visibles de padecer tuberculosis a no presentar una respuesta palpable cutánea de hipersensibilidad retardada a las 72 horas post-inoculación de la tuberculina. Tienen la enfermedad, pero no se refleja en la tuberculinización. Existen varias teorías al respecto en las que se encuentran: la separación de los linfocitos que reaccionan ante los antígenos, la circulación de células supresoras adherentes, circulación de inhibidores séricos o antígenos micobacteriales y respuesta inflamatoria defectuosa (34).

Por lo tanto, el porcentaje de sensibilidad y especificidad se ve alterado por las causas antes mencionadas, actualmente se establece los siguientes valores (32):

Prueba	Sensibilidad	Especificidad
PPC	85-90%	95-98%
PCC	74%	98%
PCS	90-95%	90%

PPC: Prueba de pliegue caudal

PCC: Prueba cervical comparativa

PCS: Prueba cervical simple

2.6.2 Prueba de Interferón Gamma (IFN- γ)

Existe una prueba comercial de detección de IFN- γ que fue desarrollada en Australia en el año de 1980 y es recomendada por la OIE desde 1996 como una prueba auxiliar para confirmar el diagnóstico por la tuberculina. Actualmente en el mundo la mayoría de los programas de control de TB usan el BOVIGAM® como prueba paralela a la prueba de intradermorreacción con la finalidad de maximizar la detección de animales infectados con TB. El test consiste en dos etapas. La primera es coleccionar la muestra de sangre en tubos de heparina y transportados en el laboratorio donde las muestras son incubadas en la presencia de antígenos como PPD o mitógenos para verificar la viabilidad celular. Existen varios parámetros para la incubación de la muestra de sangre los cuales tienen la finalidad de incrementar la flexibilidad y la facilidad del uso del ensayo (35).

La segunda etapa es la recolección del plasma de las muestras de sangre que fueron incubadas con el antígeno y la detección de la producción de IFN- γ por una ELISA de tipo sándwich la cual se conoce como ensayo de IFN- γ (BOVIGAM®). La alta sensibilidad de IFN- γ comparado con la prueba de intradermorreacción es debido a que el IFN- γ detecta animales infectados de hasta 14 días pos-infección y 60-120 días antes que la prueba cervical comparativa. Los estudios han demostrado que resultado de tuberculina negativa pero IFN- γ positivo en animales infectados con *M. bovis* en hatos con Micobacterias endémicas por lo anterior han decretado la prueba de IFN- γ esencial en el control de los brotes de TB (36).

La detección temprana y desecho de los animales infectados con tuberculosis reduce el riesgo de infección para otros bovinos. La sensibilidad de la prueba es de 81.8% y especificidad de 99.1%. El desarrollo de esta técnica de IFN- γ ha hecho posible obtener resultados en aproximadamente 24 horas. Además, trabajos previos de infecciones experimentales en bovinos indican que ésta metodología de detección de IFN- γ puede detectar animales infectados a partir del día 14 pos-infección (37).

La alta sensibilidad y especificidad de Bovigam (IFN- γ) es una ventaja en comparación a la prueba de tuberculina, además que proporciona resultados más rápidos. Por lo anterior, es utilizada en programas de erradicación de tuberculosis bovina donde se requiere pruebas con alta sensibilidad (38).

2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El PCR puede ser aplicado para detectar a los miembros del complejo *M. tuberculosis* y es especialmente utilizada para la detección de *M. bovis* en muestras de tejido de bovino. La identificación rápida de cepas a nivel de complejo de *M. tuberculosis* puede llevarse a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el ARNr 16S y 23S, las secuencias de inserción IS6110 y IS1081, y se han utilizado genes que codifican proteínas específicas del complejo de *M. tuberculosis*, como MPB70 y el antígeno b de 38 kDa. Puede conseguirse la identificación específica de una cepa como *M. bovis* utilizando el PCR para la detección de una mutación en las posiciones nucleotídicas 285 del gen *oxyR* y gen *gyrB* y la presencia/ausencia de RD (Regiones de Diferenciación). Se ha evaluado exhaustivamente la PCR para la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas (hisopado nasal) en bovinos para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Los falsos positivos y los falsos negativos, sobre todo en muestras que contienen bajas cantidades de bacilos, han reducido la fiabilidad de esta prueba. La variabilidad en los resultados se ha atribuido al bajo número de copias de la secuencia diana por bacilo junto con un bajo número de bacilos. La variabilidad también se ha atribuido a métodos de descontaminación, procedimientos de extracción del ADN, técnicas de eliminación de inhibidores de la enzima polimerasa, controles internos, externos y procedimientos para la prevención de la contaminación cruzada. La mejora de la fiabilidad de la PCR como prueba práctica para la detección del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas frescas requerirá el desarrollo de procedimientos estandarizados y robustos. La contaminación cruzada es el principal problema con este tipo de aplicación y este es el motivo por el que deben utilizarse controles adecuados con cada amplificación (39,40,41).

3. HIPÓTESIS

Bovinos Holstein Friesian expuestos naturalmente a *M. bovis* con condición de no reactor a la tuberculina tendrán mayor concentración sérica de 25(OH)D₃ en comparación con los bovinos reactores a la tuberculina.

La alta concentración sérica de 25(OH)D₃ encontrada en bovinos no reactores a la tuberculina incrementará la capacidad del macrófago bovino para controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis*.

4. OBJETIVOS

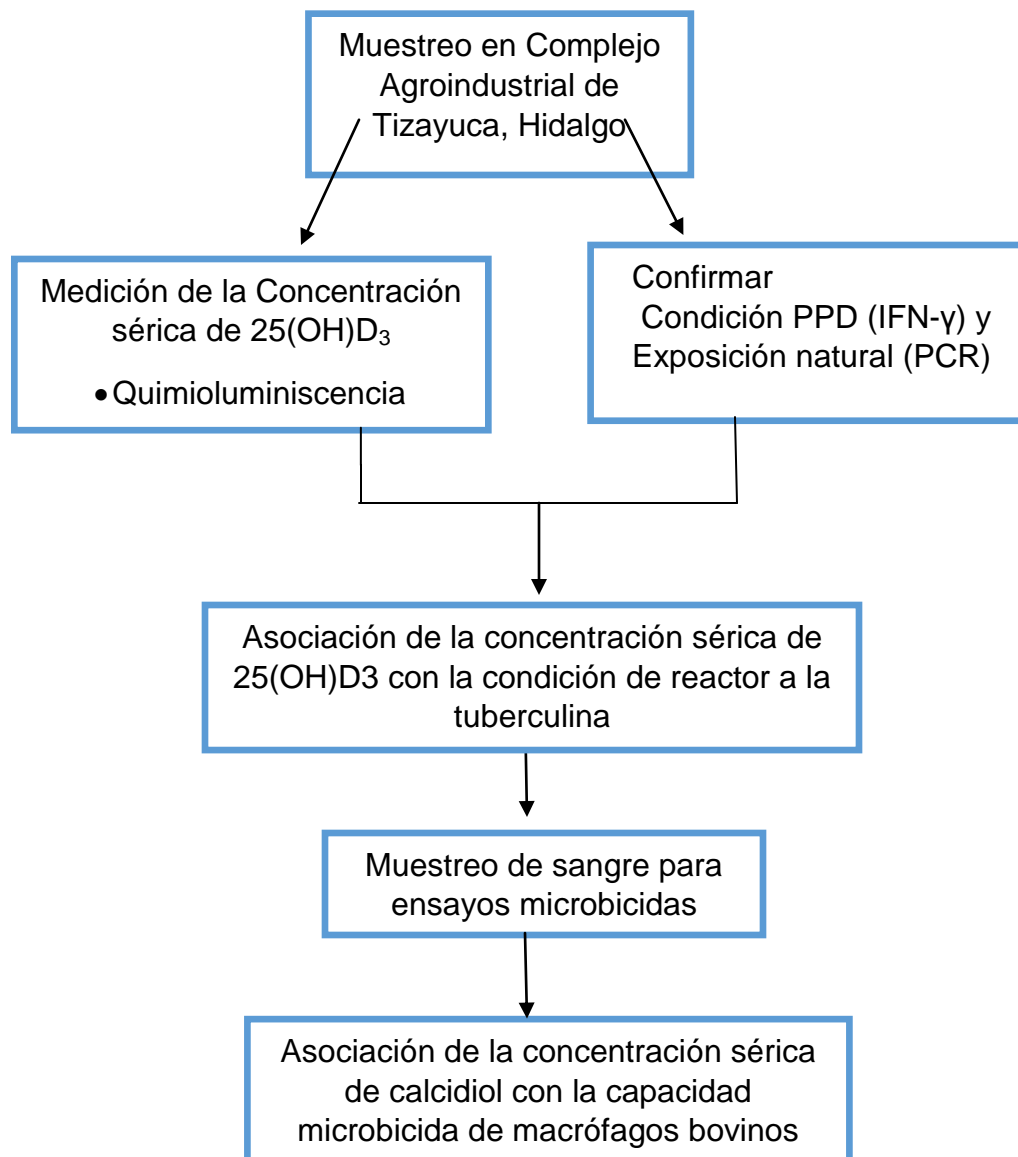
4.1 Objetivo general

Demostrar la asociación de la concentración sérica de calcidiol (25(OH)D₃) con la condición de reactor a la tuberculina en bovinos naturalmente expuestos a *Mycobacterium bovis*. Y relacionar la alta concentración sérica de calcidiol con una mayor capacidad del macrófago bovino de controlar el crecimiento de *Mycobacterium bovis*.

4.2 Objetivos específicos

- Confirmar la condición de reactor a la tuberculina y la exposición natural a *M. bovis* en bovinos de la raza Holstein Friesian
- Evaluar la concentración sérica de calcidiol (25(OH)D₃) en bovinos de la raza Holstein Friesian por quimioluminiscencia
- Asociar la concentración sérica de 25(OH)D₃ en bovinos raza Holstein Friesian con su condición de reactores a la tuberculina ó no reactores
- Evaluar la concentración sérica de calcidiol con la capacidad de los macrófagos de controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis* por medio de un ensayo microbicida y su producción de ON

5. DISEÑO EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Localización de la zona de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en los hatos números 124 y 123 del Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca (C.A.I.T.) ubicado en el estado de Hidalgo, México. Las coordenadas del satélite son: latitud 19°50'9"N y longitud 98°58'23"W.

6.2 Objeto de estudio.

a) Características generales.

El muestreo se realizó en mamíferos domésticos de la familia *Bovidae*, especie, *Bos taurus* de hatos lecheros que han participado Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. (NOM-ZOO-031-1995).

b) Criterios de inclusión.

Bovino, hembra, de primer parto en adelante, de raza Holstein Friesian, productoras de leche, estabuladas y clínicamente sanas.

c) Criterios de exclusión.

Vacas con problemas gastroentéricos que reciban en su dieta altas concentraciones de alfalfa y con problemas renales o hepáticos.

d) Ubicación espacio-temporal.

El primer muestreo se realizó en el periodo comprendido del 25 al 30 de enero del 2016 y el segundo muestreo en marzo 16 del 2017. Los bovinos de los hatos 123 y 124 localizados en el C.A.I.T., el cual tiene una prevalencia de tuberculosis bovina de 16% y en donde también se ha aislado *M. bovis*.

6.3 Evaluación de la concentración sérica de calcidol (25(OH)D₃)

Para la medición de la concentración de calcidol, se tomó de cada animal 7 ml de sangre periférica procedentes de la vena yugular en un tubo vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante (BD Vacutainer® Sodium Heparin, USA). El manejo de la muestra para obtener el plasma se realizó en un periodo máximo de 30 minutos posterior a la toma de muestra. Para el transporte de la muestra de la zona de estudio al laboratorio de Tuberculosis y brucelosis de la FMVZ UNAM, el plasma se vació en crioviales de 2.0 mL y se colocaron en un recipiente con nitrógeno líquido. Al llegar al laboratorio se almacenó a -70 °C por un periodo máximo de 3 meses hasta su análisis. La medición de 25-hidroxivitamina D se realizó en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", por medio de quimioluminiscencia con el kit marca comercial DiaSorin S. p. A. Saluggia, Italia.

6.3.1 Determinación del tamaño de muestra para medir la concentración sérica de calcidol

Para determinar el tamaño de la muestra de bovinos se empleó la fórmula para programas de erradicación de una enfermedad, la cual se aplica en poblaciones pequeñas.

Se conoce que en esa población existe una prevalencia del 16% de bovinos (*Bos taurus*) infectados de *M. bovis* de un hato de 250 animales. Por lo consiguiente:

$$n = [1(1-a)^{1/D}] \times [N - (D-1) / 2]$$

$$n = [1-(1-0.95)^{1/40}] \times [250 - (40-1) / 2] = 16.68 = 17$$

Dónde:

n= Tamaño de la muestra

a= Nivel de confianza (0.95)

D= Número de animales enfermos en la población (40)

N= Tamaño de la población (250)

17 animales con resultados de la prueba de PPD+ y 17 PPD- serán muestreados del hato 123 y 124 respectivamente. Se empleó muestreo aleatorio sistemático.

6.4 Técnicas de muestreo para confirmar el resultado de la prueba de tuberculina

6.4.1 Colección de sangre para estímulo antígeno específico celular

Se colectaron 7 ml de sangre con tubo vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante (BD Vacutainer® Sodium Heparin, USA). Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz y se procesaron en las primeras 7 horas de haberse obtenido. El estímulo de los linfocitos en las muestras de sangre periférica se hizo utilizando placas para cultivo celular de 96 pozos. En cada pozo se depositaron 250 µl de sangre, las células se estimularon por duplicado con 16µl de PPD bovino (0.3 mg/mL) y 16 µl PPD aviar (0.3 mg/mL). Como control positivo se utilizó 1 ng de Lectina *Phytolacca americana Pokeweed* (SIGMA Chemical CO. St Louis, MO USA). Como control negativo se usó PBS 1x estéril. Las placas se incubaron por 16 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación 824 x g por 20 minutos a 4°C y se depositaron en placas de 96 pozos las cuales se almacenaron a -20°C para la posterior evaluación de la producción de IFN-γ empleando la prueba comercial BOVIGAM® (Pfizer Animal Health, Victoria Australia)

6.4.2 Evaluación de la producción de IFN-γ

El IFN-γ liberado en los plasmas de los cultivos celulares estimulados en este estudio, se midió usando la prueba de diagnóstico BOVIGAM (*Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle, Pfizer Animal Health, Victoria Australia) de acuerdo con las instrucciones de fabricante. Las densidades ópticas (O.D.) de las placas de IFN-γ se leyeron en un lector de placas de ELISA automático utilizando el filtro de 450 nm.

Se utilizaron los controles positivos y negativos incluidos en el Kit, por duplicado en cada placa. Para la validación de la prueba se evaluaron las O.D. de los controles y se aceptó un rango del control negativo <0.130 y para el positivo >0.700. Se usó el criterio de valores de PPD B – PPD A ≥ 0.1 y PPD B – PBS ≥ 0.1 para determinar una respuesta positiva y lo contrario para una respuesta negativa. Y

un valor ≥ 0.7 O.D. en las células estimuladas con Pokeweed para considerar válido el análisis.

6.4.3 Aislamiento de ADN micobacteriano

Se recolectaron exudados nasales de todos los animales evaluados en este estudio, utilizando hisopos estériles que fueron sumergidos en 2 ml de PBS 1x estéril. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, se centrifugaron a 2196 x g durante 10 minutos y los sedimentos nasales se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. Se realizó la extracción del ADN de los sedimentos mediante una metodología descrita para micobacterias (41). El sedimento se homogenizó con 400 μl de TE (100mM tris-HCl, 10mM EDTA pH 8) y se mantuvo a 80°C por 20 minutos para inactivar la presencia de posibles micobacterias. Después se centrifugó a 9508 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante con una pipeta de transferencia. Posteriormente se le adicionaron 50 μl de lisozima (10mg/mL) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó por 16 horas a 37°C . Después de la incubación se agregaron 75 μL de SDS al 10% y 50 μl de proteinasa K (1mg/mL) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó 20 minutos a 65°C . Se agregaron 100 μl de NaCl 5M y posteriormente 100 μl de una solución de 5% de N-cetyl-N,N,N-trimetil bromuro de amonio (CTAB) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó 10 minutos a 65°C . El ADN se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (SIGMA-Aldrich, USA). El ADN se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol absoluto (SIGMA-Aldrich, USA) y se lavó con 1 ml de etanol frío al 70%. El ADN se resuspendió en 50 μl de agua libre de nucleasas (GIBCO, Auckland, N. Z.). La concentración y pureza del ADN se evaluó por espectrometría (D.O. 260/280 nm) utilizando un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, USA).

6.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó un protocolo de PCR anidado e iniciadores previamente descritos para la amplificación de un fragmento del gen *mpb70* (41).

El PCR simple se realizó mediante la amplificación de un producto de 372 pb del gen *mpb70* con los iniciadores *mpb70* F(5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA -3') y

mpb70 R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') utilizando el siguiente protocolo de amplificación. Un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por 5 minutos, posteriormente 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos. Finalmente, un ciclo de 72°C por 5 minutos. Posteriormente el PCR anidado se realizó utilizando los iniciadores M22 F (5'-GCTGACGGCTGCACTGTCTGGGC-3') y M22 R (5'-CGTTGGCCGGGCTGGTTTGGCC -3'). Se utilizó un sistema Touchdown para la amplificación del segmento M22. El sistema consiste en 7 ciclos iniciales a 94°C por 30 segundos y 70°C por 30 segundos, 10 ciclos con las mismas temperaturas disminuyendo 1°C cada ciclo, y 8 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y un período de extensión a 72°C por 30 segundos. Para la amplificación de los productos de PCR se tomaron 2 µl de ADN extraído de los exudados nasales juntos con la siguiente mezcla de reactivos:

Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa		
Reactivos por reacción	PCR Simple Concentración reacción 1x	PCR Anidado Concentración reacción 1X
Platinum® Blue PCR SuperMix (Thermo Fisher Scientific No. 12580015)	1 X	1 X
20 µM Iniciador F	0.4 µM	0.4 µM
20 µM Iniciador R	0.4 µM	0.4 µM
ADN <i>M. bovis</i> AN5	7 ng	7 ng

Posteriormente, de cada producto de la amplificación final se tomaron 5 µL y se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con Syber Safe DNA Gel Stain® 1x (Thermo Fisher Scientific No. S33102) y TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH8) como solución de corrida. El producto de reacción fue visualizado utilizando un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, UK). Para determinar el tamaño de los segmentos amplificados se empleó un

marcador de peso molecular 100 pb (GeneRuler 100 bp DNA ladder ready to-use, Fermentas, USA).

6.6 Macrófagos derivados de Monocitos de Bovino (MDMB)

La sangre de 3 animales PPD(-) y 3 PPD(+) se colectó asépticamente por punción de 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 a su colección.

Se depositaron 20 ml de sangre en un tubo Acuspin de 50 mL (SIGMA-Aldrich, USA) con 15 ml de Histopaque (SIGMA-Aldrich, USA) y se centrifugó durante 30 min a 1000 X g a temperatura ambiente (TA). Se recuperó la capa flogística y se resuspendió en c.b.p. 45 ml de PBS-Citrato (Cloruro de Sodio 1.5 mM, Fosfato de Sodio monobásico 9.1 mM, Fosfato de Sodio dibásico 1.25 mM, Ácido cítrico trisódico 12.5 mM, a un pH de 7.4), y se centrifugó a 500 g x 15 minutos a TA, conservando el paquete celular, este lavado se repitió dos veces más. El paquete celular fue resuspendido en 8 ml de CRPMI 1640 (SIGMA-Aldrich, USA) [L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM y NaHCO₃ 20mM] (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY. EUA), una vez esto, se transfirieron a una placa de 6 pozos de ultra baja adherencia (Corning, EUA). Para facilitar la adherencia de los monocitos a los pozos, se incubó por una hora en atmosfera húmeda y 5% de CO² a 37°C. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio de los pozos a CRPMI suplementado con 12% de suero autólogo (CRPMI-12%) y el medio con CRPMI se centrifugó a 1000g x 5 minutos a TA, posterior a esto se decantó el sobrenadante después se resuspendio en 4 mL de CRPMI y se depositó en otro pozo de la misma placa, los cuales se incubaron por 12 horas más y posterior a esta incubación se realizó cambio de medio con CRPMI-12%. La placa se quedó en incubación por 15 días, cambiando el medio (CRPMI-12%) cada 5 días, para la maduración de los macrófagos.

6.7 Cosecha de Macrófagos

Se desechó el sobrenadante que contenía cada pozo de la placa y en su lugar se depositaron 6 ml de solución de despegado (EDTA 2mM, Suero fetal bovino 0.5%, Cloruro de Sodio 1.5 mM, Fosfato de Sodio monobásico 9.1 mM, Fosfato de Sodio dibásico 1.25 mM). Y se dejó incubando por 15 minutos a 4°C. Posterior a esto el contenido se transfirió a un tubo cónico de 50 ml. Se centrifugó a 500 X g por 15 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en medio CRPMI-12%, se tomaron 50 µl del medio para contar las células resuspendidas en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se volvió a centrifugar. Al terminar la centrifugación se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en medio CRPMI-12%, ajustando la concentración de células para obtener una concentración final de 1×10^6 células por ml de medio.

6.8 Preparación de inóculo

Se utilizó la cepa *Mycobacterium bovis* AN5, la cual fue sembrada en 4 mL de medio Middlebrook 7H9 (BBL™ Middlebrook 7H9) con enriquecimiento OADC y 0.5g/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 se escaló transfiriéndolo a una botella de cultivo con 40 ml de medio Middlebrook 7H9 con enriquecimiento de OADC y 0.5 mL de Tween 80, y se incubó por 12 días en las condiciones antes descritas.

El cultivo se colectó en fase de crecimiento logarítmica, se centrifugó a 2500 x g por 15 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió y se lavó 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 minutos. Después de retirado el sobrenadante, se resuspendió en medio CRPMI con 15% de suero fetal bovino (Gibco™ Invitrogen Corporation Grand Island NY USA). Para dispersar los agregados bacterianos, la suspensión de bacterias se pasó dos veces a través de una aguja de 27G x 13 mm. La suspensión obtenida se transfirió a tubos con

capacidad de 1.5 mL en cantidades de 1 mL, el lote se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.9 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

La concentración del inóculo bacteriano se determinó por medio del conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), una de las alícuotas de la cepa se descongeló a 37°C y se realizaron una serie de diluciones decuples seriadas de la suspensión bacteriana sembrándose por triplicado 10 µl de esta, en placas de agar Middlebrook 7H10 enriquecido con 10% de OADC. Las placas se incubaron de 14 a 21 días a 37°C. La cantidad de UFC se obtuvo por ml, aplicando la siguiente ecuación:

$$[(UFC)(1000)/(10)](FD)= \text{bacterias/ml}$$

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

6.10 Inmunomodulación del calcidiol en macrófagos infectados con *M. bovis*

- Infección de macrófagos bovinos con *M. bovis* AN5 cultivados con altas o bajas concentraciones de calcidiol para la determinación de la producción de ON (óxido nítrico).

En placas de cultivo celular de 12 pozos, se sembraron macrófagos obtenidos de sangre periférica de bovino en medio RPMI (5×10^5 /ml) por pozo. La placa se incubó por 12 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posterior a la incubación, el medio de cultivo se retiró y fue sustituido por los tratamientos descritos en el siguiente apartado; después los macrófagos se infectaron con *M. bovis* AN5 a una MOI de 5:1. Posteriormente la placa se centrifugó a 200 x g por 1 minuto y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas. Se utilizó como control negativo macrófagos sin infectar y como control positivo macrófagos sin infectar y estimulados con LPS 100 ng/mL (SIGMA-Aldrich, USA). Los experimentos se realizaron por duplicado en tres repeticiones independientes.

- Infección de macrófagos bovinos con *M. bovis* AN5 cultivados con altas o bajas concentraciones de calcidiol para la realización de ensayos bactericidas y determinación de la supervivencia intracelular

En placas de Terasaky (Cat. M0690, Nunc, SIGMA-Aldrich, USA) se colocaron por triplicado 10 μ l de una suspensión de macrófagos a una concentración de 1×10^4 células/pozo; se dejó incubando por 12 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posterior a la incubación el medio se retiró y fue sustituido por los tratamientos descritos en el siguiente apartado. Posterior a la aplicación de los tratamientos se realizó la infección con *M. bovis* AN5 a una MOI de 2:1, a partir de una suspensión de bacterias con concentración de 5×10^6 bacterias/ml, se colocó 4 μ l a cada pozo. Se utilizó como control pozos sin células con bacterias y pozos con células sin bacterias.

6.11 Tratamientos

Tratamientos utilizados para la medición de la producción de ON y para los ensayos microbicidas. De los bovinos de este estudio, se seleccionaron 5 plasmas de animales PPD- con alta concentración de vitamina D (>100 ng/mL) y 5 plasmas de animales PPD+ con baja concentración de vitamina D (<30 ng/mL). Para preparar los medios de cultivo (CRPMI + 12% plasma) que fueron utilizados en los microbicidas, dicho medio fue preparado dentro de los 30 minutos antes de su utilización y mantenidos en hielo y oscuridad.

Se utilizó Ketoconazol (laboratorios Merial, México) como bloqueador de la activación de calcitriol debido a que es un inhibidor competitivo de la enzima 1 α hidroxilasa (CYP27B1) (10).

- CRPMI-Plasma PPD- 12 % (plasma de bovinos no reactivos a la tuberculina)
- CRPMI-Plasma PPD+ 12% (plasma de bovinos reactivos a la tuberculina)
- CRPMI-Plasma PPD- 12 % (plasma de bovinos no reactivos a la tuberculina)
+ Ketoconazol (5 μ g)
- CRPMI-Plasma PPD+ 12% (plasma de bovinos reactivos a la tuberculina)
+ Ketoconazol (5 μ g)

6.12 Ensayo microbicida

El ensayo microbicida se llevó a cabo en placas de Terasaky de 74 pozos. Se colocaron por triplicado 10 μ l de una suspensión de macrófagos a una concentración de 1×10^6 células por mL, (1×10^4 células/pozo). Las placas se incubaron por 12 horas a 37°C, con humedad y 5% de CO₂. Después de este tiempo el medio se retiró de cada pozo y fue sustituido por los tratamientos antes descritos en el apartado 7.11, los tratamientos permanecieron durante el tiempo de fagocitosis (4 horas posinfección), y posteriormente durante las siguientes 20 horas para la evaluación de la sobrevivencia. Se realizó la infección a una MOI de 2:1. De una suspensión de bacterias a una concentración de 5×10^6 bacterias/ml se colocaron 4 μ l a cada pozo. Se utilizaron como control del inóculo pozos con bacterias y como control negativo pozos con células sin bacterias. Las placas se incubaron por 4 horas en las condiciones antes mencionadas y antes de ser introducidas a la incubadora, se colocaron 10 μ l de agua en cada esquina de la placa para evitar la evaporación del medio. Se corroboró el número de UFC de los controles de bacterias por medio de diluciones decuples seriadas; primero se prepararon 6 alícuotas que contenían 900 μ l de PBS, después se tomó 100 μ l del alícuota control y se realizaron 6 diluciones decuples seriadas pasando 100 μ l a cada tubo con 900 μ l de PBS. Se sembraron 10 de cada una de las diluciones en placas agar Middlebrook 7H10 con enriquecimiento OADC, las siembras se realizaron por triplicado y se incubó por 14-21 días a 37°C. Se utilizaron dos placas para cada experimento de los tratamientos descritos en el apartado 7.11, una placa para el experimento de fagocitosis (4 h posinfección) y otra para la de sobrevivencia la cual permanecía 20 horas más que la placa de fagocitosis. Transcurrida las 4 horas de incubación se retiró el medio y se realizaron 5 lavados con 10 μ l de CRPMI. En el caso del ensayo de fagocitosis se adicionaron 10 μ l de solución de lisis (Tween 20 al 0.5%) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Mientras que para el ensayo de sobrevivencia, se realizaron los lavados, se colocó el nuevo medio con los tratamientos antes descritos y se dejó incubando por 20 horas en las condiciones antes descritas.

Con respecto a las diluciones del pozo donde solo hay bacterias, se tomaron éstas y se colocaron en un tubo con 270 μ l de PBS más dos lavados con 10 μ l de PBS. Posteriormente se realizaron 3 diluciones decuples, tomando 30 μ l y pasándolo a cada tubo; de cada dilución se sembraron 10 μ l en placas de agar Middlebrook 7H10 con enriquecimiento OADC, las siembras se realizaron por triplicado y se incubó por 14-21 días a 37°C con 5-10% CO₂.

Para el ensayo de fagocitosis, después de 4 horas posinfección, se retiraron las bacterias no fagocitadas y los macrófagos fueron lisados con 10 μ l de solución de lisis (Tween 20 al 0.5%) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se recuperó la solución de lisis y se realizaron dos lavados con 10 μ l de PBS a cada pozo, esto con la finalidad de remover las bacterias que pudieron haber quedado adheridas a los pozos después de lisar los macrófagos. Los 10 μ l de la solución de lisis junto con los 20 μ l de los dos lavados, se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos que contenía 270 μ l de PBS. Se realizaron tres diluciones decuples seriadas pasando 30 μ l a cada pozo con 270 μ l de PBS. 10 μ l de cada una de las diluciones se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H10 con enriquecimiento OADC, las siembras se realizaron por triplicado y se incubó por 14 a 21 días a 37°C con 5-10% CO₂.

Las células del ensayo de sobrevivencia, después de 20 horas de incubación, se recolectó el sobrenadante, se adicionó 10 μ l de solución de lisis y se realizó un lavado con 10 μ l de PBS. Estos fueron colocados en un pozo con 270 μ l de PBS y se realizaron tres diluciones decuples seriadas pasando 30 μ l a cada pozo que contenía 270 μ l de PBS en una placa de 96 pozos. 10 μ l de cada una de las diluciones se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H10 con enriquecimiento OADC, las siembras se realizaron por triplicado y se incubó por 14 a 21 días a 37°C con 5-10% CO₂.

Transcurridos 17 días de incubación se realizó el conteo de UFC's de cada tratamiento y de los controles. Los datos obtenidos fueron capturados en una hoja de cálculo diseñada para el análisis del porcentaje de crecimiento intracelular para cada uno de los tratamientos a las 24 horas posinfección y se determinó la diferencia en

los porcentajes de sobrevivencia intracelular de *M. bovis* cuando se utilizó en el medio de cultivo celular plasma de bovino no reactor a la tuberculina con altas concentraciones de vitamina D contra medio de cultivo con plasma de bovino reactor a la tuberculina con bajas concentraciones de vitamina D.

6.13 Ensayo de producción de ON

Transcurrida las 24 horas de incubación posinfección se colectó el sobrenadante, para eliminar las micobacterias, este se pasó por un filtro con membrana de 0.22 μm (Corning, EUA) y se almacenó a -70°C .

La determinación de la producción ON se realizó con el Kit Griess Reagent System (Promega, EUA) de acuerdo con las instrucciones de fabricante. Las densidades ópticas (O.D.) de las placas de nitritos se leyeron en un lector de placas de ELISA automático (ELX808, BioTek Instruments®, E.U.A.) utilizando el filtro de 550 nm.

Se utilizó una solución estándar de nitritos a una concentración de 100 μM a partir de un stock de Nitrato de Sodio (NaNO_3) de 0.1 M. Posteriormente se realizó una curva de referencia para la cuantificación de la concentración de nitritos en las muestras de los sobrenadantes, por medio de un gráfico de los valores de absorbancia, de cada una de las concentraciones de la solución estándar de nitritos como función "Y" y la concentración de nitritos como función "X".

Análisis de resultados

6.14 Asociación la concentración sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ con el estatus PPD y asociación de la concentración de calcidiol con la capacidad microbicida de los macrófagos

Para la comparación de los resultados, se utilizó la prueba T de student para 2 grupos independientes.

6.15 Determinación de la capacidad microbicida utilizando plasmas de animales PPD- y PPD+

Para demostrar que la variable concentración sérica de vitamina D mejora la capacidad microbicida. Se realizaron tres ensayos microbicidas independientes con tres repeticiones internas. De estos ensayos también se realizó la determinación de la producción de óxido nítrico. Para saber el número de plasmas de cada grupo (PPD- y PPD+) para utilizar en cada ensayo, se determinó por la siguiente formula:

Tomando en cuenta:

$$n = [1 - (1 - a)^{1/D}] \times [N - (D - 1) / 2]$$

$$n = [1 - (1 - 0.95)^{1/17}] \times [34 - (17 - 1) / 2] = 4.1 = 4$$

Dónde:

n= Tamaño de la muestra

a= Nivel de confianza (0.95)

D= Número de animales PPD- (17)

N= Animales PPD- y PPD+ muestreados (34)

En cada ensayo microbicida y de producción de óxido nítrico se utilizaron 4 plasmas de animales PPD- y 4 plasmas de animales PPD+, de los animales muestreados para medir la concentración sérica de calcidiol.

7. RESULTADOS

7.1 Confirmación de la exposición natural a *Mycobacterium bovis*

Para demostrar que los bovinos de este estudio están expuestos naturalmente a *Mycobacterium bovis*, se realizó una PCR anidada para la detección del gen *mpb70*, a partir de muestras de hisopado nasal. De los 17 animales PPD (-), 12 resultaron positivos a PCR y de los 17 PPD (+) 10 resultaron positivos a PCR (Tabla 1). Estos datos confirman que los bovinos están expuestos a *M. bovis*, independientemente de la condición PPD en la que se encuentren (Fig. 1).

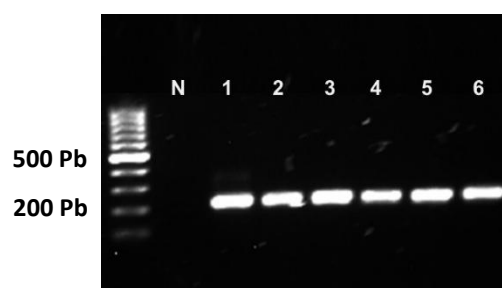


Figura 1. PCR anidada para el gen *Mpb70* (M22 275 Pb). Control negativo (N). Control positivo *Mycobacterium bovis* AN5 (1). Animales PPD- (2,3). Animales PPD+ (4,5,6).

Estatus PPD	PCR	
	+	-
Negativo	12	5
Positivo	10	7

Tabla 1. Resultados de la PCR. Donde se observa que ambos grupos de bovinos están expuestos a la micobacteria.

7.2 Confirmación de la condición a la prueba de tuberculina (PPD)

Con el objetivo de confirmar el estatus PPD de los animales en estudio, se evaluó la respuesta celular a antígenos micobacterianos y se realizó la medición de interferón gamma (Kit BOVIGAM®) en el sobrenadante de los cultivos celulares. Los 17 bovinos PPD (-) en estudio resultaron negativos al estímulo con PPD bovino y de éstos solo uno resulto positivo al estímulo con PPD aviar. De los animales PPD (+), 12 resultaron positivos y 5 negativos al estímulo con PPD bovino; de estos últimos, hubo 3 animales positivos al estímulo con PPD aviar. Con estos resultados se catalogaron a los animales con la condición de reactor a la tuberculina o no reactor a la tuberculina. (Tabla 2).

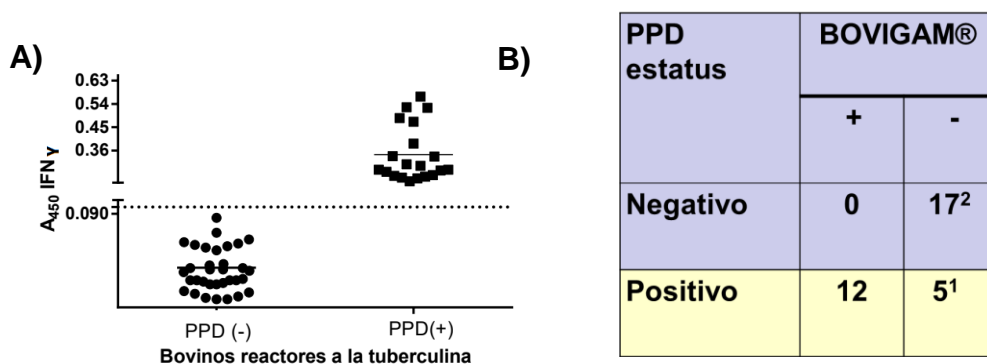
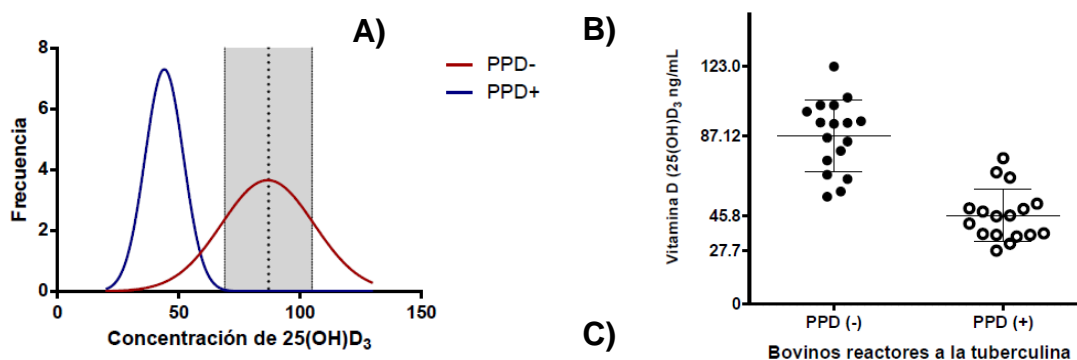


Figura 2. Producción de interferón gamma y medición con el Kit BOVIGAM®. A) Densidad óptica de las mediciones de IFN- γ en plasma de sangre completa estimulada con PPD bovino. Se incluye todos los animales y sus repeticiones (Líneas punteadas medición del control negativo de la prueba). B) Resultados de la prueba IGRA.¹ Tres animales resultaron positivo al PPD aviar. ² 1 animal resulto positivo al PPD aviar

7.3 Asociación de la concentración sérica de vitamina D con la condición de PPD

A partir de las muestras de plasma obtenidas de los bovinos de este estudio, se procedió a medir la concentración sérica de vitamina D (calcidiol) por medio de quimioluminiscencia (kit DiaSorin®) y se encontraron diferencias significativas en la concentración de vitamina D de los animales no reactivos a la tuberculina (media 87.12 ng/mL ± 18.54) en comparación con la de los animales reactivos (media 45.86 ± 13.43). Estos resultados sugieren que las concentraciones de calcidiol en sangre están asociadas con la condición a la prueba de tuberculina (PPD) en los bovinos ($P \leq 0.05$) (Figura 3).



Estadístico	PPD -	PPD +
Rango	67.4	47.8
Media	87.12ng/μl	45.86 ng/μl
Desviación estándar	18.54	13.43
Error de la media	4.495	3.258

Figura 3. Concentraciones séricas de vitamina D (calcidiol). A) Concentración sérica de calcidiol en bovinos reactivos y no reactivos a la tuberculina. B) Concentración sérica de calcidiol en cada individuo. C) Estadísticos de las concentraciones séricas de calcidiol en los dos grupos. La media de los bovinos no reactivos es significativamente mayor que la de los bovinos reactivos * ($P \leq 0.05$).

7.4 El plasma de los bovinos PPD (-) mejora la capacidad de controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis* AN5 en MDMSP

Con la finalidad de observar el efecto de la concentración de vitamina D en el plasma de los bovinos en relación con el control del crecimiento de *M. bovis* por parte de los MDMSP, se realizaron ensayos microbicidas con *M. bovis* AN5 y los plasmas de bovinos con alta y baja concentración de vitamina D, los cuales fueron adicionados al medio de cultivo. Se observó que el porcentaje de fagocitosis después de 4 horas posinfección oscilaba entre el 60-82%, independientemente de cual fuera el plasma utilizado, durante el ensayo microbicida (Fig.4), pero al observar el porcentaje de sobrevida intracelular de *M. bovis* AN5 a las 24 horas posinfección, utilizando plasma de bovinos con condición no reactivos (96.53ng/ml \pm 8.92) éste fue significativamente menor (124.7% \pm 13.01) ($P \leq 0.05$) en comparación de la sobrevida de *M. bovis* AN5 (187.6% \pm 30.44) cuando se utilizó plasma de bovinos reactivos (48.75 ng/ml \pm 13.02).

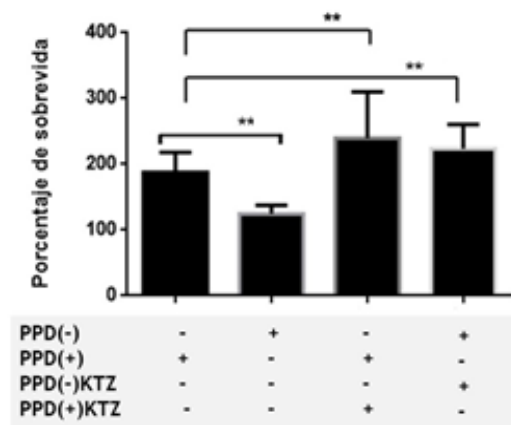


Figura 4. Porcentaje de sobrevida de *M. bovis* AN5 en MDMSP con una MOI de 2:1. Se observa la media y desviación estándar de los porcentajes de sobrevida intracelular de *M. bovis* en macrófagos que provienen de tres animales con tres repeticiones internas cada uno. Se utilizó la prueba T de Student para grupos independientes para determinar la significancia estadística $P \leq 0.01$. PPD (+) = plasma de bovinos PPD(+), PPD(-) = plasma de bovinos PPD(-), PPD(-) KTZ = plasma de bovinos PPD(-) con ketoconazol, PPD(+) KTZ = plasma de bovinos PPD(+) con ketoconazol.

Para demostrar que el efecto de la concentración de vitamina D en el plasma de los bovinos se relaciona con el control del crecimiento de *M. bovis* AN5 en MDMSP, se utilizó Ketoconazol, el cual es un inhibidor competitivo de la enzima 25 (OH) D-1 α -hidroxilasa; esta enzima es la encargada de hidroxilar a la 25(OH)D₃ para formar 1,25(OH)₂D₃, por lo tanto el efecto del Ketoconazol repercute en la concentración de 1,25(OH)₂D₃ intracelular, y por ende puede afectar el control del crecimiento de Mbo AN5 en MDMSP. Lo anterior se confirmó al observar un incremento del crecimiento intracelular de *M. bovis* AN5 cuando se adicionó Ketoconazol al medio de cultivo celular junto con los plasmas de bovinos no reactivos se observó un crecimiento de la micobacteria de 223.9% \pm 70.25 en comparación con 124.7% en macrófagos que no recibieron ketoconazol. De igual forma, cuando se utilizó ketoconazol y plasma de bovinos PPD(+)/IFN γ (+) el incremento en el crecimiento intracelular de *M.bovis* AN5 fue de 239.8% \pm 70.25 contra 187.6% de macrófagos sin ketoconazol, La diferencia entre ambos tratamientos es significativa (P \leq 0.05). Por lo tanto, la inhibición de la enzima 25 (OH)D-1 α -hidroxilasa por medio del uso del Ketoconazol Inhibe la síntesis de vitamina D activa e incrementa la sobrevivencia intracelular de *M. bovis* AN5. Este dato demuestra el efecto inmunomodulador de la vitamina D en el macrófago para disminuir el crecimiento intracelular de *M. bovis* y en su caso, a falta de vitamina D activa *in situ*, por deficiencia o problemas en su síntesis, favorece el crecimiento del microorganismo.

7.5 La producción de ON en MDMSp infectados con Mbo AN5 es mayor utilizando plasma de bovinos PPD(-)

Para demostrar que la concentración de vitamina D en el plasma de bovinos se relaciona con la producción de ON en MDMSp, éstos se infectaron con *M. bovis* AN5 a una multiplicidad de infección de 5:1, a los medios de cultivo se les adicionó ya sea plasma de bovinos con alta ó baja concentración de vitamina D. Transcurridas las 24 horas posinfección se recolectaron los sobrenadantes para determinar la concentración de nitritos.

Se observó que los macrófagos de bovino infectados y cultivados en presencia de plasma de animales no reactivos, la producción de ON es significativamente mayor ($P \leq 0.05$) con $35.53 \mu\text{M} \pm 4.73$ en comparación con los cultivados con plasma de animales reactivos que fue de $25.60 \mu\text{M} \pm 5.07$. Al utilizar Ketoconazol para inhibir la producción de vitamina D dentro del macrófago, se observó una disminución estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) en la producción de ON, con valores de $6 \mu\text{M}$ y de $6.4 \mu\text{M}$ respectivamente. (Fig. 5)

Se observa que producción de ON en macrófago de bovino expuesto a *M. bovis*, está relacionada con la concentración sérica de vitamina D encontrada en el plasma de los animales reactivos y no reactivos.

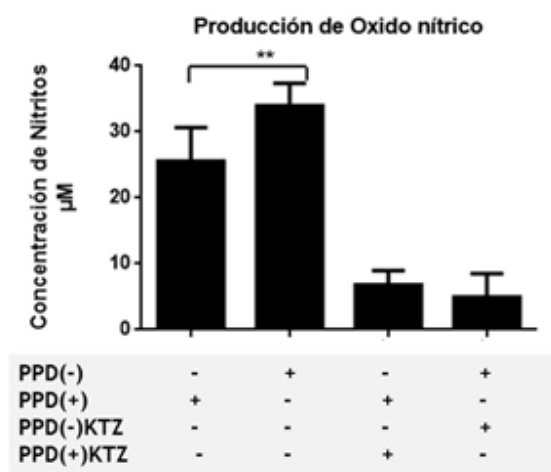


Figura 5. Producción de ON en macrófagos de bovino infectados *M. bovis* AN5 a una MOI de 5:1. Se observa la media y desviación estándar de los porcentajes de producción de ON de macrófagos infectados con *M. bovis*, las células provienen de tres animales con tres repeticiones internas cada uno. Se utilizó la prueba T de Student para grupos independientes para determinar la significancia estadística $P \leq 0.01$ PPD (+) = plasma de bovinos PPD(+), PPD(-) = plasma de bovinos PPD(-), PPD(-) KTZ = plasma de bovinos PPD(-) con ketoconazol, PPD(+)KTZ = plasma de bovinos PPD(+) con ketoconazol.

7.6 Asociación de la alta concentración sérica de calcidiol con una mejor capacidad del macrófago bovino para controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis*

Para confirmar que la capacidad micobactericida de macrófagos de bovinos raza Holstein Friesian es mayor al utilizar plasma de bovinos no reactivos en comparación con los plasmas de animales reactivos, se asociaron los resultados de los porcentajes de supervivencia de *M. bovis* AN5 y producción de ON en MDMB, y se confirma la hipótesis que la producción de ON y disminución del crecimiento intracelular está correlacionada con la concentración sérica de vitamina D, específicamente a la alta concentración sérica de vitamina D encontrada en plasmas de bovinos PPD(-)/IFN γ (-). Por lo tanto, una mejor capacidad del macrófago de controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis* está asociada a la alta concentración sérica de 25(OH)D₃ en bovinos naturalmente expuestos a *M. bovis*. (P \leq 0.05)

8. DISCUSIÓN

Las funciones de la vitamina D en bovinos (*Bos Taurus*) han sido ampliamente estudiadas por más de medio siglo, pero la mayoría de las investigaciones se han relacionado con las funciones endocrinas en la regulación de la homeostasis del calcio. La importancia de la 1,25(OH)D₃ radica en su papel regulador de la inmunidad innata pues incrementa la producción de moléculas antimicrobianas en macrófagos de bovinos. Sin embargo, la concentración sérica de 1,25(OH)D₃ no afecta a los macrófagos en la expresión de las moléculas antimicrobianas que son dependientes de la vía de señalización de la vitamina D (Nelson *et al.* 2010(42)(10)). Esta hormona tiene que ser producida *in situ*, dentro del macrófago, para que pueda ejercer su efecto.

A diferencia de la 1,25(OH)D₃, se ha demostrado, que existe una relación en la concentración sérica de 25(OH)D₃ y el riesgo de padecer enfermedades respiratorias como tuberculosis. Con respecto a la asociación de la respuesta inmune y la concentración de vitamina D en animales, actualmente se ha demostrado, en macrófagos de bovinos que la 25(OH)D₃ incrementa la expresión de genes como *INOS* y *RANTES (CCL5)*, los cuales codifican para importantes moléculas de la respuesta inmune contra bacterias intracelulares como *Mycobacterium bovis* (Nelson *et al.*, 2010 (42)).

La asociación entre la concentración sérica de 25(OH)D₃ con la condición de reactor a la tuberculina en bovinos naturalmente expuestos a *Mycobacterium bovis* encontrada en este estudio, refuerza la idea de que concentraciones séricas de vitamina D, por arriba del valor promedio establecido para bovinos, puede relacionarse a que un animal, en estas condiciones, resulte ser negativo a la prueba de la tuberculina.

Resultados encontrados en este estudio también demuestran que se presenta una mejor capacidad del macrófago de bovino para restringir el crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* utilizando plasmas que provienen de bovinos que presentan la condición de ser no reactor a la tuberculina y que

tienen mayor concentración sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$. Este evento se puede relacionar a la producción de moléculas de inmunidad innata que son dependientes de la vía de señalización de vitamina D, como lo es el óxido nítrico. En este sentido, los datos demuestran que una mayor concentración de calcidiol, presente en el medio de cultivo, está relacionada con una mayor producción de óxido nítrico en macrófagos de bovinos infectados con *Mycobacterium bovis*.

La detección de ADN de *Mycobacterium bovis* a partir de hisopados nasales, provenientes de los bovinos en estudio, utilizando un protocolo de PCR anidado, específico para la amplificación de una región del gen *MPB70*, fue una metodología adecuada para la confirmación de la exposición natural de los bovinos a *M. bovis*. Debido a que este protocolo tiene una sensibilidad de 91% (Villalba *et al.*, 2012(41)). En este tipo de muestras el número de bacterias puede ser muy bajo y este protocolo fue conveniente para demostrar la presencia de *Mycobacterium bovis*. Los resultados encontrados nos demuestran que los bovinos de este estudio con condición de no reactores a la tuberculina y reactores a la tuberculina están expuestos a la micobacteria pero aun así existen variaciones en cuanto a la reacción a la tuberculina, nuestros datos confirman que esto se puede asociar a la concentración sérica de vitamina D.

Para confirmar la condición de los animales a la prueba de intradermo-reacción se utilizó la determinación de producción de interferón gamma (IGRA) como respuesta celular a antígenos micobacterianos, esta prueba actualmente es utilizada en diversos países para confirmar el resultado de la prueba de tuberculina. El uso de IGRA y la tuberculina incrementa la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (Schiller *et al.*, 2010(35)). En este estudio, los animales PPD(-) resultaron negativos a la producción de interferón gamma cuando su sangre fue estimulada con PPD bovino. Además este grupo de animales presentan concentraciones séricas de vitamina D que son mayores al promedio. Esto nos puede indicar que la respuesta inmune innata en este grupo de animales es tan eficiente en el control de *M. bovis*, que no logra montar una respuesta celular suficiente que pueda ser detectada por su producción de $\text{IFN}\gamma$.

Estudios realizados por Nelson apoyan esta idea debido a que demostró que en cultivo in vitro de leucocitos de bovinos al agregar 25(OH)D₃ a concentraciones que de 90 ng/mL, la expresión de genes de inmunidad innata como INOS y RANTES se incrementaban de forma exponencial. Fabri *et al.*, 2011(7), también demostró incremento en la expresión de péptidos antimicrobianos, incremento en la autofagia y fusión fago-lisosomal estos mecanismos estaban relacionados a las altas concentraciones de 25(OH)D₃ en humanos.

El promedio de la concentración sérica de 25(OH)D₃ de los bovinos no reactivos es de 87.12 ng/mL ± 18.54 y es significativamente diferente al promedio de los animales reactivos 45.86 ± 13.43. La diferencia en la concentración de calcidiol en sangre entre ambos grupos es superior al mostrado en un estudio anterior donde, una producción bovina en Estados Unidos con animales naturalmente expuestos a *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP), se encontró que los animales positivos a la prueba de ELISA para MAP tienen menor concentración sérica de 25(OH)D₃ (68 ng/mL) en comparación con los bovinos que son negativos a la prueba y que tienen una concentración sérica de 73.14 ng/mL. La diferencia en ese estudio entre ambos grupos es de 5 ng/mL mostrando ser estadísticamente significativa (Sorge *et al.*, 2013(12)). En nuestro trabajo, la diferencia entre grupos es de más 40 ng/mL

Los resultados obtenidos demuestran que bovinos naturalmente expuestos a patógenos intracelulares como lo son *Mycobacterium bovis* y MAP, pueden mantenerse negativos y se puede relacionar a una alta concentración sérica de vitamina D.

Estudios realizados en EUA por Nelson *et al.*, 2016 (43), muestran que los bovinos, dependiendo la época del año, presentan variaciones en la concentración sérica de vitamina D, en verano la concentración promedio es de 60 ng/mL, mientras que en el invierno se ha encontrado una disminución de la concentración de calcidiol que a 50 ng/mL, también se ha demostrado que la suplementación de vitamina D en bovinos causa cambios en la concentración sérica de vitamina D (Casas *et al.*, 2015 (11)). Aunque estudios realizados en México indican que la

época del año no causa variaciones de la concentración sérica de vitamina D en bovinos (Salgo *et al.*, 2014(44)). En nuestro estudio las muestras fueron tomadas en primavera y los animales tenían la misma dieta, por lo tanto, surge la idea de que existan factores genéticos dependientes del individuo que causan variaciones en la concentración sérica de vitamina D.

Actualmente se sabe que las características genéticas que causan variaciones en las concentraciones séricas de vitamina D se encuentran polimorfismo en el gen que se encarga de producir la enzima que hidroxila la vitamina D, esto causa alteraciones en su metabolismo reflejándose en una disminución de su biodisponibilidad (Cheng *et al.*, 2017(45)). El porqué de la variación de los niveles de calcidiol presente en los animales de este estudio no está determinado, pero abre una ventana de estudio para obtener conocimiento nuevo que nos ayude a entender un poco más la compleja relación del bovino con la micobacteria.

Se ha demostrado que bajas concentraciones de vitamina D puede causar una inadecuada respuesta inmune en el hospedador. Ensayos *in vitro* realizados con leucocitos obtenidos de sangre periférica de bovinos adicionados con concentraciones de 30 ng/mL de vitamina D, demuestran que se presenta una disminución en la expresión de genes de inmunidad innata que codifican para iNOS y CCL5 (Nelson *et al.*, 2010 (42)). La enzima *iNOS* y la subsecuente producción de ON, se ha relacionado con el control de *Mycobacterium bovis* dentro del macrófago de bovino.

En este trabajo se encontró, que al complementar el medio para cultivo celular con suero ó plasma de bovino que contiene alta concentraciones de vitamina D, los macrófagos cultivados e infectados con *Mycobacterium bovis* producen mayor cantidad de ON ($35.53 \mu\text{M} \pm 4.73$) en comparación con los que fueron cultivados en medios con complementados con plasma con menor cantidad de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ($25.60\mu\text{M} \pm 5.07$). Por lo tanto, nuestros resultados aportan evidencias de que la concentración de vitamina D presente en el medio de cultivo modula la actividad

bactericida en los macrófagos que fueron infectados con *Mycobacterium bovis* produciendo mayor cantidad de ON limitando su crecimiento intracelular.

El modelo de macrófago de bovino se ha utilizado para evaluar el control del crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* y se ha demostrado que el óxido nítrico es la molécula responsable de dicho evento. Por medio de estos ensayos también se ha demostrado una disminución en el crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos de humanos y se observó que cuando se utilizaba en el medio de cultivo sueros de personas caucásicas con concentraciones séricas de 25(OH)D₃ que oscilaban en 90 ng/mL, las cuales se demuestra tienen mayor concentración sérica de vitamina D y eso las hace menos susceptibles de padecer tuberculosis que las personas afroamericanas que tiene concentraciones séricas inferiores de vitamina D las cuales oscilan en los 45 ng/mL (Fabri *et al.*, 2011(7)). Lo anterior nos indica que existe una relación en el control de crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* y la vitamina D.

En los resultados obtenidos la diferencia en el crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos nos demuestra que la variable plasma con concentraciones séricas de 87.12ng/mL \pm 18.54 le permite al macrófago controlar de mejor forma el crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis*. Al utilizar el antagonista de 25(OH)D₃, el cual inhibe la enzima 1,25 OH hidroxilasa y esto repercute en la producción de moléculas de la inmunidad innata como óxido nítrico. Se observa que la sobrevida de *M. bovis* se incrementa en los animales con condición PPD(-)/IFN γ (-) con 223.9% \pm 70.25 y también en los animales PPD(+)/IFN γ (+) 239.8% \pm 71.25. Lo que comprueban la que ha mayor concentración sérica *in situ* de vitamina existe una mejor capacidad del macrófago de controlar el crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis*.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio confirman la hipótesis de que la concentración sérica de vitamina de que la condición de reactor a la tuberculina debido a que se demostró que los bovinos de este estudio no reactores a la tuberculina tienen mayor concentración sérica de vitamina D en comparación con los bovinos reactores. En relación a la segunda hipótesis nuestros datos nos sugieren que existe una relación de la concentración de vitamina D en el medio de cultivo y la capacidad del macrófago de poder controlar el crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis*.

Con lo anterior se plantean las siguientes conclusiones:

- Se confirma que los bovinos de este estudio con condición de reactor negativo o positivo a la tuberculina, se encuentran naturalmente expuestos a la micobacteria. Ya que se logró evidenciar la presencia de ADN de *Mycobacterium* indicándonos que esta se encuentra circulando en el hato.
- Los bovinos de este estudio, que mostraron ser reactores negativos a la tuberculina (PPD -) tienen mayor concentración sérica de vitamina D en comparación con los bovinos reactores negativos.
- Se logró establecer la asociación entre concentración sérica de calcidiol con la condición de ser reactor a la tuberculina en los bovinos en estudio.
- Los macrófagos de bovino pueden controlar mejor el crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* cuando son cultivados en medio de cultivo que contiene plasma de bovinos PPD(-). La concentración sérica de 25(OH)D₃ presente en el plasma sugiere que puede ser el factor que favorece el control del crecimiento intracelular de *M. bovis*.

- La producción de ON en macrófagos infectados con *Mycobacterium bovis* es mayor cuando se utiliza medio de cultivo complementado con plasma de bovino PPD (-) que contienen mayor concentración de vitamina D en comparación con el medio de cultivo con plasma de bovino PPD(+)
- Los resultados de los ensayos microbicidas y óxido nítrico nos demuestran la posible relación que existe entre de la vitamina D con la capacidad del macrófago de controlar el crecimiento intracelular de *M. bovis*

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Pollock J. M. y Neill S. D., (2002) “Review *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle”. The Veterinary Journal, 163, p.p. 115-127. Doi: 10.1053/tvjl.2001.0655
2. NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). 1996
3. NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). 1998
4. López L. M., Díaz F., Vallecillo A.J., Esquivel H., Gutiérrez J.A. (2006). “Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control”. Revista latinoamericana de Microbiología. 48 No. 2, Abril – Junio, pp. 173 – 178
5. Hewison M. (2011) “Review Antibacterial effects of vitamin D”. Nature Review. Endocrinology. 7, pp. 337–345. Doi: 10.1038/nrendo.2010.226
6. Nelson C.D., Reinhardt T.A., Lippolis J.D., Sacco R.E., Nonnecke B.J. (2012) “Vitamin D Signaling in the Bovine Immune System: A Model for Understanding Human Vitamin D Requirements”. Nutrients, 4, pp. 181-196. Doi: 10.3390/nu4030181
7. Fabri M., Stenger S., Shin D. M., Yuk J. M., Liu P. T., Realegeno S., Lee H. M., Krutzik S. R., Schenk M., Sieling P. A., Teles R., Montoya D., Iyer S.S., Bruns H., Lewinsohn D.M., Hollis B. W., Hewison M., Adams J. S., Steinmeyer A., Zügel U., Cheng G., Jo E.K., Bloom B.R., Modlin R.L. (2011) “Vitamin D Is Required for IFN- γ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages”. Science Translational Medicine. October 12; 3(104). Doi: 10.1126/scitranslmed.3003045
8. Sato S., Tanino Y., Saito J., Nikaido T., Inokoshi Y., Fukuhara A., Fukuhara N., Wang X., Ishida T., Munakata M. (2012) “The relationship between 25-hydroxivitamin D levels and treatment course of pulmonary tuberculosis”. Respiratory Investigation. Doi: 10.1016/j.resinv.2012.05.002

9. Ströhle A., Wolters M., Hahn A. (2011) "Micronutrients at the Interface between Inflammation and Infection. Ascorbic Acid and Calciferol. Part 1: General Overview with a Focus on Ascorbic Acid. Inflammation & Allergy - Drug Targets", 10, pp.54-63. Doi: 10.2174/187152811794352105
10. Nelson C.D., Nonnecke B.J., Reinhardt T.A., Waters W.R., Beitz D.C., Lippolis J.D. (2011) "Regulation of Mycobacterium-Specific Mononuclear Cell Responses by 25-Hydroxyvitamin D³". PLoS ONE 6(6): e21674. Doi:10.1371/journal.pone.0021674
11. Casas E., Lippolis J.D., Kuehn L.A., Reinhardt T.A. (2015) "Seasonal variation in vitamin D status of beef cattle reared in the central United States" Domestic Animal Endocrinology 52, pp.71–74. Doi: 10.1016/j.domaniend.2015.03.003
12. Sorge U., Molitor T., Linn J., Gallaher D. y Wells Y. (2013) "Cow-level association between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis antibody seropositivity: A pilot study". Journal Dairy Science. 2013 pp.1030–1037. Doi: 10.3168/jds.2012-5929
13. Gupta A., Kaul A., Tsolaki A.G., Kishore U., Bhakta S. (2012) "*Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation". Immunobiology 217, pp. 363–374. Doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.008
14. Biberstein E L, Zee Y C. (2004) "Tratado de Microbiología Veterinaria". 1ª edición. Acribia. Zaragoza, España. Cap. 28 pp. 229-239
15. Quinn P J. (2002) "Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias". 2ª edición. Acribia. Zaragoza, España. Cap. 17 pp. 115-124
16. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. (2001) "Pathogenesis of tuberculosis in cattle". Tuberculosis (Edinb). 2001;81(1-2) pp. 79-86. Doi: 10.1054/tube.2000.0279
17. Rhodes SG, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM. "Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease". Immunology. 2000 Feb;99(2) pp. 195-202. PMID: 10692036

18. Smith SG, Lecher S, Blitz R, Loch C, Dockrell HM. "Broad heparin-binding haemagglutinin-specific cytokine and chemokine response in infants following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination" *Eur J Immunol*. 2012 Sep;42(9):2511-22. doi: 10.1002/eji.201142297. Epub 2012 Aug 1. DOI: 10.1002/eji.201142297
19. Sun J, Deghmane AE, Soualhine H, Hong T, Bucci C, Solodkin A, Hmama Z. "Mycobacterium bovis BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation" *J Leukoc Biol*. 2007 Dec;82(6) pp. 1437-45.
20. Zuñiga J., Torres-García D., Santos-Mendoza T., Rodriguez-Reyna T.S., Granados J., Yunis E.J.. (2012) "Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis". *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2012, Article ID 193923, 18 pages doi:10.1155/2012/193923
21. Jankute M, Grover S, Birch HL, Besra GS. "Genetics of Mycobacterial Arabinogalactan and Lipoarabinomannan Assembly". *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4) Doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0013-2013
22. Fremond CM, Nicolle DM, Torres DS, Quesniaux VF. "Control of *Mycobacterium bovis* BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice" *Microbes Infect*. 2003 Oct;5(12):1070-81. PMID: 14554248
23. Bourigault ML, Segueni N, Rose S, Court N, Vacher R, Vasseur V, Erard F, Le Bert M, Garcia I, Iwakura Y, Jacobs M, Ryffel B, Quesniaux VF. "Relative contribution of IL-1 α , IL-1 β and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG" *Immun Inflamm Dis*. 2013 Oct;1(1):47-62. Doi: 10.1002/iid3.9
24. Bezo J. "Reconocimiento antigénico y respuesta inmune innata en la tuberculosis bovina". *Visa Vet*. 28 de enero de 2009. Visto en <https://www.visavet.es/es/articulos/reconocimiento-antigenico-respuesta-inmune-innata-tuberculosis-bovina.php>
25. Méndez-Samperio P, Belmont L, Miranda E. "Mycobacterium bovis BCG Toll-like receptors 2 and 4 cooperation increases the innate epithelial immune response". *Arch Med Res*. 2008 Jan;39(1):33-9. DOI: 10.1016/j.arcmed.2007.06.019 Almeida PE, Roque NR, Magalhães KG, Mattos

- KA, Teixeira L, Maya-Monteiro C, Almeida CJ, Castro-Faria-Neto HC, Ryffel B, Quesniaux VF, Bozza PT. "Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection" *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1841(1):97-107. Doi: 10.1016/j.bbaliip.2013.10.008
26. Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, Hope JC, Estes DM. "Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle" *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:768542. doi: 10.1155/2011/768542.
27. Mukundan H, Chambers MA, Water WR, Larsen MH. "Tuberculosis, Leprosy and Mycobacterial Diseases of Man and Animals" Primera edición, 2015, E.U.A. ISBN-13: 978 1 78064 396 0. Cap. 8 pp. 136-167
28. Figueroa MC. "Respuesta inmune a la infección por Mycobacterium tuberculosis. Una revisión de la literatura". *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. (14) - núm 2. 2001 Pp. 114-128
29. Norman A. W. (2008) "From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health". *American Journal Clinical Nutriology* 88 pp.491S-4
30. Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E. (2005) "Vitamin D". *American Journal Physiology Renal Physiology*, 289, pp.F8-28. Doi: 10.1152/ajprenal.00336.2004
31. Verway M., Bouttier M., Wang T.T., Carrier M., Calderon M., An B.S., Devemy E., McIntosh F., Divangahi M., Behr M.A., White J.H. (2013) "Vitamin D induces interleukin-1 β expression: paracrine macrophage epithelial signaling controls M. tuberculosis infection" *PLoS Pathogens*. 2013;9(6). Doi: 10.1371/journal.ppat.1003407
32. SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Guía para el seguimiento epidemiológico de la tuberculosis bovina. (2015). Visto en <http://www.senasica.gob.mx/tuberculosis>
33. OMS (Organización Mundial de la Salud). Reporte global de tuberculosis. (2015). Visto en http://www.who.int/tb/publications/global_repor/es/

34. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2014). Capítulo 2.4.7 Tuberculosis Bovina. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE. Visto en http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health.../tahc/.../chapitre_bovine_tuberculosis.pdf
35. Schiller I., Vordermeier H.M., Waters W.R., Whelan A.O., Coad M., Gormley E., Buddle B.M., Palmer M., Thacker T., McNair J., Welsh M., Hewinson R.G., Oesch B. (2010) "Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses". *Veterinary Immunology and Immunopathology* 136 pp. 1–11. Doi: 10.1016/j.vetimm.2010.02.007
36. Andersen P., Munk M.E., Pollock J.M., Doherty T.M. (2000) "Specific immune-based diagnosis of tuberculosis". *The Lancet*, Vol 356, September 23. PMID: 11009160
37. Torres P. (2014) "Las pruebas tuberculínicas en el ganado bovino". Reporte de Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Argentina. Visto en <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1014-101.pdf>
38. Gormley E., Doyle M.B., Fitzsimons T., McGill K., Collins J.D. (2006) "Diagnostics of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay". *Veterinary Microbiology*. 112(2-4):171-9. Doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.029
39. Wood PR., Corner L.A., Rothel J.S., Ripper J.L., Fifis T., McCormick B.S., Francis B., Melville L., Small K., de Witte K. (1992) "A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis". *Veterinary Microbiology*, 31. pp.71-79. PMID: 1615636
40. Ramos D.F., Silva P.E., Dellagostin O.A. (2015) "Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques" *Brazil Journal Biology*. Vol. 75, no. 4, pp. 830-837. Doi: 10.1590/1519-6984.23613
41. Flores-Villalva S., Suárez-Güemes F., Espitia C., Whelan A.O., Vordermeier M., Gutiérrez-Pabello J.A. (2012) "Specificity of the Tuberculin Skin Test Is Modified by Use of a Protein Cocktail Containing ESAT-6 and CFP-10 in Cattle

- Naturally Infected with *Mycobacterium bovis*". *Clinical and Vaccine Immunology* pp. 797–803. Doi: 10.1128/CVI.05668-11
42. Nelson C.D., Reinhardt T.A., Thacker T.C., Beitz D.C., Lippolis J.D. (2010) "Modulation of the bovine innate immune response by production of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D³ in bovine monocytes" *Dairy Science*, 93 pp.1041–1049. Doi: 10.3168/jds.2009-2663.
 43. Nelson C.D., Powell J.L., Price D.M., Hersom M.J., Yelich J.V., Drewnoski M.E., Bird S.L., Bridges G.A. (2016) "Assessment of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations of beef cows and calves across seasons and geographical locations". *Journal Animal Science*. 94 pp.3958–3965. Doi: 10.2527/jas.2016-0611
 44. Salgado G.E., Bouda J., Cecilio A. (2014) "Efecto de la aplicación de prostaglandina F₂ α en las primeras horas posparto sobre las concentraciones séricas de calcio en vacas lecheras". *Revista Veterinaria México*. Vol 1.
 45. Cheng K.H., Hsi E., Liu C.C., Huang C.N., Lee Y.C., Chu C.S., Bao B.Y., Chang C.F., Huang S.P., Kuo P.L., Lai W.T. (2015) "The Associations of Novel Vitamin D³ Metabolic Gene CYP27A1 Polymorphism, Adiponectin/Leptin Ratio, and Metabolic Syndrome in Middle-Aged Taiwanese Males." *International Journal of Endocrinology*. Doi:10.1155/2015/658151