



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Caracterización morfométrica, inmunológica y bacteriológica, de granulomas
procedentes de bovinos naturalmente infectados por *Mycobacterium bovis*.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

Jacobo Carrisoza Urbina

TUTOR PRINCIPAL:

José Ángel Gutiérrez Pabello.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Elizabeth Morales Salinas.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Rogelio Hernández Pando.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“El carácter y forma de ser de una persona,
es como el reflejo de un espejo
formado del entorno de las
personas que lo rodean.”*

Dedicada a mi familia y mis seres queridos que han forjado mi forma de ser.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar.

A mi tutor José Ángel Gutiérrez Pabello, por sus consejos de vida, por abrirme la puerta y darme la oportunidad de desarrollarme en un área en la que disfruto trabajar día a día.

A mi comité tutorial por sus consejos, enseñanzas y ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Mario Adán Bedolla por su gran ayuda y colaboración en este trabajo.

A la Dra. Frida Salmerón Sosa, por su ayuda en el estadístico de este trabajo.

A Pablo Vera por compartir su enseñar su gran experiencia en el laboratorio.

Al Dr. Alejandro Benítez G. por sus grandes consejos y ser un ejemplo a seguir.

A todas las personas que he conocido en mi estancia en el laboratorio y que han aportado su conocimiento en la mejora de este trabajo.

Al personal del departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su gran ayuda en el procesamiento de las muestras y ayudarme a resolver las dudas.

ABSTRACT

Mycobacterium bovis is the etiological agent of bovine tuberculosis which is a chronic inflammatory disease characterized by production of granulomatous lesions. Several studies have been focused on characterizing granulomas in experimentally infected cattle, which has been useful to understand the pathogenesis of the infection and to allow assessment of the protection of prototype vaccines. Nevertheless, few studies have reported macroscopic and microscopic characteristics of these lesions in cattle naturally infected by *M. bovis*. Therefore, in the present study granulomas from 32 Holstein Friesian cattle of a dairy area in central Mexico were studied. In this opportunity sampling 46.8% (15/32) cattle were less than 4 months of age and 53.2% (17/32) were more than one year old. Macroscopically, 100% (32/32) of the animals included, developed lesions suggestive of tuberculosis in mediastinal lymph nodes and 50% (16/32) of lesions were identified in lungs, from these tissues 1143 granulomas were analysed microscopically, of which 34.6% (396/1143) were from 1-year-old cattle or older and were classified according to the methodology of Wangoo et al. 2005., resulting in 34.3% (136/396) at stage IV and 29.0% (115/396) were stage I, frequently were satellites from stages III and IV. Surprisingly, lesions in cattle under 4 months of age showed an unusual pattern that interfered with classification. These granulomas features include large areas of necrosis extending in most of the affected organ, central calcification, absence of connective tissue capsule, an average of 1.4 giant cells per lesion and many positive acid-alcohol resistant bacillus (BAARs), the adult animals had the highest percentage of lesions without bacilli with 47.9% and only 7.4% of this type of lesions was seen in the group of animals less than four months old. These observations suggest that cattle under 4 months of age are unable to control naturally *M. bovis* infection. This knowledge can be useful in understanding natural host resistance to mycobacterial infections.

Keywords; Atypical granulomas, *Mycobacterium bovis*, natural infection, calcification, bovine tuberculosis.

RESUMEN

Mycobacterium bovis es el agente etiológico de la tuberculosis bovina, que es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por producir lesiones granulomatosas. Numerosos estudios se han enfocado a caracterizar las lesiones granulomatosas de bovinos infectados experimentalmente, lo cual ha sido de gran utilidad para comprender la patogenia de la enfermedad además han permitido evaluar la protección de candidatos vacunales. Sin embargo, pocos estudios reportan las características macroscópicas y microscópicas que presentan estas lesiones en bovinos infectados naturalmente por *M. bovis*. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudiaron los granulomas procedentes de 32 bovinos de la raza Holstein Friesian de una cuenca lechera de la región central de México. En el muestreo 46.8 % (15/32) de animales fueron menores de 4 meses de edad y 53.2% (17/32) fueron de más de un año de edad. Macroscópicamente el 100%, (32/32) de los animales incluidos, presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis en la cadena de nódulos linfáticos mediastínicos y el 50% (16/32) también presentaron lesiones en pulmones; de estos animales se analizaron microscópicamente un total de 1143 lesiones granulomatosas, de las cuales el 34.6% (396/1143) fueron de bovinos mayores de un año y de acuerdo a la nomenclatura de Wangoo *et al.* 2005, se clasificaron en estadio IV un 34.3% (136/396) y estadio I un 29.0% (115/396) estos últimos frecuentemente fueron satélites de estadios III y IV. Sorpresivamente, las lesiones en los bovinos menores de 4 meses mostraron un patrón atípico que no permitió identificar su clasificación. Estos granulomas presentan grandes áreas de necrosis que se extienden en la mayor parte del órgano afectado, acompañadas de calcificación central, ausencia de cápsula de tejido conectivo, un promedio de 1.4 células gigantes por lesión y un gran número de bacilos ácido alcohol resistentes (BAARs) positivos. Los animales adultos tuvieron mayor porcentaje de lesiones sin bacilos con un 47.9 % y solo 7.4% de este tipo de lesiones fue vista en el grupo de animales menores de cuatro meses. Los resultados sugieren que los bovinos menores de 4 meses naturalmente infectados, son incapaces de controlar la infección. Este conocimiento puede ser útil en mejor entendimiento de la resistencia natural del huésped a la infección por micobacterias.

Palabras claves; Granulomas atípicos, *Mycobacterium bovis*, infección natural, calcificación, tuberculosis bovina.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO	2
2.1	Patagonia de la tuberculosis bovina	2
2.2	El granuloma en la tuberculosis bovina	3
2.3	Macrófagos	5
2.4	Células gigantes.....	6
2.5	Neutrófilos	8
2.6	Células T $\gamma\delta$	9
2.7	Células B.....	10
3.	JUSTIFICACIÓN	11
4.	HIPÓTESIS.....	12
5.	OBJETIVO GENERAL.....	12
5.1	Objetivos específicos	12
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	13
6.1	Lugar de toma de muestras de tejido de bovino con lesiones sugestivas a tuberculosis. ...	13
6.2	Procedimiento para la toma y transporte de muestras de tejido con lesiones sugestivas a tuberculosis.....	13
6.3	Análisis macroscópico de las lesiones.....	14
6.4	Análisis microscópico de las lesiones.....	15
6.4.1	Histopatología	15
6.4.2	Análisis de imagen.....	15
6.5	Análisis bacteriológico de muestras de tejido de bovino con lesiones sugestivas a tuberculosis.....	16
6.6	Extracción de DNA genómico de <i>Mycobacterium spp</i> a partir de cultivo bacteriano, tejido y bloques de parafina con lesiones sugestivas a tuberculosis.....	17
6.7	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
6.8	Análisis estadístico	19
7.	RESULTADOS	20
7.1	Descripción de lesiones macroscópicas sugerentes de tuberculosis en tejidos de bovinos.	20
7.2	Los nódulos linfáticos mediastínicos y el pulmón fueron los órganos con mayor número de lesiones en bovinos naturalmente infectados con <i>Mycobacterium bovis</i>	23
7.3	Descripción macroscópica de las lesiones granulomatosas encontradas en bovinos naturalmente infectados con <i>Mycobacterium bovis</i>	24
7.3.1	Lesiones microscópicas en bovinos mayores de un año infectados naturalmente con <i>Mycobacterium bovis</i>	26

7.3.2	Lesiones en bovinos menores de cuatro meses de edad infectados naturalmente con <i>Mycobacterium bovis</i> (formación atípica de granulomas).	32
7.3.3	El precipitado de calcio en lesiones granulomatosas causadas por <i>Mycobacterium bovis</i> es independiente de la presencia de capsula de tejido conectivo	40
7.3.4	Bovinos menores de cuatro meses presentan una mayor cantidad de lesiones granulomatosas y bacilos comparado con animales mayores de un año infectados naturalmente por <i>Mycobacterium bovis</i>	42
7.4	Aislamiento bacteriológico y diagnóstico molecular mediante PCR de tejidos con lesiones sugestivas a tuberculosis en animales naturalmente infectados.	45
8.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	48
9.	AGRADECIMIENTO	52
10.	REFERENCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Nódulos linfáticos mediastínicos de bovino con lesiones sugestivas a tuberculosis.
- Figura 2: Granuloma estadio I ó inicial en nódulo linfático de bovino.
- Figura 3: Célula gigante multinucleada.
- Figura 4: Diferentes funciones de los linfocitos B y los anticuerpos en la respuesta contra las micobacterias.
- Figura 5: Pleurobronconeumonía fibrinonecrotica en un bovino de 1 mes de edad asociada *Mannheimia haemolytica*.
- Figura 6: Bronconeumonía supurativa con abscesos multifocales en bovino de 3 años de edad.
- Figura 7: Total de granulomas microscópicos en tejidos de bovinos infectados naturalmente por *M. bovis*.
- Figura 8: Nódulos linfáticos mediastínicos aumentados de tamaño que presentaron histopatología compatible a tuberculosis.
- Figura 9: Corte sagital de nódulos linfáticos mediastínicos con linfadenitis granulomatosa.
- Figura 10: Pulmones de bovinos con lesiones sugestivas a tuberculosis.
- Figura 11: Clasificación histopatológica de granulomas en bovinos.
- Figura 12: Total de granulomas identificados y clasificados en cuatro estadios en animales mayores de un año de edad infectados naturalmente por *M. bovis*.
- Figura 13: Precipitado de calcio en granulomas estadio IV de bovino infectado naturalmente por *M. bovis*
- Figura 14: Presencia de tejido conectivo en granulomas estadio IV de bovinos infectados naturalmente por *M. bovis*.
- Figura 15: Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) 40x con granulomas estadio tipo I satélite de un granuloma estadio IV.
- Figura 16: Tinción de H&E, 40x. Granulomas estadio tipo IV, las flechas señalan la presencia de células gigantes en la periferia de la lesión.
- Figura 17; Promedio de células gigantes en los cuatro estadios de granuloma en bovinos mayores de un año de edad.
- Figura 18: Acúmulo de linfocitos B en un granuloma de bovino infectado naturalmente por *M. bovis*.
- Figura 19: Meningitis granulomatosa en un bovino de 3 años de edad.
- Figura 20: bovino de 3 meses de edad que falleció de timpanismo gaseoso, debido a la comprensión del nervio vago, por linfadenitis granulomatosa en nódulos linfáticos mediastínicos debido a la infección por *M. bovis*
- Figura 21: Linfadenitis granulomatosa en nódulos linfáticos mesentéricos de un bovino de 2 meses de edad.
- Figura 22: Linfadenitis granulomatosa en bovino de 1 mes de edad.
- Figura 23: Neumonía granulomatosa en bovinos menores de 3 meses de edad.
- Figura 24: Distribución de lesiones en bovinos menores de cuatro meses, con lesiones sugestivas a tuberculosis.

- Figura 25: Linfadenitis granulomatosa en bovinos menores de cuatro meses de edad. muestran lesiones atípicas macroscópica y microscópicamente, así como una gran cantidad de BAARS extracelulares
- Figura 26: Clasificación histopatológica de granulomas en nódulos linfáticos de bovinos menores de cuatro meses de edad
- Figura 27: Clasificación histopatológica de granulomas en tejido pulmonar de bovinos menores de cuatro meses de edad.
- Figura 28: Total de granulomas identificados y clasificados en cuatro estadios en animales menores de cuatro meses de edad infectados naturalmente por *M. bovis*
- Figura 29: Lesiones granulomatosas estadio III-IV en nódulos linfáticos y pulmón en bovinos menores de cuatro meses, carecen de capsula de tejido conectivo.
- Figura 30: Lesiones granulomatosas estadio III-IV en nódulos linfáticos en bovinos menores de cuatro meses, con presencia de precipitado de calcio el cual se observa de color obscuro en la imagen (b y f), identificado mediante la tinción de Von Kossa.
- Figura 31: Promedio de lesiones en el grupo de animales mayores de un año y menores de cuatro meses infectados naturalmente por *M. bovis*.
- Figura 32. Porcentaje de lesiones con diferentes rangos de BAARS en el grupo de animales menores de cuatro meses y mayores de un año infectados naturalmente por *M. bovis*.
- Figura 33: Abundante marcaje de BAARS en granuloma de bovino menor de cuatro meses de edad
- Figura 34. Promedio de células gigantes multinucleadas por lesión en el grupo de animales menores de cuatro meses y mayores de un año infectados naturalmente por *M. bovis*.
- Figura 35: las Células gigantes multinucleadas de bovinos menores de cuatro meses presentan una mayor cantidad de bacilos
- Figura 36: Resultado de PCR anidado del gen mpb70 de muestras de cultivo bacteriológico, muestras de tejido y de bloques de parafina que resultaron con lesiones sugestivas a tuberculosis.

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.- Datos de edad, género y tipo de órgano con lesiones sugestivas a tuberculosis en bovinos naturalmente infectados por *M. bovis*.
- Cuadro 2: Resultado de cultivo bacteriológico, histopatología y PCR de bovinos que presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis en el examen *post mortem*.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad ocasionada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), la cual afecta a una amplia gama de mamíferos, incluyendo los seres humanos, ocasionando problemas de salud pública, pérdidas económicas en la industria ganadera debido a la baja producción y los costos de los programas de erradicación, se estima que 50 millones de bovinos se encuentran afectados mundialmente, lo que genera pérdidas de 3 mil millones de dólares anuales (Buddle et al., 2011; Majoor et al., 2011; Waters et al., 2012; Tsairidou et al. 2014). Esta enfermedad se caracteriza por ser un proceso inflamatorio crónico, que afecta principalmente a los pulmones y los nódulos linfáticos asociados, con formación de granulomas de tipo caseoso y necrotizante. Los cambios patológicos asociados con la infección reflejan una interacción entre los mecanismos de defensa del huésped y los factores de virulencia de la micobacteria, así como el equilibrio entre la respuesta inmunológica protectora y el proceso inflamatorio excesivo (Sanchez et al. 2011).

El granuloma es la lesión característica de la tuberculosis, se ha pensado que tiene como función aislar y controlar el número de bacterias, así como restringir el daño tisular mediante la protección del tejido circundante de la inflamación crónica (Domingo et al. 2014). Sin embargo, recientes descubrimientos realizados en el modelo del pez cebra infectados con *Mycobacterium marinum*, han demostrado que el granuloma puede también favorecer a la micobacteria (Ramakrishnan 2012a). El granuloma producido en la infección por *M. bovis*, ha sido objeto de numerosos estudios, con el fin de entender cómo el huésped controla las micobacterias o cómo estas sobreviven a la respuesta inmune, los cuales han permitido comprender mejor la patogenia de la enfermedad (Aranday-Cortes et al. 2013). Estudios en infecciones experimentales de bovinos han permitido describir macroscópicamente y microscópicamente a los granulomas clasificándolos de acuerdo a criterios morfológicos, como la presencia o ausencia de necrosis, la mineralización, y la cápsula de fibrosis (Wangoo et al. 2005). Otras investigaciones han examinado los tejidos u órganos que contienen granulomas, centrándose en las lesiones y en el tejido que las rodea (Thacker et al. 2007; Widdison et al. 2009; Shu et al. 2014). También, se han implementado diferentes técnicas para un mejor estudio de

su composición celular e inmunológica, como el uso de inmunohistoquímica (IHC) o microdissección de captura por láser en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (Wangoo et al. 2005; Johnson et al. 2006a; Palmer et al., 2007; Aranday-Cortes et al. 2013) . No obstante, se desconoce cuáles son las características macroscópicas y microscópicas del granuloma producido por *Mycobacterium bovis* en una infección natural, que se asocian con la presencia de un reducido número de bacilos ácido alcohol resistente. Por lo que en este trabajo se pretende ampliar el conocimiento de los granulomas de bovinos infectados naturalmente por *M. bovis* mediante técnicas histopatológicas y bacteriológicas, lo que nos permita comprender mejor la patogénesis de la enfermedad en bovinos naturalmente infectados, este conocimiento puede ser útil en una mejor comprensión de la resistencia natural del huésped a la infección por micobacterias.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Patogénesis de la tuberculosis bovina

M. bovis miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, provoca lesiones granulomatosas crónicas afectando principalmente a los pulmones y nódulos linfáticos asociados, de bovinos naturalmente infectados, así mismo puede afectar a diferentes órganos relacionado con la ruta de ingreso, donde las lesiones pueden ser localizadas, afectando solo un órgano o generalizadas involucrando varios órganos (Domingo et al. 2014).

Se piensa que la vía aerógena es la principal ruta de ingreso en la infección natural por *M. bovis* en el ganado bovino la cual es debida a la inhalación de aerosoles de un animal infectado y por vía digestiva por el consumo de alimento como pastura, agua, leche etc. contaminados. (Domingo et al. 2014) Esto se ha reproducido en infecciones experimentales donde la inoculación de una cepa virulenta de *M. bovis* vía aérea produjo lesiones similares a las encontradas en infecciones naturales. (Domingo et al. 2014). Una vez que la micobacteria ingresa al huésped, es reconocida por las células fagocíticas, las cuales inician el reclutamiento de macrófagos, células dendríticas y neutrófilos entre otras células que tratan de eliminar las bacterias y controlar la infección. Los macrófagos se han considerado la principal población celular que infectan las micobacterias, estas células fagocíticas

interactúan con las células de la respuesta inmune innata y adquirida formando la lesión conocida como granuloma, la cual se ha visto que se puede formar a partir del día 7-11 después de la infección por *M. bovis* (Pollock et al. 2006).

2.2 El granuloma en la tuberculosis bovina

El granuloma es una estructura compacta, compuesta de células de la respuesta inmune, formado por una respuesta inflamatoria crónica la cual puede ser causada por diferentes agentes antigénicos o por cuerpos extraños inertes que son difíciles de eliminar (Ndlovu & Marakalala 2016). El granuloma es la lesión característica de la tuberculosis, donde participan el sistema inmune innato y adquirido, tratando de controlar la infección crónica causada por las micobacterias (Ramakrishnan 2012). Los descubrimientos recientes en un modelo de infección de larva del pez con *Mycobacterium marinum*, han permitido estudiar la formación del granuloma en tiempo real, debido a la transparencia de su piel. En una mejor comprensión del papel del patógeno en la formación del granuloma, se ha observado que las micobacterias virulentas aceleran la formación del granuloma. Por otra parte se ha visto que el sistema inmune innato es capaz de formar una lesión inicial con la participación de macrófagos y macrófagos epiletiodes (Davis et al. 2002; Ndlovu & Marakalala 2016; Volkman et al. 2004).

En el ganado bovino la infección por *M. bovis* causa lesiones granulomatosas que morfológicamente son similares a los ocasionados por *Mycobacterium tuberculosis* en el humano, con la diferencia de que las lesiones necróticas en humanos pueden convertirse en licuefactivas con abundantes bacilos (Waters et al. 2014), por lo que el modelo de tuberculosis bovina es un modelo atractivo del estudio de la patogenia de la enfermedad (Cassidy 2006; Waters et al. 2014).

Macroscópicamente estas lesiones se presentan como nódulos de color blanco o amarillo, algunas lesiones presentan calcificación, que crepita al corte, estas lesiones pueden ser aisladas y medir unos milímetros u ocupar gran parte del órgano que afectan (**Figura 1**).

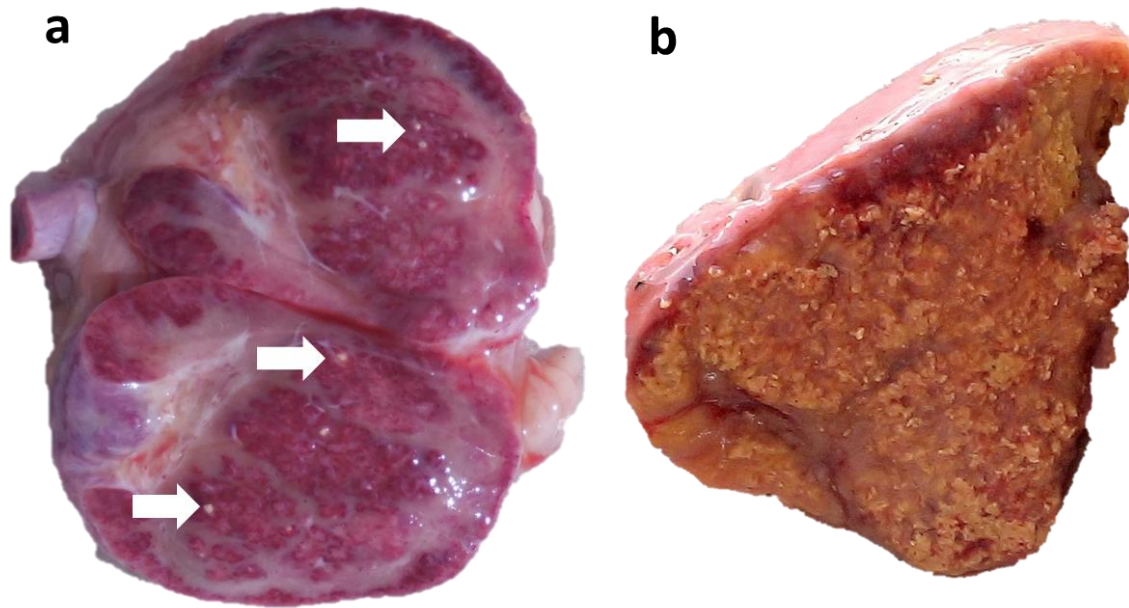


Figura 1: Nódulos linfáticos mediastínicos de bovino con lesiones sugestivas a tuberculosis. (a) Lesiones multifocales, del tamaño de la cabeza de un alfiler señaladas por las flechas (b) Lesión que ocupa la mayor parte del parénquima con abundante necrosis caseosa la cual crepita al corte.

Microscópicamente estas lesiones conocidas como granulomas, se caracterizan por formar un agregado de células inflamatorias compuesto principalmente por neutrófilos, macrófagos, macrófagos epitelioides, células gigantes, linfocitos T de tipo CD4 y CD8, así como células plasmáticas las cuales rodean a las micobacterias, que principalmente se encuentran en el centro de la lesión, infectando los macrófagos y en zonas con necrosis. En el 2005 Wangoo *et al.* proponen una clasificación de los granulomas, que consiste en cuatro estadios o fases por los que evolucionan las lesiones de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, tomando como criterios de clasificación, la presencia o ausencia de: células gigantes, capsula de tejido conectivo, necrosis y calcificación. El Estadio I: representa la etapa inicial de la lesión, donde se han observado grupos de macrófagos epitelioides, células de tipo Langhans con linfocitos intercalados sin presencia de necrosis, algunas veces se observa un infiltrado de neutrófilos. Estadio II: se encuentran macrófagos epitelioides, células de tipo Langhans multinucleadas, mayor cantidad de linfocitos y necrosis caseosa en el centro de la lesión. Los granulomas del estadio III: están completamente encapsulados, con abundantes células gigantes, la necrosis caseosa está bien desarrollada, pero la mineralización

es mínima. El Estadio IV: presenta necrosis y mineralización con una gruesa cápsula de tejido conectivo, macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas que rodean la extensa área de necrosis, también se ha observado acumulo de linfocitos distribuidos cerca de la cápsula fibrótica.

Numerosos estudios se han enfocado en caracterizar las lesiones granulomatosas de bovinos infectados experimentalmente, lo cual ha sido de gran utilidad para comprender mejor la patogenia de la enfermedad y permitir evaluar la protección de nuevas vacunas (Palmer et al. 2007; Widdison et al. 2011; Menin et al. 2013a; Palmer et al. 2015). Sin embargo, poco se sabe de la participación de los diferentes tipos celulares en el granuloma causado por *M. bovis* en el ganado bovino, a continuación se describe brevemente lo que se conoce de la función de las células que forman el granuloma de la tuberculosis bovina.

2.3 Macrófagos

Los macrófagos forman parte de la respuesta inmune innata contra bacterias patógenas, así mismo tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis, siendo considerados el principal reservorio durante la infección temprana y crónica de las micobacterias patógenas, las cuales tienen la capacidad de sobrevivir y llevar a cabo su ciclo biológico dentro del macrófago infectado. Esto ha planteado la duda de si estas células son capaces de controlar la infección o solo funcionan como un vehículo que permiten la diseminación de las micobacterias (Russell 2001).

Los macrófagos y las células dendríticas son las principales en iniciar la formación del granuloma, estas células producen citocinas y quimiocinas que provocan el reclutamiento de diferentes tipos celulares de la respuesta inmune innata y adquirida, incluidos neutrófilos, células asesinas naturales, linfocitos T, linfocitos B y fibroblastos (Guirado et al. 2013). En el granuloma se ha observado diferentes fenotipos de macrófagos como son: células epitelioides, células espumosas, células gigantes de tipo Langhans lo que puede deberse a la flexibilidad de estas células en cambiar su fenotipo y fisiología de acuerdo al microambiente donde se encuentran (Mosser & Edwards 2008). No obstante, también se ha identificado que la micobacteria puede participar en la diferenciación celular de los macrófagos hacia

células gigantes multinucleadas (Herrtwich *et al.* 2016).

Histológicamente los granulomas iniciales causados por *M. bovis* en el ganado bovino están formados principalmente por macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas que incrementan en número conforme aumenta el avance de la lesión, posteriormente se localizan rodeando el centro de necrosis **Figura 2**.

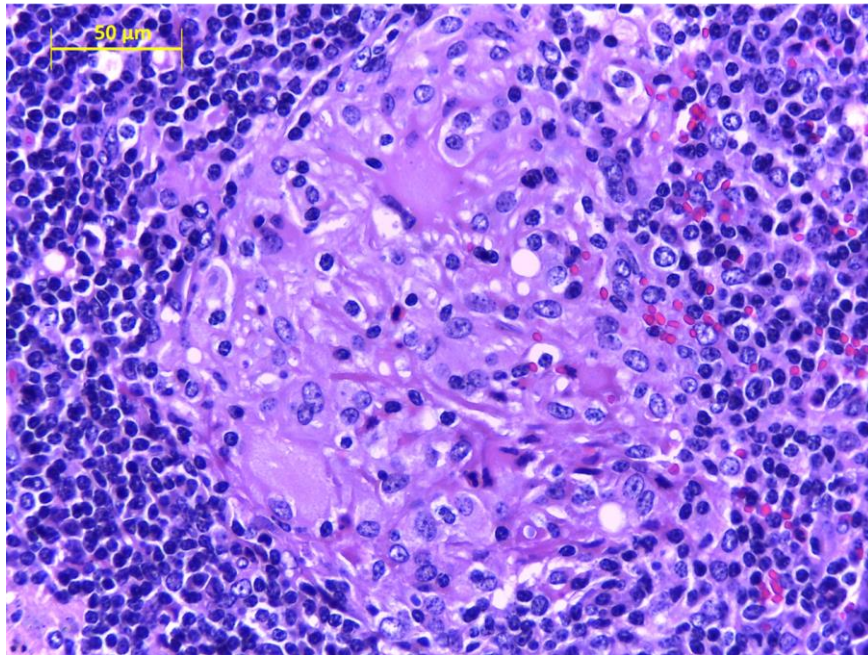


Figura 2: Granuloma estadio I ó inicial en nódulo linfático de bovino. H&E, 400x. Mostrando un acúmulo de macrófagos epitelioides y células gigantes.

2.4 Células gigantes

Las células gigantes multinucleadas han sido un marcador histopatológico de lesiones sugestivas a tuberculosis. No obstante, es posible encontrarlas en enfermedades granulomatosas crónicas como algunas alergias, autoinmunes, vasculitis, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis, así como en granulomas inducidos por cuerpos extraños, entre otras.

Se pensaba que la formación de este tipo de células en la tuberculosis ocurría a través de la fusión de célula-célula como se había demostrado en osteoclastos (Helming and Gordon, 2009). Sin embargo, recientemente se demostró que las células gigantes se forman por modificación en la división celular y un defecto mitótico. Herrtwich *et al.* (2016) demostraron *in vitro* que la estimulación de

progenitores de macrófagos y células dendríticas con M-CSF y lipoproteínas bacterianas, da como resultado la formación de células multinucleadas. Lo cual demuestra la participación de la micobacteria en la formación de estas células, las cuales frecuentemente se encuentran infectadas (Herrtwich *et al.* 2016) (**Figura 3**).

En el granuloma del ganado bovino las células gigantes expresan mediadores químicos como iNOS y diferentes citocinas como TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-17A e IL-10 en diferentes grados (Pereira-Suárez *et al.* 2006; Palmer *et al.* 2016;). Además, estas células parecen tener una correlación con la progresión de lesión ya que se han observado mayoritariamente en lesiones con necrosis y calcificación, así mismo se observa, una menor presencia de estas células se observa en animales vacunados con BCG y posteriormente desafiados con *M. bovis*. Adicionalmente en un estudio donde histológicamente se comparó las lesiones causada por *M. caprae* y *M. bovis* en jabalís infectados naturalmente, se encontró una mayor cantidad de células gigantes en lesiones provocadas por *M. caprae* que se correlacionó con un mayor grado de patogenicidad (García-Jiménez *et al.* 2013).

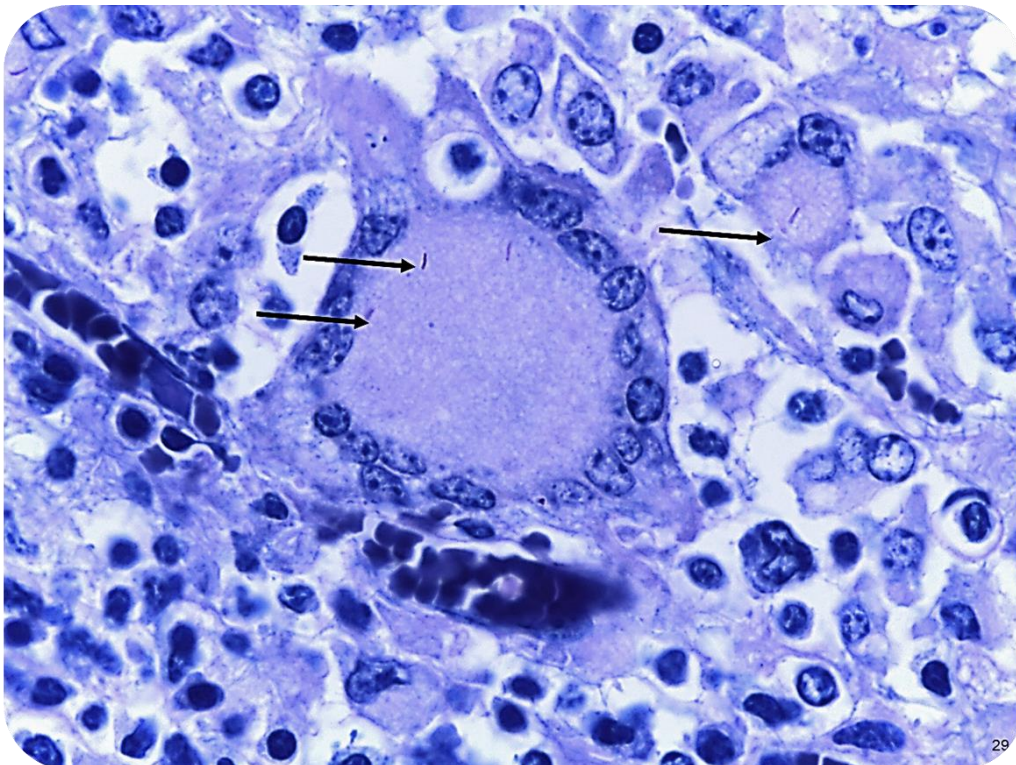


Figura 3: Célula gigante multinucleada. Se observa una célula gigante multinucleada con bacilos cercanos a los núcleos (flechas) Zielh Neelsen, 1000x.

2.5 Neutrófilos

Los neutrófilos son fagocitos profesionales de vida corta que son reclutados rápidamente al sitio de infección, donde fagocitan a las bacterias mediante reconocimiento directo y opsonización, promoviendo una rápida fusión del fagosoma con el lisosoma y matando a las bacterias por reacciones de oxidación mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno, jugando un papel fundamental en el inicio de la respuesta inmune innata y adaptativa (Lowe et al. 2012). Sin embargo, es polémico si los neutrófilos pueden eliminar a las micobacterias que fagocitan, especialmente las cepas virulentas, debido a que se ha reportado que los neutrófilos son las principales células con mayor carga de bacilos encontradas en los lavados bronqueoalveolares y esputo de pacientes con tuberculosis activa, cepas virulentas de *M. tuberculosis* pueden vivir dentro de los neutrófilos a pesar de los componentes microbicidas de estas células, y se ha demostrado que pueden escapar induciendo la muerte por necrosis del neutrófilo de una manera independiente de ROS (Corleis et al. 2012). En neutrófilos de bovinos infectados se observa que *M. bovis* también es capaz de sobrevivir y escapar de las células, además de inducir autofagia de una manera aún no determinada (Wang et al. 2013).

La participación de los neutrófilos en el granuloma del bovino causado por *M. bovis* ha sido poco estudiada, algunos estudios han reportado una baja participación de estas células (Wangoo et al. 2005 y Palmer et al. 2007), aunado a esto, los rumiantes son considerados una especie “linfocitaria”, debido a su alto porcentaje de linfocitos en sangre periférica 60-75 % y un bajo porcentaje de neutrófilos del 20-30%, comparado con el ser humano donde los neutrófilos alcanzan valores de 70-80%. No obstante, los neutrófilos se han observado en etapas tempranas del granuloma del ganado bovino, principalmente en lesiones localizadas en el pulmón lo que demuestra su posible participación de estas células en la formación del granuloma (Johnson et al. 2006). En cabras afectadas naturalmente por *M. bovis* las cuales muestran lesiones cavitarias semejantes a las encontradas en humanos, se ha observado un mayor número de neutrófilos comparado con lesiones necróticas (Sanchez et al. 2011). En humanos este tipo de lesiones se asocia con tuberculosis activa, donde se observa una gran cantidad de neutrófilos, siendo estas células las

principalmente infectadas por el bacilo (Dallenga & Schaible 2016).

La participación de los neutrófilos en la patogenia de la tuberculosis ha sido controversial, haciendo referencia a estas células como el “caballo de Troya” debido a que podrían participar en la diseminación del bacilo a sitios distales de la infección por su posible falla en su capacidad microbicida hacia las micobacterias (Eruslanov et al. 2005). Si los neutrófilos son capaces de o no de eliminar al bacilo, puede ser debido a diferentes factores tanto del huésped como, el microambiente del tejido infectado, la etapa de la infección y por otra parte la virulencia de la micobacteria (Lowe et al. 2012).

2.6 Células T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ constituyen entre el 5 y 10% del porcentaje de las células T en la circulación sanguínea en humanos y ratones respectivamente, interesantemente en rumiantes jóvenes estas células representan hasta un 50-70% del porcentaje, el cual disminuye a un 12% en animales adultos (Kabelitz 2011). En bovinos se han identificados dos subgrupos de estas células, basándose en la expresión del antígeno WC1 (*workshop cluster antigen-1*) y sus isoformas de WC1.1 y WC1.2. Donde el primer subgrupo se caracteriza por secretar IFN- γ y el segundo es más sensible a la estimulación por mitógenos (Price et al. 2010). Estas células tienen características tanto del sistema inmune innato y adaptativo, por lo que también son consideradas como células T transitorias de la respuesta inmune (Vantourout & Hayday 2013).

Estudios en bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis* han reportado una correlación entre la cantidad de células T $\gamma\delta$ con el grado de organización de las lesiones, principalmente al inicio de la formación del granuloma (Plattner et al. 2009). También se ha visto que estas células se acumulan rápidamente en nódulos linfáticos de la cabeza y tejido pulmonar después de la vacunación intranasal con la cepa *M. bovis* BCG en becerros, así mismo se aumenta la proporción en sangre periférica linfocitos WC1+ T $\gamma\delta$ productores de INF- γ (Guzman et al. 2012).

A pesar del reciente progreso en el estudio de células T WC1+ $\gamma\delta$, aún se desconoce su función e importancia en la respuesta inmune. Sin embargo, el ganado bovino ofrece una alternativa como modelo de estudio de estas células y en

el diseño de vacunas contra la tuberculosis dirigida al reclutamiento de células WC1+ $\gamma\delta$ que podrían ofrecer buenos resultados (Vantourout & Hayday 2013).

2.7 Células B

En la patogenia de la tuberculosis la respuesta inmune celular es considerada la de mayor participación en la defensa contra las micobacterias, en comparación con la respuesta inmune humoral la cual ha sido subestimada en la intervención contra los patógenos intracelulares (Rao et al. 2015). Sin embargo, recientes estudios han evidenciado la participación de linfocitos B y los anticuerpos en mecanismos como: la activación del complemento, opsonización, modulación de la inflamación y actividad antimicrobiana directa contra micobacterias como se muestra en la **figura 4**.

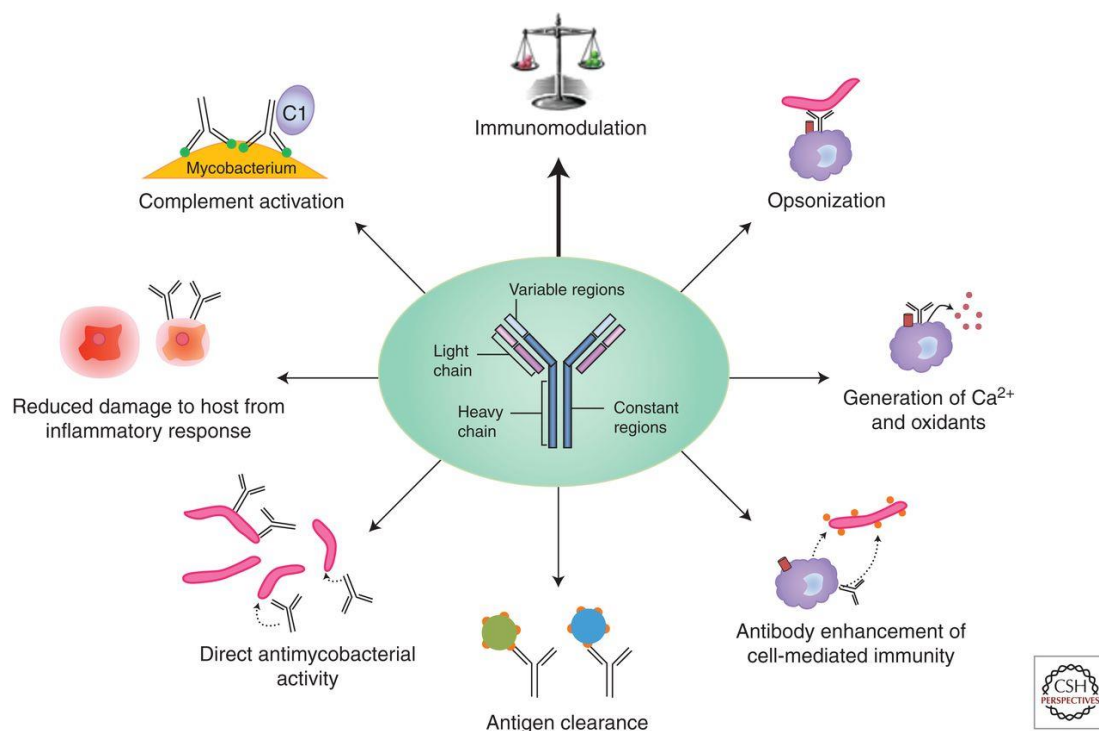


Figura 4: Diferentes funciones de los anticuerpos en la respuesta contra las micobacterias. Tomado de: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/3/a018432/F1.expansion.html>

En algunos reportes las células B también forman parte de las lesiones granulomatosas, constituyendo un 20% del infiltrado (Co et al. 2004) y se ha observado que forman agregados de células parecidos a los centros germinales encontrados en los nódulos linfáticos, que contienen principalmente células vírgenes, células plasmáticas, células B de memoria y un infiltrado de linfocitos T

CD4+ y CD8+ (Ulrichs et al. 2004). Estos nódulos de células B también se han identificado en enfermedades que cursan con un proceso inflamatorio crónico como esclerosis múltiple y artritis reumatoide, así como en infección del virus de influenza y *Helicobacter* (Kozakiewicz et al. 2013). En lesiones granulomatosas causados por la infección de miembros del complejo *M. tuberculosis* en ratones, humanos, venados, bovinos entre otras especies también se han observado agregados de células B en la periferia de las lesiones (Ulrichs et al. 2004; Johnson et al. 2006; García-Jiménez et al. 2012; Aranday-Cortes et al. 2013). En un estudio realizado en cabras infectadas naturalmente con *M. caprae*, en donde se compararon las poblaciones celulares de granulomas y lesiones cavitarias, se observó una mayor cantidad de linfocitos B y células plasmáticas en los granulomas comparado con las lesiones cavitarias (Sanchez et al. 2011).

En lesiones causadas por *M. bovis* en bovinos infectados experimentalmente, se han observado agregados de células B principalmente en lesiones avanzadas, estadios III y IV rodeando la cápsula de fibrosis (Aranday-Cortes et al. 2013). Como dato interesante, en animales vacunados con *M. bovis* BCG y desafiados con *M. bovis*, se ha observado un aumento de estas células en estadios II al IV (Johnson et al. 2006; Salguero et al. 2016). Por lo que se ha considerado que estas células participan en el control de *M. bovis* tanto directa como indirectamente, controlando la respuesta inmune local en la lesión.

3. JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios se han enfocado en caracterizar las lesiones granulomatosas de bovinos infectados experimentalmente, lo cual ha sido de gran utilidad para comprender la patogenia de la enfermedad y permitir evaluar la protección de candidatos de vacunas. Sin embargo, pocos estudios reportan las características macroscópicas y microscópicas que presentan estas lesiones en bovinos infectados naturalmente por *M. bovis*.

Este estudio ayudará a comprender mejor la patogénesis de la enfermedad, así como las lesiones granulomatosas, en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*. Además, este conocimiento será útil para un mejor entendimiento de la resistencia natural del huésped a la infección por micobacterias.

4. HIPÓTESIS

Los granulomas provenientes de bovinos naturalmente infectados por *M. bovis*, que microscópicamente presenten mayor cantidad de muerte celular de tipo apoptótico menor muerte celular de tipo necrótico, un predominio de macrófagos productores de iNOS, linfocitos CD4+ y CD8+ productores de IFN- γ , tendrán un menor número de micobacterias.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar macroscópica, microscópica y bacteriológicamente, granulomas procedentes de bovinos naturalmente infectados por *M. bovis*.

5.1 Objetivos específicos

- Caracterizar granulomas procedentes de bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*, de acuerdo a su forma, tamaño, presencia de calcificación, consistencia, localización de la lesión y clasificación histológica de acuerdo a Wangoo et al. (2005), además de la presencia de tejido conectivo.
- Identificar la presencia de *M. bovis* mediante el aislamiento bacteriológico de las muestras colectadas.
- Calcular el porcentaje de células gigantes, macrófagos, linfocitos CD4+, CD8+, Linfocitos B, mediadores químicos como IFN- γ y iNOS, así como muerte celular (apoptosis y necrosis), en los diferentes estadios de los granulomas.
- Cuantificar bacillos ácido alcohol resistente mediante la tinción de Ziehl-Neelsen en las lesiones granulomatosas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Lugar de toma de muestras de tejido de bovino con lesiones sugestivas a tuberculosis.

Las muestras de tejido se colectaron en la sala de necropsias del complejo agropecuario de Tizayuca, Hidalgo y del centro de enseñanza y diagnóstico de enfermedades de bovinos (CEDEB) de la FMVZ-UNAM, los cuales se encuentran en las instalaciones del complejo agropecuario de Tizayuca. Este complejo comprende 120 establos con un aproximado de 28,000 bovinos lecheros, con un tipo de producción intensiva, ubicado en el estado de Hidalgo, en el municipio de Tizayuca, carretera federal México, Pachuca, Km 51.5, en las coordenadas 19° 50'8" longitud oeste.

Se desconoce la prevalencia de tuberculosis bovina que presenta la cuenca. Sin embargo, se calcula que la prevalencia a nivel nacional de tuberculosis en zonas lecheras de acuerdo a la Secretaría de Agricultura Pesca y Ganadería (SAGARPA) es mayor al 16%.

6.2 Procedimiento para la toma y transporte de muestras de tejido con lesiones sugestivas a tuberculosis.

Se realizó el examen *post mortem* a bovinos de la raza Holstein Friesian que llegaron a la sala de necropsia del CEDEB y en la sala de necropsias del complejo agropecuario de Tizayuca, en busca de lesiones sugestivas a tuberculosis. Se colectaron los siguientes datos de cada bovino: edad, género, número de establo, así como la causa posible de muerte o motivo por el cual se había enviado a sacrificio.

La técnica de necropsia consistió en inspeccionar el cadáver en forma externa e internamente, se disecaron los órganos por sistemas. Se colectaron muestras de nódulos linfáticos retrofaríngeos, mediastínicos, retromamarios y mesentéricos, así como tejido pulmonar, que presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis.

Los tejidos seleccionados fueron divididos a la mitad, una parte fue utilizada para el aislamiento bacteriológico y la otra para histopatología, estas se transportaron en las siguientes soluciones;

- Bacteriología: Frascos con solución de borato de sodio saturada estéril en proporción de 1:1. (tejido-volumen).
- Histopatología e inmunohistoquímica: Frascos con solución de formalina amortiguada al 10% en proporción de 1:10 (tejido-volumen).

También se colectaron muestras de animales que presentaban inflamación de nódulos linfáticos sin lesiones macroscópicas aparentes, pero que provenían de un hato donde anteriormente se había detectado histopatológicamente lesiones compatibles a tuberculosis. Las muestras se identificaron con sus datos generales, ubicación de la explotación de origen, la reseña del animal (especie, raza, sexo, edad, etc.), identificación precisa del animal (arete, marcas u otros) y órganos colectados. Posteriormente fueron transportadas al laboratorio de Investigación de Tuberculosis y Brucelosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Las muestras colectadas para bacteriología fueron retiradas del borato de sodio, en un gabinete de bioseguridad tipo II ubicado en la unidad de bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, posteriormente fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

6.3 Análisis macroscópico de las lesiones.

Se realizó la descripción macroscópica de las lesiones encontradas en la inspección *post mortem* de cada bovino que llegó a la sala de necropsias, los animales que presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis fueron incluidos en el estudio. La descripción macroscópica de las lesiones consistió en: identificar el tejido donde se localizaron, el tipo de distribución (focal o miliar), si presentaban calcificación y medir el tamaño.

6.4 Análisis microscópico de las lesiones.

6.4.1 Histopatología

El estudio histopatológico tuvo como objetivo observar lesiones compatibles con tuberculosis, caracterizar los granulomas en los diferentes estadios, contabilizar el número de células gigantes multinucleadas y el número de bacilos ácido alcohol resistente.

Las muestras se colectaron en solución de formalina al 10% pH 7.2 en una relación de tejido-volumen 1:10, donde se dejaron de 24 a 48 horas para permitir la fijación de los tejidos.

Las muestras se trasladaron al departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde en una campana de extracción se retiraron los tejidos de la solución de formalina y se colocaron sobre toallas desechables para absorber mejor la solución de formalina, las muestras de tejido fueron cortadas a un grosor de 2-5 mm aproximadamente seleccionando áreas de tejido normal y anormal, posteriormente se colocaron en casetes de inclusión para histopatología, los casetes posteriormente fueron embebidos en parafina y se procesaron con la técnica histológica de rutina. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 2 a 3 μm de grosor los cuales fueron colocados en portaobjetos para su posterior tinción con hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Masson, Von Kossa y Ziehl-Neelsen (ZN).

6.4.2 Análisis de imagen

Las secciones teñidas con H&E se utilizaron para realizar la cuantificación de los granulomas de acuerdo a los cuatro estadios que describe Wangoo et al. (2005), describiendo si estos presentaban tejido conectivo, necrosis mineralización, además, se cuantificaron las células gigantes multinucleadas en cada estadio de la lesión.

En las muestras teñidas con ZN, se cuantificaron bacilos ácido alcohol resistentes, contando el número total de bacterias presentes en cada granuloma usando el método descrito por García-Jiménez et al (2012). El número de bacilos presentes se

registró en una escala de 0-3: donde 0, ausencia de bacilos, 1; de uno a diez, 2; de once a cincuenta y 3; mayor a cincuenta bacilos.

6.5 Análisis bacteriológico de muestras de tejido de bovino con lesiones sugestivas a tuberculosis.

Para determinar la presencia de *M. bovis* en las muestras de ganado bovino con lesiones sugestivas a tuberculosis, se realizó el aislamiento bacteriológico en el laboratorio de bioseguridad de la FMVZ, UNAM, el cual se encuentra autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), para el diagnóstico de tuberculosis bovina, donde se llevó a cabo el siguiente procedimiento: en la campana de bioseguridad tipo II se seleccionaron aproximadamente 2 cm² de tejido de cada muestra colectada, este fue colocado en un mortero con arena previamente esterilizado, si el tejido presentó exudado, se eligió un fragmento de la parte externa de la lesión y otro de la parte interna de la lesión, cuando la muestra fue muy pequeña se incluyó por completo; en los casos donde no se observaron lesiones, se seleccionó una muestra representativa. Se retiró el exceso de tejido conectivo y adiposo, además de cortar la muestra en trozos más pequeños con ayuda de tijeras, para facilitar el macerado, con el cual se obtuvo una mezcla fina, a la cual se agregó de 5 a 7 ml de agua destilada estéril que se colocó en dos tubos de 15 ml, a uno de estos se le agregó 1 ml de macerado, el resto fue colocado en el segundo tubo y guardado en congelación. El tubo con un ml de macerado fue utilizado para el proceso de descontaminación, el cual consistió en añadir 5 partes de ácido clorhídrico al 10% y de 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1% hasta que viro a un color naranja, se agito y dejó en reposo por 20 minutos, después se agregó gota a gota de una solución de hidróxido de sodio 2 N agitando el tubo hasta que viro a un color violáceo (morado a lila). En una centrifuga con canastillas de seguridad, la muestra fue centrifugada a 3,000 rpm por 20 minutos se desechó el sobrenadante y dejó aproximadamente un ml, el cual se utilizó para resuspender el sedimento. Con pipetas de transferencia se agregó aproximadamente 0.5 ml sobre la superficie de los tubos de medio de cultivo Lowenstein Jensen y Stonebrink, que finalmente se incubaron a 37°C. Los tubos sembrados fueron colocados en posición horizontal el primer día para permitir el secado de la muestra sobre la superficie del medio y en posición vertical después del segundo día. Se revisaron los medios

semanalmente durante 8-12 semanas. En caso de contaminación los tubos fueron desechados y se realizó nuevamente el procedimiento con la muestra macerada colocada en congelación.

6.6 Extracción de DNA genómico de *Mycobacterium spp* a partir de cultivo bacteriano, tejido y bloques de parafina con lesiones sugestivas a tuberculosis.

Muestras de cultivos que resultaron con crecimiento sugerente a *Mycobacterium spp*, así como tejido de casos donde no se logró el aislamiento y de bloques de parafina de casos que resultaron con histopatología compatible a tuberculosis, se realizó la extracción de DNA genómico de acuerdo al protocolo propuesto por Van Helden et al. (2001). En condiciones de bioseguridad para el manejo de muestras sugestivas a tuberculosis se tomaron de 2 a 4 colonias del cultivo con crecimiento sugerente a *Mycobacterium spp* y aproximadamente 0.5 ml de tejido macerado proveniente de los casos colectados donde no fue posible el aislamiento bacteriológico, estos se colocaron en tubos de 2ml y se agregó 400 µl de TE (100mM tris-HCl, 10mM EDTA pH 8), posteriormente fueron inactivados por 30 min a 80°C en un baño María, se agregó 50 µl de lisozima (10mg/ml) (SIGMA-Aldrich USA) y se dejaron incubar por 16 horas a 37°C. Después de la incubación se añadió 75 µl de SDS al 10% y 50 µl de proteinasa K (1mg/ml) (SIGMA-Aldrich, USA) incubando 20 minutos a 65°C. para evitar que el DNA se uniera al N-cetyl-N,N-trimetyl bromuro de amonio (CTAB) (SIGMA-Aldrich, USA) se agregaron 100 µl de NaCl 5 M y posteriormente 100 µl la solución de CTAB dejando incubar nuevamente por 10 minutos a 65°C.

La extracción de ADN se realizó con 700 µl cloroformo/alcohol isoamílico en una relación de 24:1 respectivamente (SIGMA-Aldrich, USA) centrifugando a 12,000 rpm por 5 min, recuperando la fase líquida y repitiendo el paso con un ml de cloroformo/alcohol isoamílico. Posteriormente se precipitó el ADN con 0.7 volúmenes alcohol isopropílico absoluto (SIGMA-Aldrich, USA), colocándolo durante 30 min a -20°C, finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min decantando el alcohol isopropílico y se lavó con 1 ml de alcohol etílico al 70. La pastilla de ADN se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas (GIBCO, Auckland, N.Z).

Para los casos donde solo se contó con bloques de parafina, la extracción de ADN se realizó de acuerdo a van Helden et al. (2001). Secciones de 12 micras de grosor fueron cortadas con un micrótopo, el cual fue limpiado con alcohol al 70% después de cada corte para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Se agregó 1 ml de Xilol a la sección de tejido, la cual se agitó en un Vortex y se incubó por 5 min. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, se decantó el Xilol y se lavó dos veces con alcohol etílico absoluto, dejando secar y resuspender en 400 µl de TE. Continuando con el procedimiento descrito arriba.

La concentración y pureza del ADN se evaluó por espectrometría (D.O. a 260/280 nm) utilizando un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer), para evaluar la integridad de las muestras se utilizó electroforesis con un gel de agarosa al 0.7% durante 60 min a 80 volts.

6.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con la finalidad de identificar si los casos que presentaron lesiones compatibles con tuberculosis en la histopatología fueron debidas a los miembros del Complejo *Micobacterium tuberculosis*, se utilizó la metodología propuesta por Estrada-Chávez et al. (2004) quien propone un PCR anidado para la amplificación de un fragmento del gen mpb70.

La reacción de PCR se realizó usando un juego de reactivos comercial (TopTaq Master Mix Kit®) de acuerdo a las indicaciones y concentraciones que indica el fabricante. A cada reacción se agregó 50 ng de ADN de muestra. Los protocolos de amplificación se realizaron en un termociclador (Thermo-Hyaid, USA). Para el PCR simple se ocuparon los iniciadores del gen mpb70 que amplifican un producto de 372 pb, los iniciadores usados fueron los siguientes: mpb70 F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') y mpb70 R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos, y finalmente un ciclo de 72°C por 5 minutos. Posteriormente se realizó una segunda reacción, utilizando como DNA el amplificado de reacción de mpb70, para obtener un producto de 208 pb del mismo gen, utilizando los iniciadores M22 F (5'-GCTGACGGCTGCACTGTCCGGC-3') y

M22 R (5'-CGTTGGCCGGGCTGG TTTGGCC-3'). Utilizando 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.

El resultado de las reacciones de PCR se separó mediante de electroforesis en gel de agarosa al 2%, con solución TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8), SYBR® Green (S9430 SIGMA-ALDRICH) para teñir el ADN y un marcador de peso molecular de 100-1,500 pb (Ready to use DDL-001). El producto de la reacción fue visualizado utilizando un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, UK).

6.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el programa PASW Statistics 18, utilizando como herramientas estadísticas Chi cuadrada de independencia y el coeficiente de correlación de Spearman, para identificar si la cantidad de bacilos son dependientes del estadio de la lesión y si existe correlación entre variables.

7. RESULTADOS

7.1 Descripción de lesiones macroscópicas sugerentes de tuberculosis en tejidos de bovinos.

Se realizó el examen *post mortem* de 95 bovinos de la raza Holstein Friesian, de los cuales 32 bovinos presentaron lesiones macroscópicamente sugerentes a tuberculosis, ha estos animales se les tomaron muestras de tejido que posteriormente en el laboratorio fueron confirmados con lesiones histológicas compatibles a tuberculosis. El resto de los animales presentó principalmente lesiones asociadas a infección por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma spp.* principalmente **(Figura 5 y Figura 6)**.

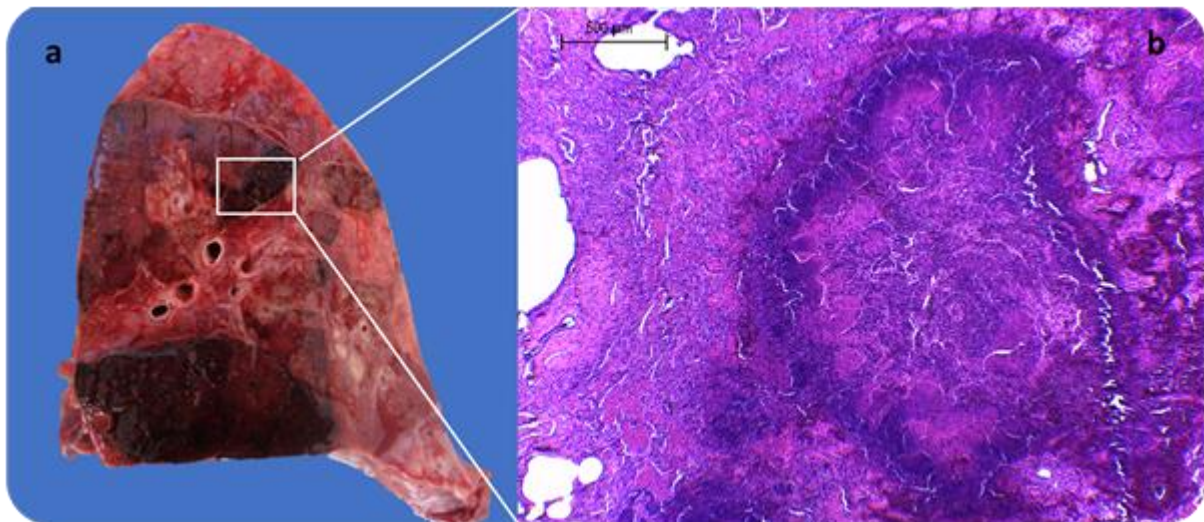


Figura 5: Pleurobronconeumonía fibrinonecrótica en un bovino de 1 mes de edad asociada *Mannheimia haemolytica*. (a) Sección transversal de tejido pulmonar de bovino con pleurobronconeumonía fibrinonecrótica (b) H&E, 40x. Absceso en tejido pulmonar sugerente a *Mannheimia haemolytica*.

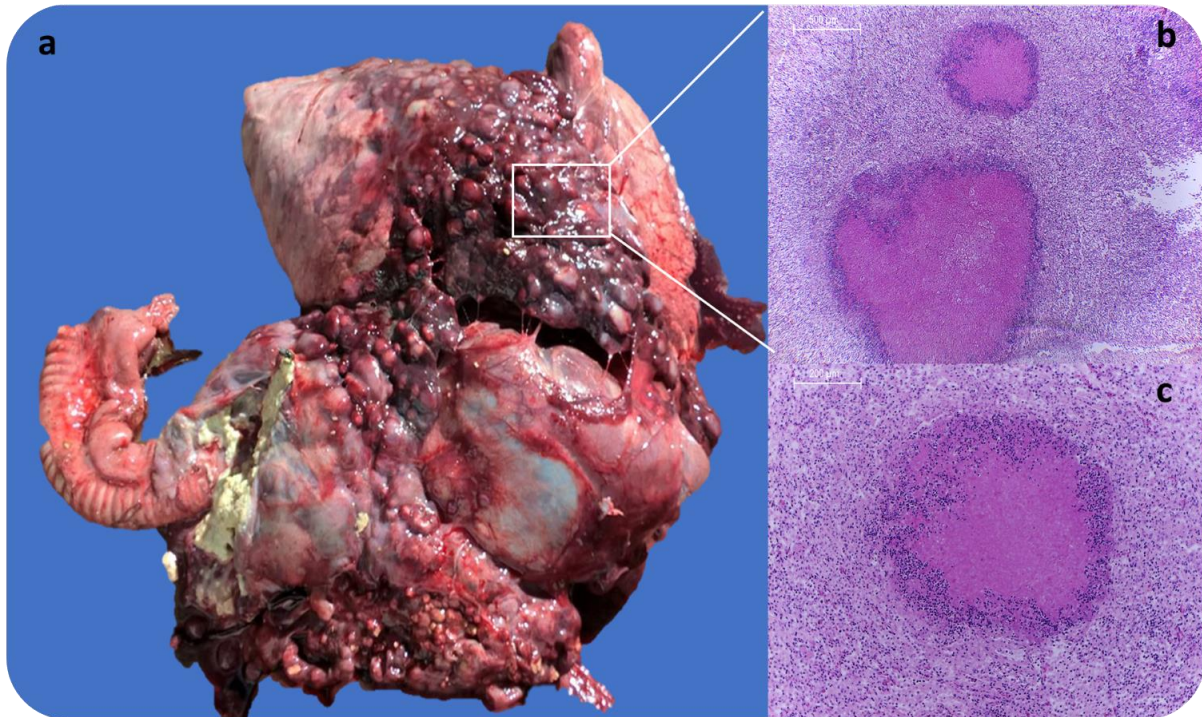


Figura 6: Bronconeumonía supurativa con abscesos multifocales en bovino de 3 años de edad. (a) Pulmones de bovino con neumonía abscedativa afectando la mayor parte del pulmón. **(b)** H&E, a 40x de tejido pulmonar donde se observa un absceso con abundante necrosis central rodeado de pirocitos asociado a *Mycoplasma spp* **(c)** H&E, 200X acercamiento de absceso asociado a *Mycoplasma spp*.

El **Cuadro 1**, muestra cuales fueron los órganos donde macroscópicamente se observaron lesiones sugestivas a tuberculosis de los 32 bovinos incluidos finalmente en este estudio, los cuales fueron confirmados mediante histopatología y PCR. Del total de los casos, el 53.2% (17/32) tuvo más de un año de edad al momento del sacrificio, el resto 46.8 % (15/32) menos de cuatro meses de edad, es importante destacar que en estos 15 animales se identificó un patrón de lesiones sugestivas a tuberculosis tanto macroscópicas como microscópicas “atípicas” a las encontradas en animales mayores.

En el 100 % (32/32) de animales incluidos en este estudio se observaron lesiones sugestivas a tuberculosis en los nódulos linfáticos mediastínicos, el 50 % (16/32) presentó además lesiones en los pulmones, es importante resaltar que, de los 15 bovinos menores de 4 meses, el 80 % (12/15) resultó con lesiones en los pulmones.

Cuadro 1. Datos de edad, género y tipo de órgano con lesiones sugestivas a tuberculosis en bovinos naturalmente infectados por *M. bovis*.

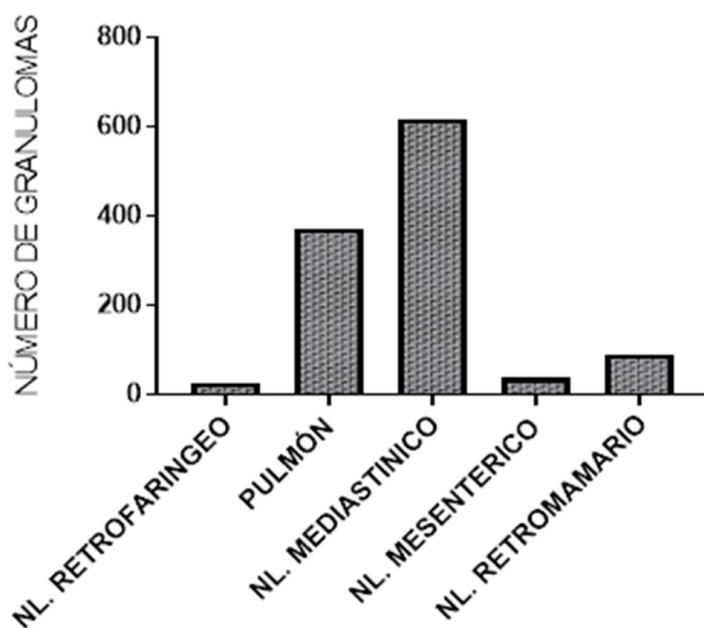
NÚMERO DE CASO	EDAD	GÉNERO	ÓRGANOS CON LESIONES SUGESTIVAS A TUBERCULOSIS.						
			PULMÓN	NL. RETROFARINGEOS	NL. MEDIASTINICOS	NL HEPÁTICOS	HÍGADO	NL. RETROMAMARIOS	NL. MESENTÉRICOS
1	4 AÑOS	H							
2	4 AÑOS	H							
3	2 AÑOS	H							
4	3 AÑOS	H							
5	3 AÑOS	H							
6	5 AÑOS	H							
7	5 AÑOS	H							
8	3 AÑOS	H							
9	6 AÑOS	H							
10	3 AÑOS	H							
11	2 AÑOS	H							
12	6 AÑOS	H							
13	4 AÑOS	H							
14	5 AÑOS	H							
15	3 AÑOS	H							
16	4 AÑOS	H							
17	5 AÑOS	H							
18	4 MESES	H							
19	4 MESES	H							
20	4 MESES	M							
21	4 MESES	H							
22	3 MESES	H							
23	8 DÍAS	H							
24	1 MES	H							
25	1.5 MESES	H							
26	3 MESES	H							
27	3 MESES	H							
28	2 MESES	H							
29	1 MES	H							
30	2.5 MESES	H							
31	1 MES	H							
32	3.5 MESES	H							

(H: Hembra, M: Macho, NL: Nódulo linfático; ■: Órgano con lesión sugestiva a tuberculosis)

7.2 Los nódulos linfáticos mediastínicos y el pulmón fueron los órganos con mayor número de lesiones en bovinos naturalmente infectados con *Mycobacterium bovis*.

De los órganos de los 32 animales con lesiones sugestivas a tuberculosis, se incluyeron 203 bloques de parafina, que representa un promedio de 6.3 bloques por caso. Histopatológicamente se identificaron 1143 lesiones sugestivas a tuberculosis. Los órganos con mayor número de lesiones microscópicas fueron los nódulos linfáticos mediastínicos con un 47.1% (539/1143); lo cual correlaciona con la mayor cantidad de lesiones encontradas en este tejido macroscópicamente. En los nódulos linfáticos mesentéricos, se observó el menor porcentaje de lesiones con 3.2% (37/1143), (**Figura 7**).

Figura 7: Total de granulomas microscópicos en tejidos de bovinos infectados naturalmente por *M. bovis*



Debido a las diferencias observadas en los hallazgos macroscópicos y microscópicos en los animales mayores de un año y menores de cuatro meses, se decidió analizar estos datos por separado.

7.3 Descripción macroscópica de las lesiones granulomatosas encontradas en bovinos naturalmente infectados con *Mycobacterium bovis*.

El grupo de animales mayores de un año comprendió 17 animales que presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis que fueron confirmadas por histopatología. Macroscópicamente se identificaron diferentes tipos de lesiones, asociadas a tuberculosis; en nódulos linfáticos mediastínicos algunos animales presentaron solo aumento de tamaño (**Figura 8**), otros mostraron pequeños focos de calcificación, y una necrosis con exudado caseoso abundante ocupando la mayor parte del tejido (**Figura 9**). En tejido pulmonar, se identificaron lesiones granulomatosas en la pleura y en el parénquima pulmonar (**Figura 10**). Desafortunadamente debido al gran tamaño de los pulmones de animales adultos fue difícil revisar adecuadamente todo el órgano, por lo que en unos animales donde se observaron lesiones en nódulos linfáticos mediastínicos y retrofaríngeos o en algún otro órgano macroscópicamente, no se identificaron lesiones en pulmón. Esto no descarta la posibilidad de existieran lesiones en alguna parte del tejido pulmonar que no fue inspeccionado.

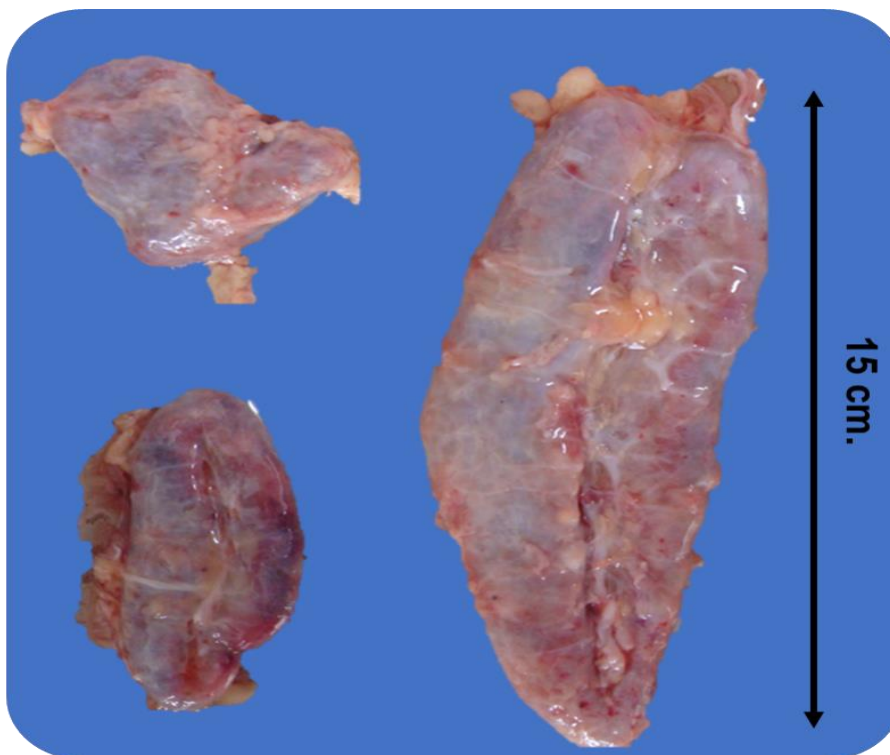


Figura 8: Nódulos linfáticos mediastínicos aumentados de tamaño que presentaron histopatología compatible a tuberculosis.

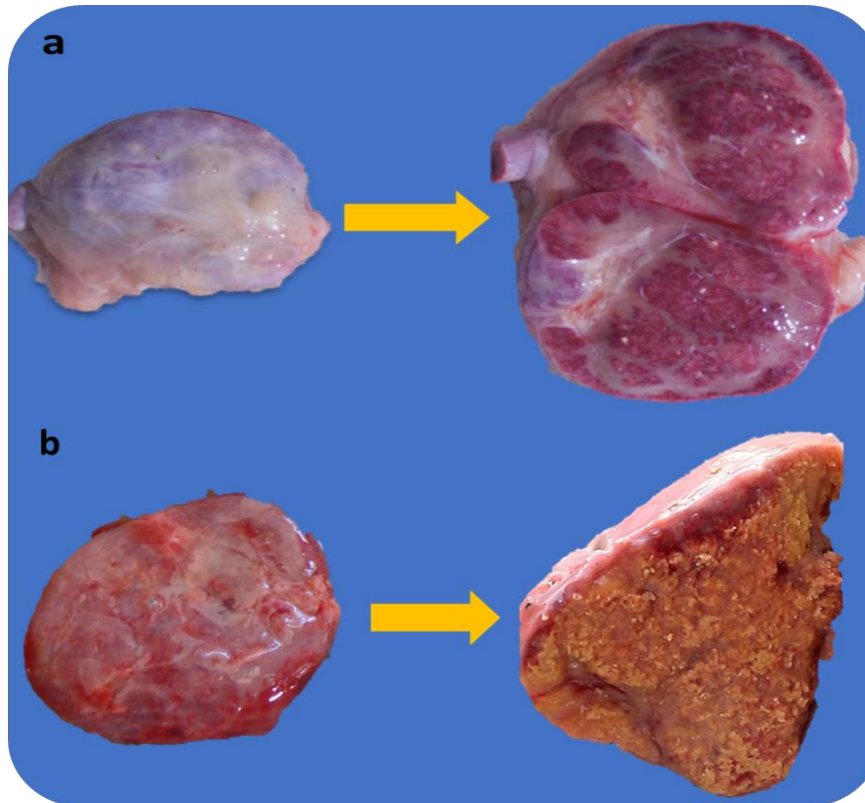


Figura 9: Corte sagital de nódulos linfáticos mediastínicos con linfadenitis granulomatosa. (a) Nódulo linfático de bovino con lesiones granulomatosas del tamaño de la cabeza de un alfiler (b) Nódulo linfático que al corte se observa necrosis caseosa grave que ocupa la mayor parte del tejido.

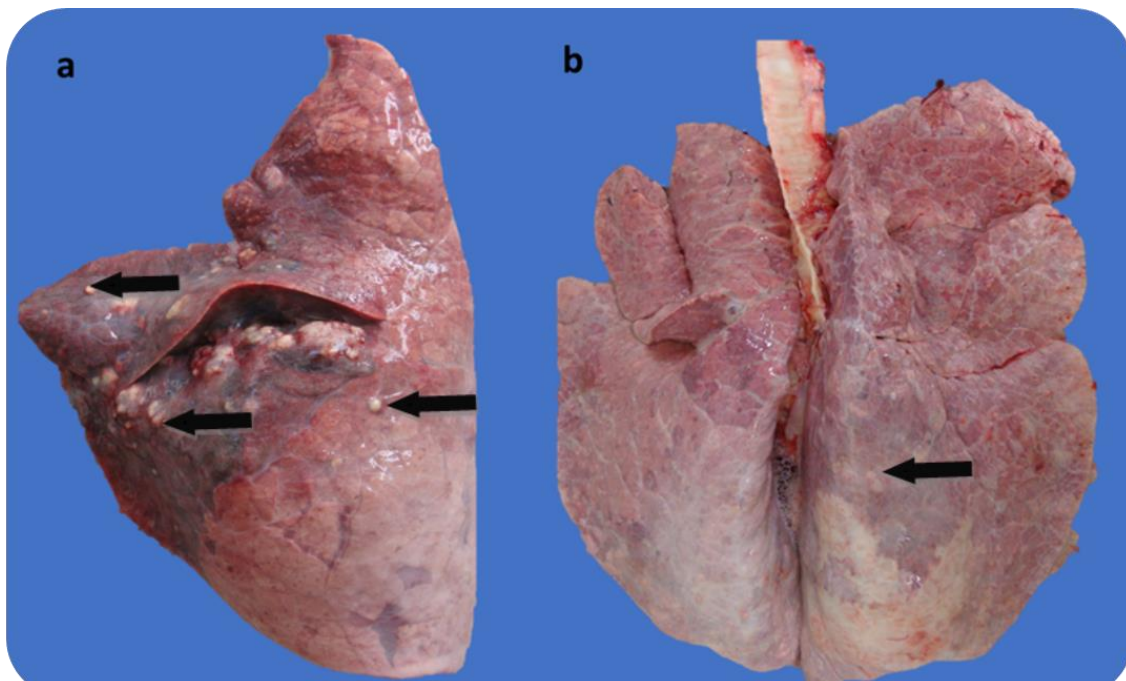


Figura 10: Pulmones de bovinos con lesiones sugestivas a tuberculosis. (a) Pulmón de bovino mostrando lóbulo caudal derecho congestionado con presencia de nódulos que se sienten consolidados a la palpación. **(b)** Pulmón de bovino con pequeñas lesiones en la pleura señaladas con una flecha, las cuales a la palpación se sienten firmes y al corte crepitan.

7.3.1 Lesiones microscópicas en bovinos mayores de un año infectados naturalmente con *Mycobacterium bovis*.

En el análisis histopatológico de bovinos mayores de un año, se encontraron 396 granulomas que fueron clasificados en cuatro estadios de acuerdo a Wangoo *et al.* (2005) (**Figura 11**). También se contabilizó el número de células gigantes, la cantidad de bacilos ácido alcohol resistente, así como la presencia de necrosis y capsula de tejido conectivo por granuloma.

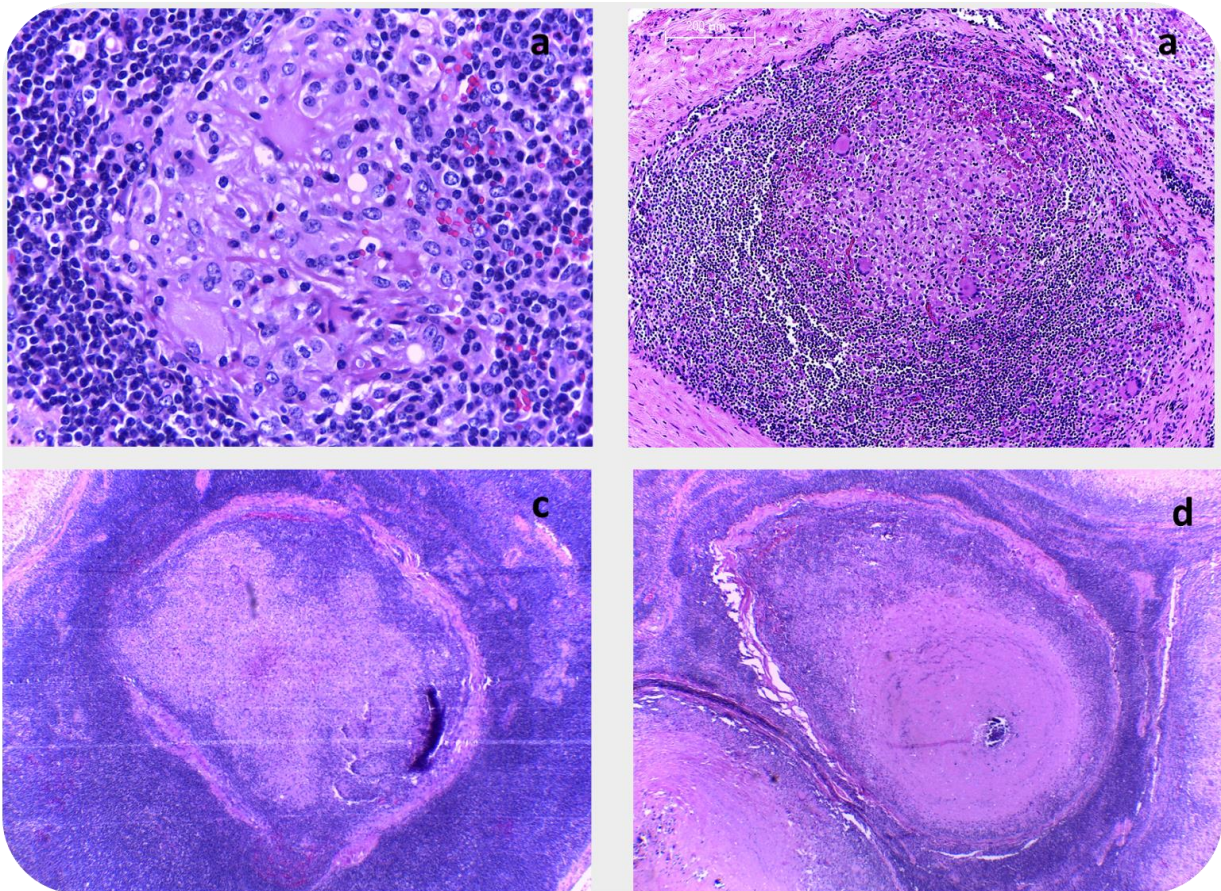
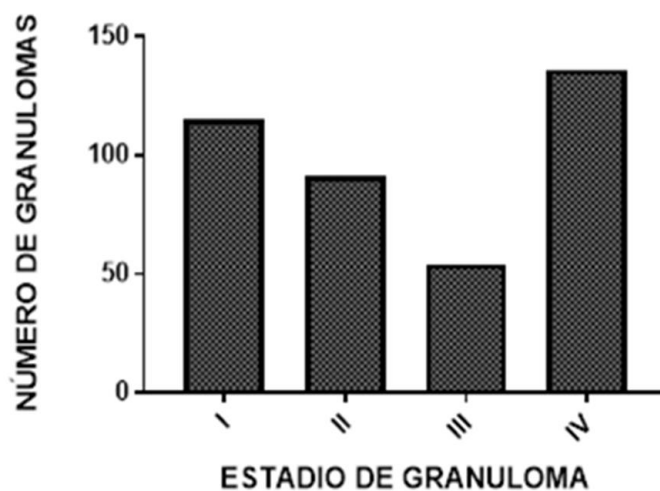


Figura 11: Clasificación histopatológica de granulomas en nódulos linfáticos de bovinos. H&E (a.-400x, b-d.-200x) **a)** Estadio I: pequeños focos de células inflamatorias infiltradas, principalmente macrófagos, macrófagos epitelioides y linfocitos intercalados. **b)** Estadio II: Estructura de mayor tamaño donde se encuentran macrófagos epitelioides, células de tipo Langhans multinucleadas, mayor cantidad de linfocitos y el inicio de necrosis caseosa en el centro de la lesión. **c)** Estadio III: lesión bien organizada característica del granuloma el cual está completamente encapsulado con una delgada capa de tejido conectivo, la necrosis caseosa es evidente, pero la mineralización es mínima. **d)** Estadio IV: Se observa mineralización y abundante necrosis, rodeada por numerosos linfocitos, macrófagos epitelioides, células gigantes y una cápsula gruesa de tejido conjuntivo.

De los 396 granulomas el 34.3% (136/396) fueron considerados estadios IV siendo los más frecuentes (**Figura 12**), los cuales presentan calcificación y tejido conectivo denso que rodea la lesión, que se demostró con la tinción de Von kossa y tricromica de Masson, respectivamente (**Figuras 13 y 14**). El 29.0% (115/396) fueron estadios I los cuales se observaron principalmente como satélites de los estadios más avanzados como el III y IV (**Figura 15**). El estadio III fue el que con menor frecuencia se observó, 13.6% (54/396). También se identificó que existe una dependencia positiva entre el estadio de granuloma y la cantidad de células gigantes con un valor de $P=0.0001$ y una significancia estadística de $\alpha=0.05$, lo que se refuerza con una concordancia del 74% obtenido en prueba de Rho de Spearman. El mayor número de células gigantes se obtuvo en el estadio tipo IV con 32.9 células en promedio por lesión (**Figura 16 y Figura 17**).

Mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos, se marcó la proteína CD20 que se encuentra en los linfocitos B, con lo que se observó la presencia de agregados celulares en la periferia de granulomas estadio III y IV los cuales mostraron mayor cantidad de células gigantes en comparación con estadios I y II. (**Figura 18**).

Figura 12: Total de granulomas identificados y clasificados en cuatro estadios en animales mayores a un año de edad infectados naturalmente por *M. bovis*



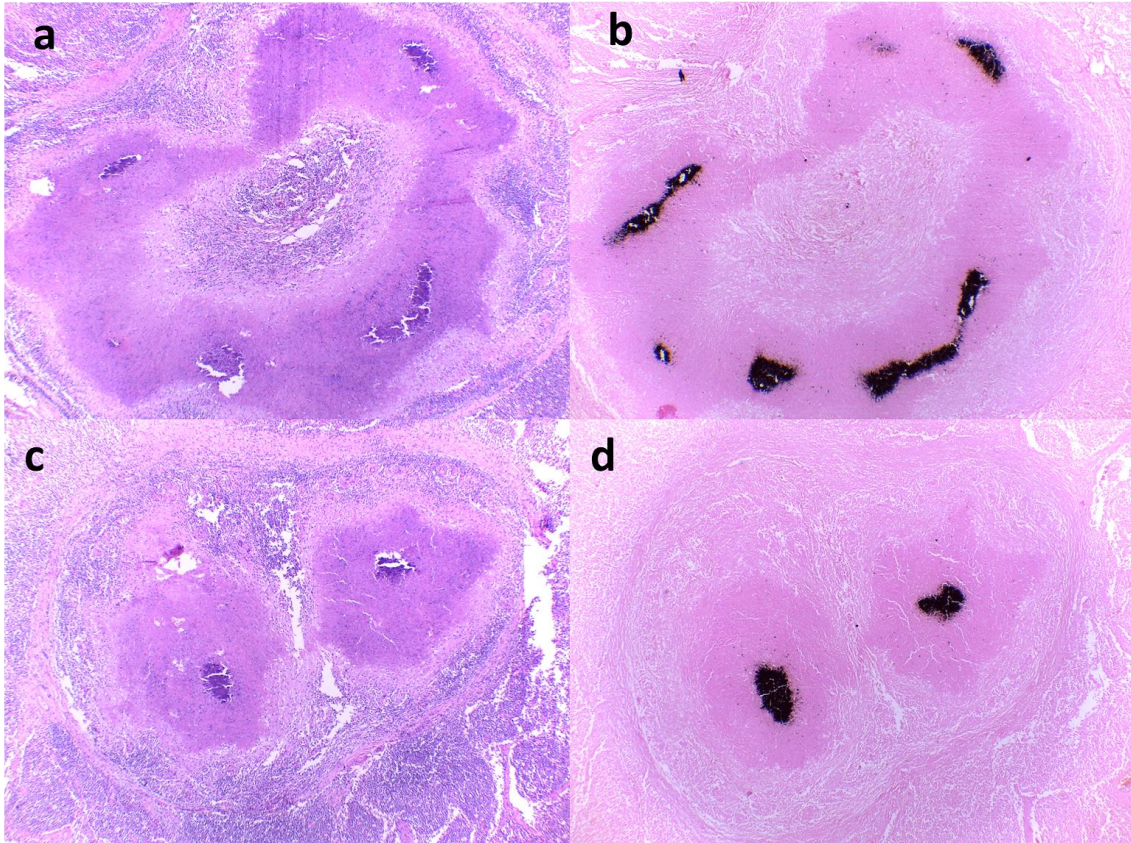


Figura 13: Precipitado de calcio en granulomas estadio IV de bovino infectado naturalmente por *M. bovis*. H&E a 40x (a, c) granulomas estadio IV en nódulos linfáticos de bovino. (b, d) Tinción de Von Kossa que permite observar el precipitado de calcio de color negro al centro de las lesiones.

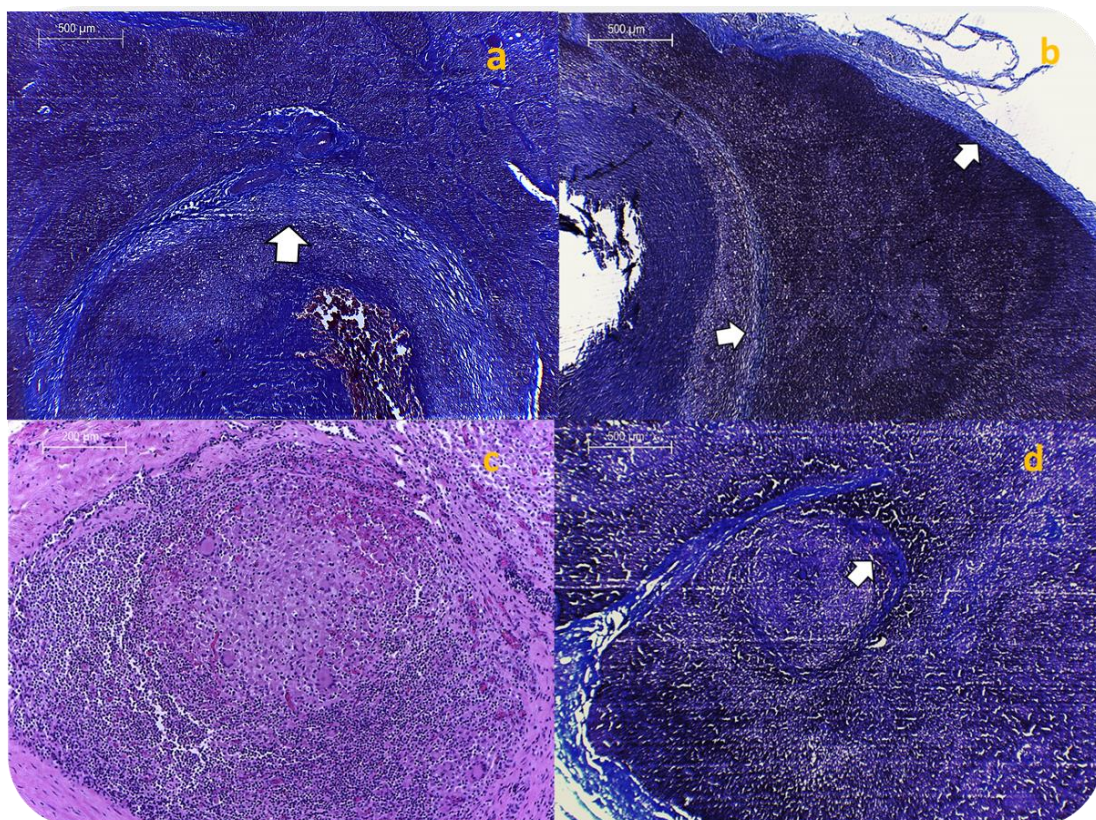


Figura 14: Presencia de tejido conectivo en granulomas estadio IV de bovinos infectados naturalmente por *M. bovis*. (a-b) Tricromica de Masson 40x Granulomas estadio IV donde se observa la presencia de tejido conectivo señalado con flechas blancas. (c) H&E 200x Granuloma estadio II (d) Tricrómica de Masson 200x de granuloma estadio II que muestra una cápsula delgada de tejido conectivo.

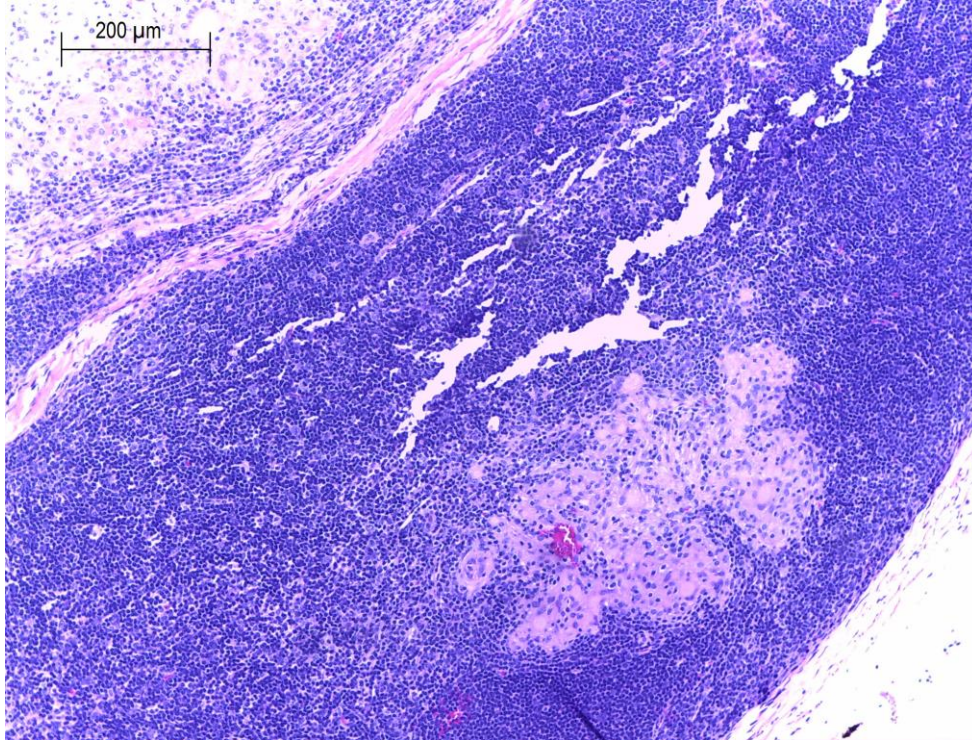


Figura 15: Tinción de H&E (40x) con granulomas estadio tipo I satélite de un granuloma estadio IV.

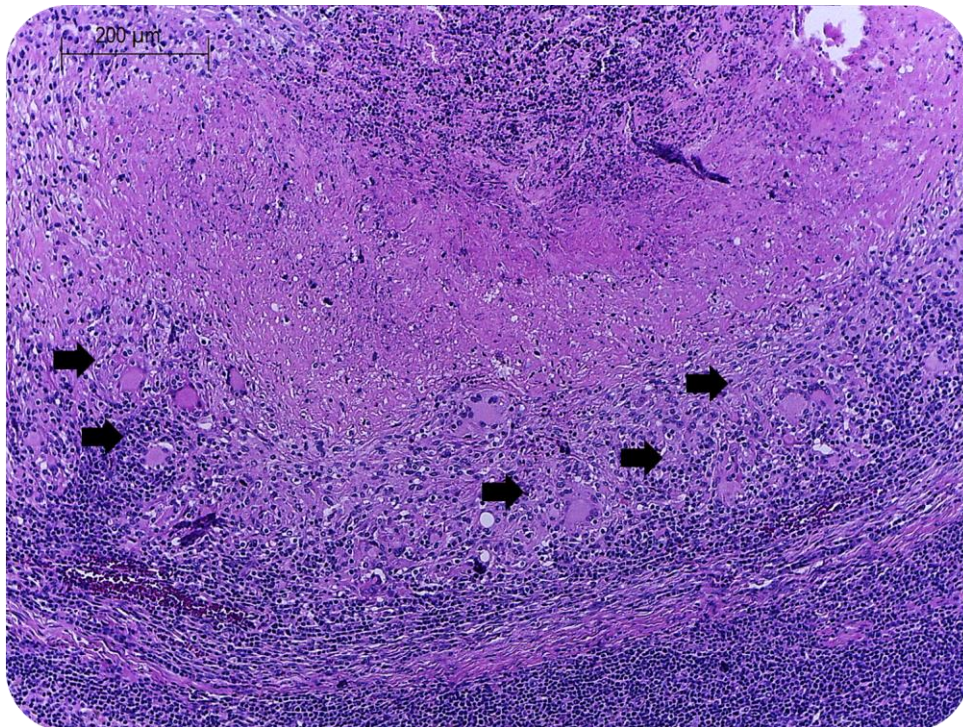


Figura 16: Tinción de H&E, 40x. Granulomas estadio tipo IV, las flechas señalan la presencia de células gigantes en la periferia de la lesión.

Figura 17; Promedio de células gigantes en los cuatro estadios de granuloma en bovinos mayores de un año de edad.

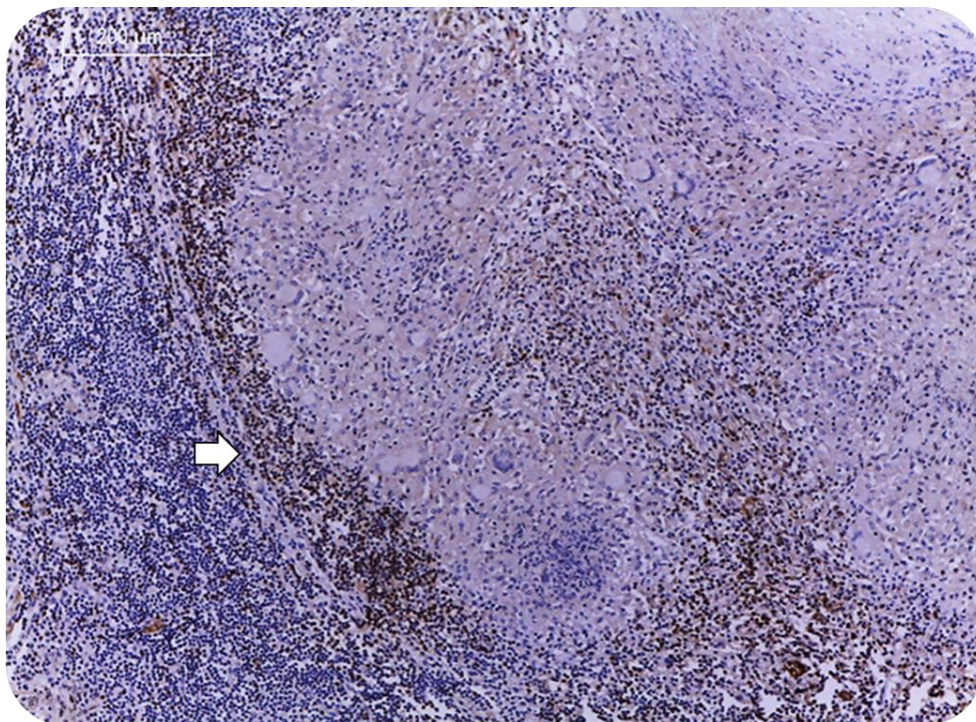
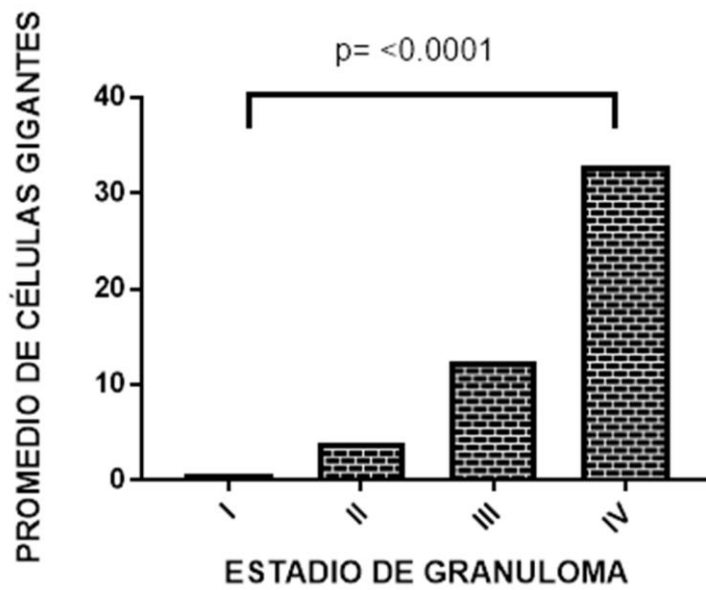


Figura 18: Acumulo de linfocitos B en un granuloma de bovino infectado naturalmente por *M. bovis*. 40x. Inmunohistoquímica anti-CD20 que muestra acúmulos de linfocitos B señalados con una flecha en la periferia de un granuloma estadio III de nódulo linfático de bovino.

Se ha observado la presencia de neutrófilos en granulomas de bovinos localizados en el pulmón. Sin embargo, estas células son escasas en granulomas que afectan los nódulos linfáticos, interesantemente en el presente estudio se observó la presencia de neutrófilos en el centro de las lesiones en el cerebro de un bovino asociadas con una gran cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes. **(Figura 18)**.

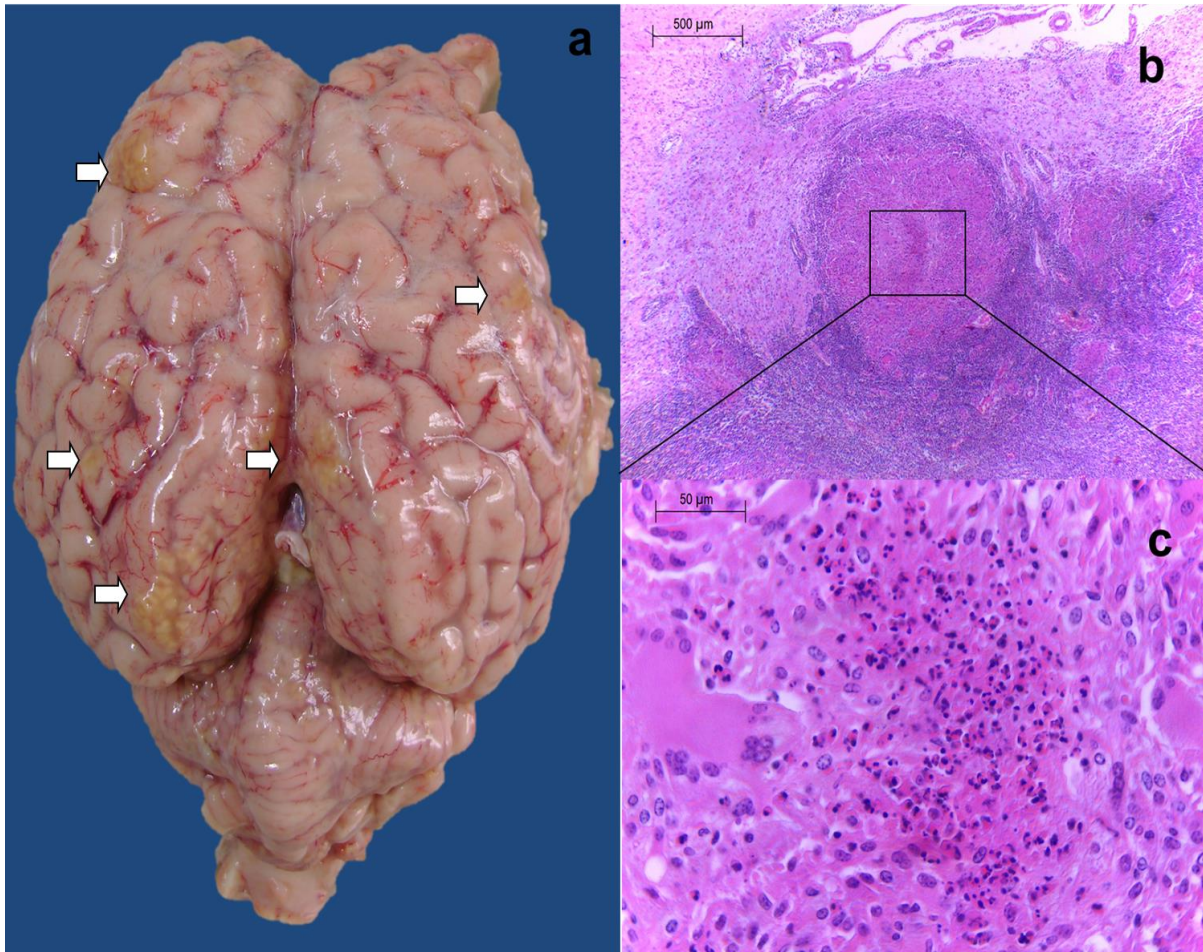


Figura 19: Meningitis granulomatosa en un bovino de 3 años de edad: (a) Encéfalo de bovino, las flechas señalan áreas amarillas multifocales que corresponden a meningitis granulomatosa **(b)** H&E, 40x. Muestra un granuloma en tejido nervioso causado por *M. bovis* **(c)** H&E, 400x. Aumento de la lesión en (b) mostrando una gran cantidad de neutrófilos al centro del granuloma.

7.3.2 Lesiones en bovinos menores de cuatro meses de edad infectados naturalmente con *Mycobacterium bovis* (formación atípica de granulomas).

Como se mencionó anteriormente se estudiaron 15 animales menores de cuatro meses de edad que presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis, las cuales se confirmaron mediante histopatología, tinción de Zhiel Neelsen y PCR. Macroscópicamente este grupo de animales presentó un gran aumento en tamaño de los nódulos linfáticos aproximadamente de 5 a 10 veces respecto al tamaño normal, (**Figura 20**) que al corte presentaron extensas áreas de necrosis caseosa blanca mal delimitadas, ocupando la mayor parte del parénquima del órgano como se muestra en las **Figuras 21 y 22**. El pulmón con lesiones se encontró firme al tacto, al corte de los lóbulos pulmonares se observaron múltiples zonas de necrosis caseosa, blancas, mal delimitadas y no encapsuladas, algunas de las cuales coalescen (**Figura 23**).

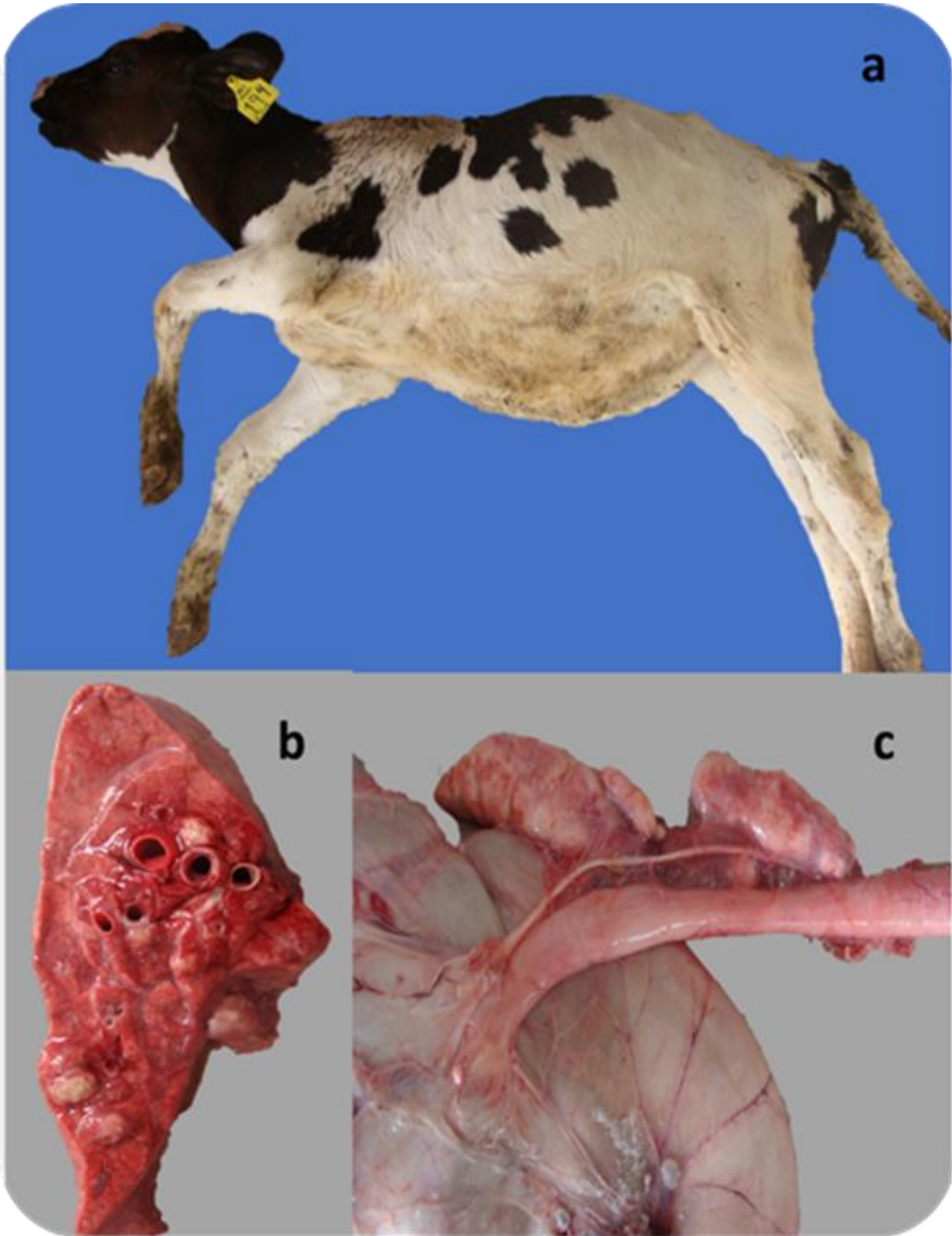


Figura 20: bovino de 3 meses de edad que falleció de timpanismo gaseoso, debido a la compresión del nervio vago, por linfadenitis granulomatosa en nódulos linfáticos mediastínicos debido a la infección por *M. bovis*. (a) bovino de 3 meses de edad con timpanismo gaseoso. (b) sección de pulmón con lesiones granulomatosas sin bordes definidos. (c) Linfadenitis granulomatosa grave de nódulos linfáticos mediastínicos que comprimen el nervio vago debido al gran aumento de tamaño.

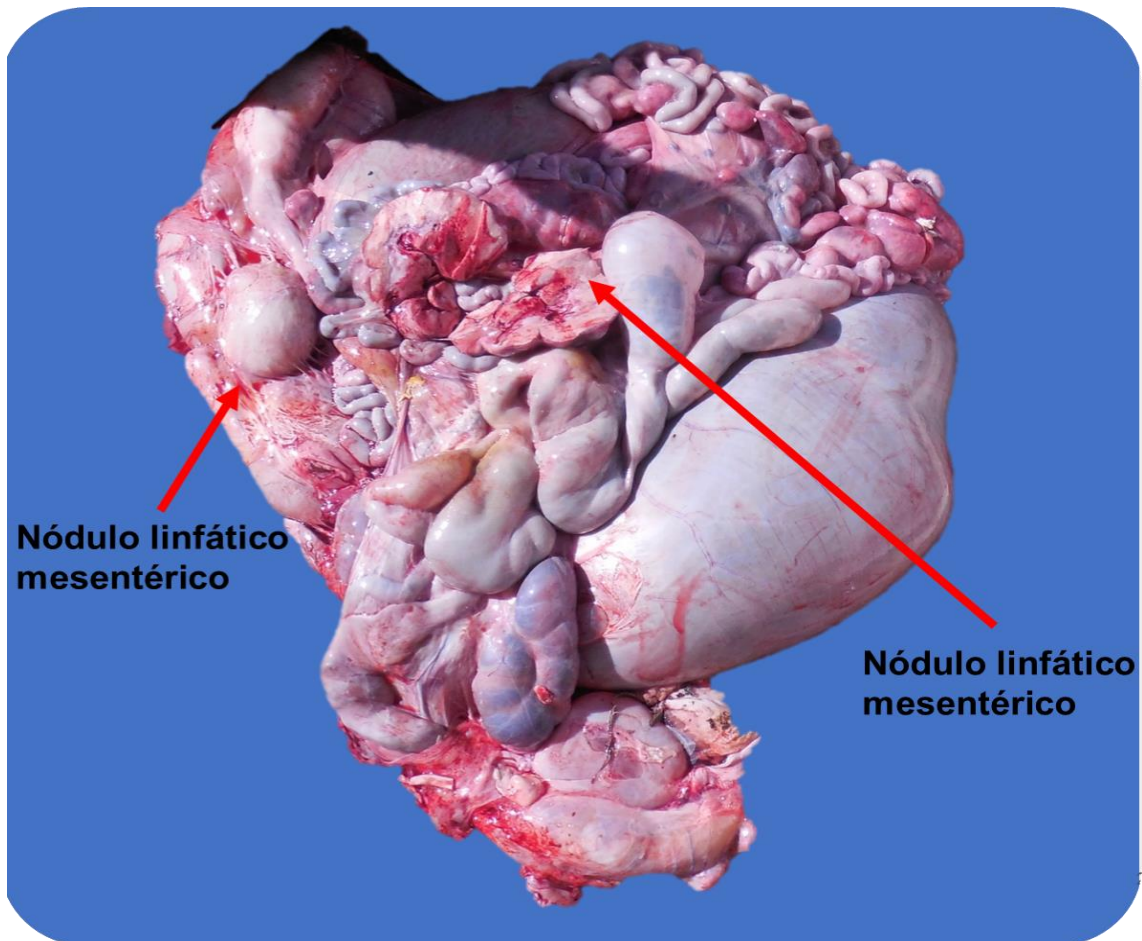


Figura 21: Linfadenitis granulomatosa en nódulos linfáticos mesentéricos de un bovino de 2 meses de edad. Nódulos linfáticos mesentéricos de 5-10 veces aumentados de tamaño, que al corte presenta extensas áreas blancas de necrosis mal definidas ocupando la mayor parte del parénquima.

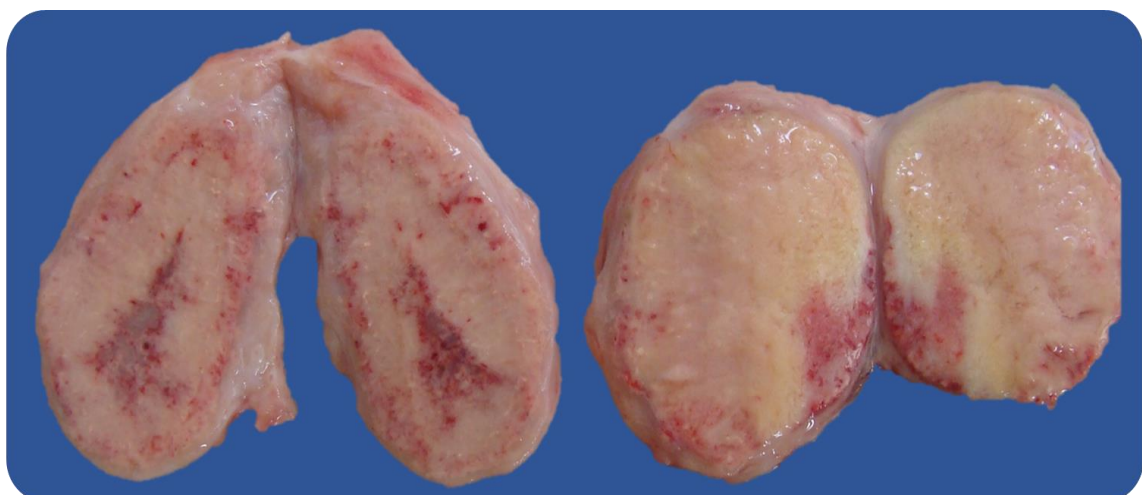


Figura 22: Linfadenitis granulomatosa en bovino de 1 mes de edad. Nódulos linfáticos que al corte presenta extensas áreas de necrosis caseosa con petequias.

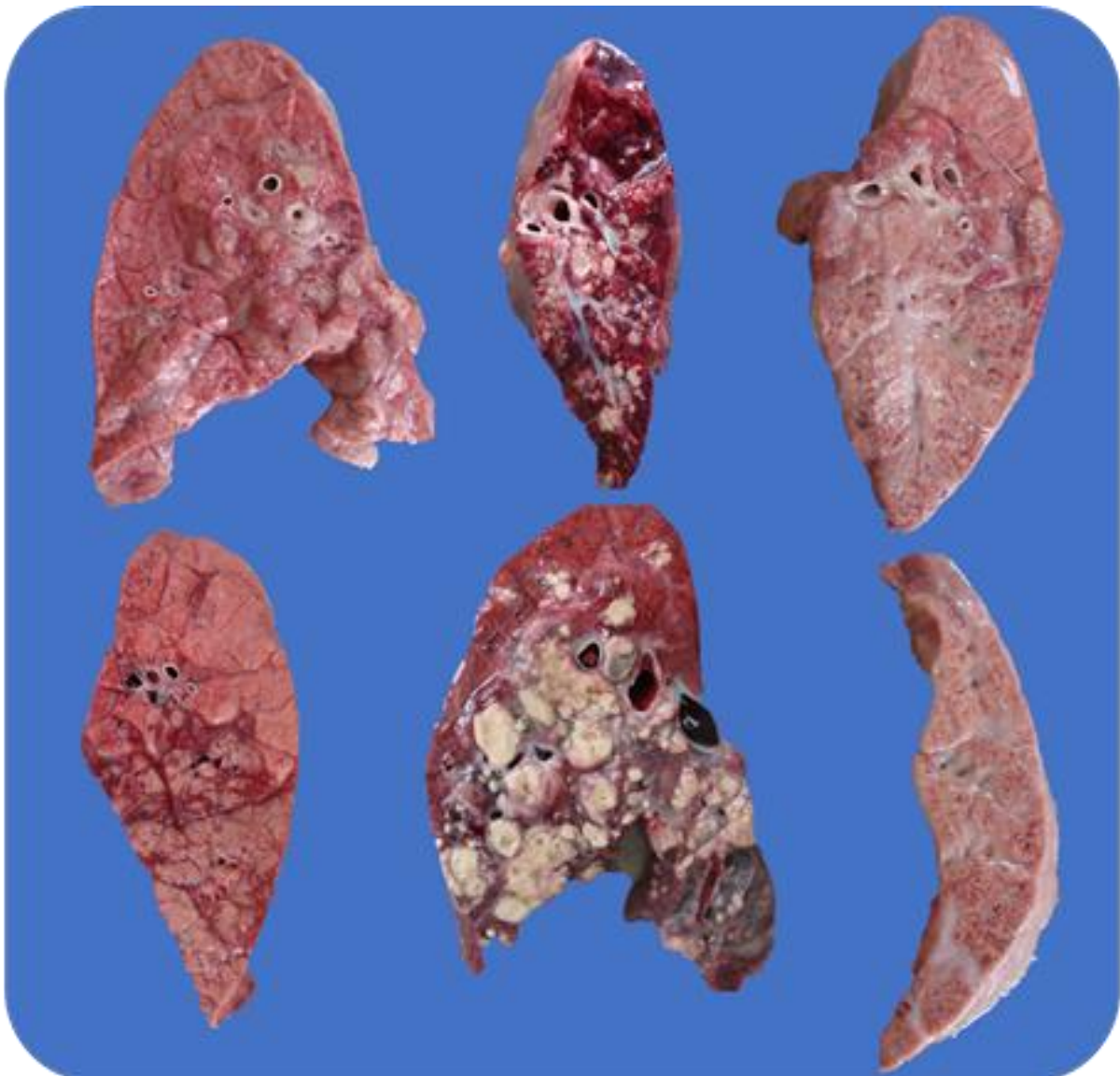


Figura 23: Neumonía granulomatosa en bovinos menores de 3 meses de edad. Cortes transversos de lóbulos pulmonares que muestran extensas zonas blancas sin bordes delimitados, algunos coalescen.

Microscópicamente se identificaron 747 lesiones sugestivas a tuberculosis, las cuales el 49.6% (371/747) fueron de tejido pulmonar, el menor número de lesiones se observó en los nódulos linfáticos mesentéricos con un 4.9% (37/747) (**Figura 24**).

Figura 24: Distribución de lesiones en bovinos menores de cuatro meses, con lesiones sugestivas a tuberculosis.

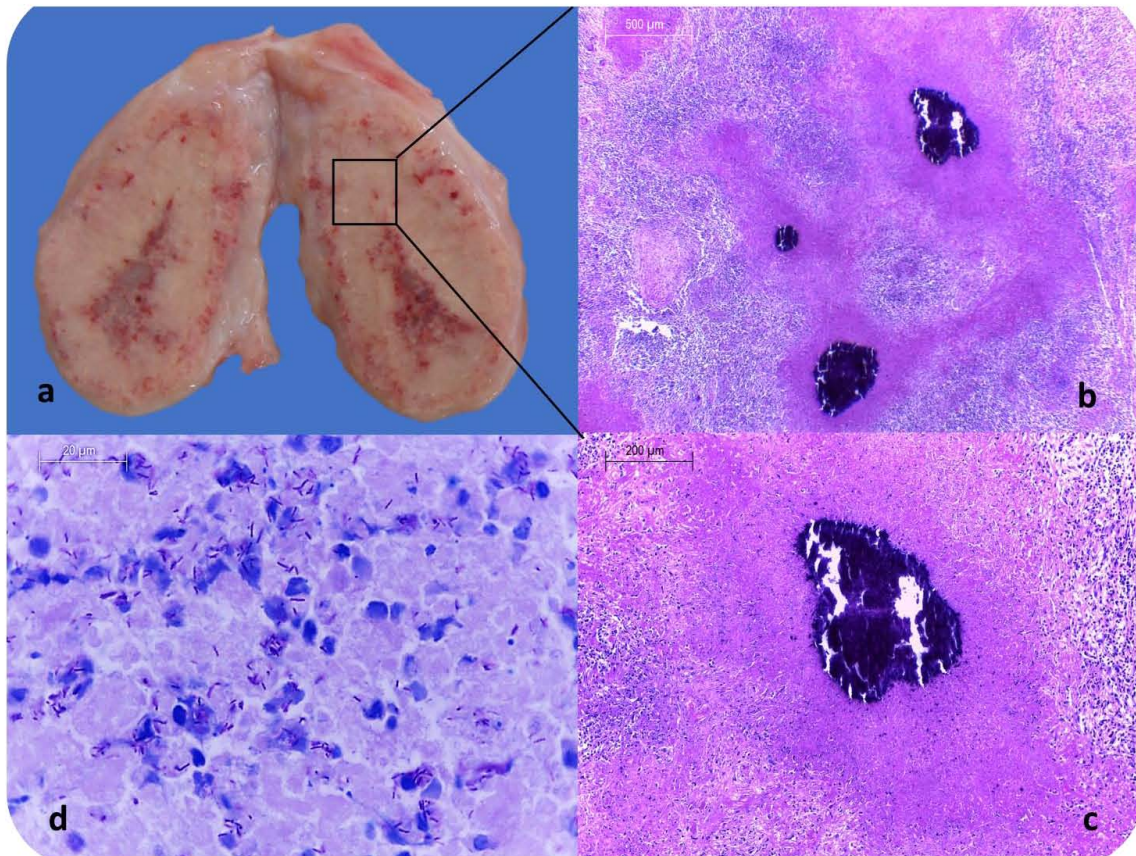
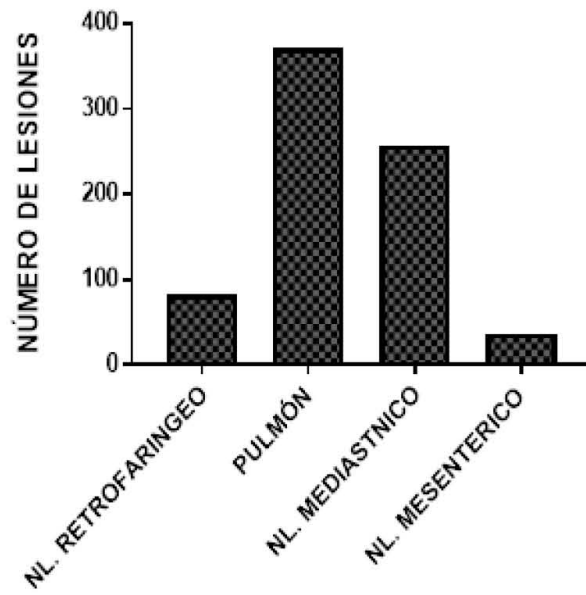


Figura 25: Linfadenitis granulomatosa en bovinos menores de cuatro meses de edad. Se observan lesiones atípicas macro y microscópicas, así como una gran cantidad de BAARs extracelulares. (a) Nódulos linfáticos que al corte presenta extensas áreas de necrosis caseosa con petequias. (b) H&E, 40x de nódulo linfático que muestra extensas áreas de necrosis sin bordes definidos con calcificación, (c) [Aumento de sección c, H&E, 200x (d) Nódulo linfático con abundantes bacilos ácido alcohol resistente extracelulares, Zielh Neelsen, 1000x.

Debido a que las lesiones microscópicas encontradas en este grupo de animales menores de cuatro meses de edad no cumplieron totalmente con las características que propone Wangoo *et al* (2005), **(Figura 25)** con el objetivo de realizar un mejor análisis de las lesiones, se decidió proponer una nueva clasificación con base en lo propuesto en los animales adultos. Las lesiones se clasificaron en cuatro estadios **(Figura 26)**.

Estadio I: Acumulo de macrófagos epiteliales sin encapsular, que al centro presenta necrosis y detritos celulares, los cuales pueden presentar neutrófilos o no.

Estadio II: Presencia de un mayor número de macrófagos epiteliales, con un infiltrado de linfocitos, algunas veces se observan células gigantes, además de una mayor cantidad de detritos celulares y necrosis.

Estadio II-III: Se observan grandes áreas de necrosis y detritos celulares, que no presentan bordes delimitados, no presentan cápsula de tejido conectivo ni acumulo de linfocitos en la periferia, solo están rodeadas por macrófagos y algunas pueden o no tener células gigantes multinucleadas.

Estadio III-IV: lesiones que muestran extensas áreas de necrosis, mineralización y detritos celulares sin bordes definidos, rodeados principalmente por macrófagos, pero sin cápsula de tejido conectivo ni linfocitos en la periferia, estas lesiones tienden a verse fusionadas con otras.

De acuerdo a esta clasificación propuesta, las 747 lesiones identificadas se organizaron de acuerdo a los diferentes estadios, obteniendo con mayor frecuencia de estadios I con un 47.2% (353/747), la menor proporción fue de estadio tipo III-IV con solo un 9.3% (70/747), **(Figura 28)**.

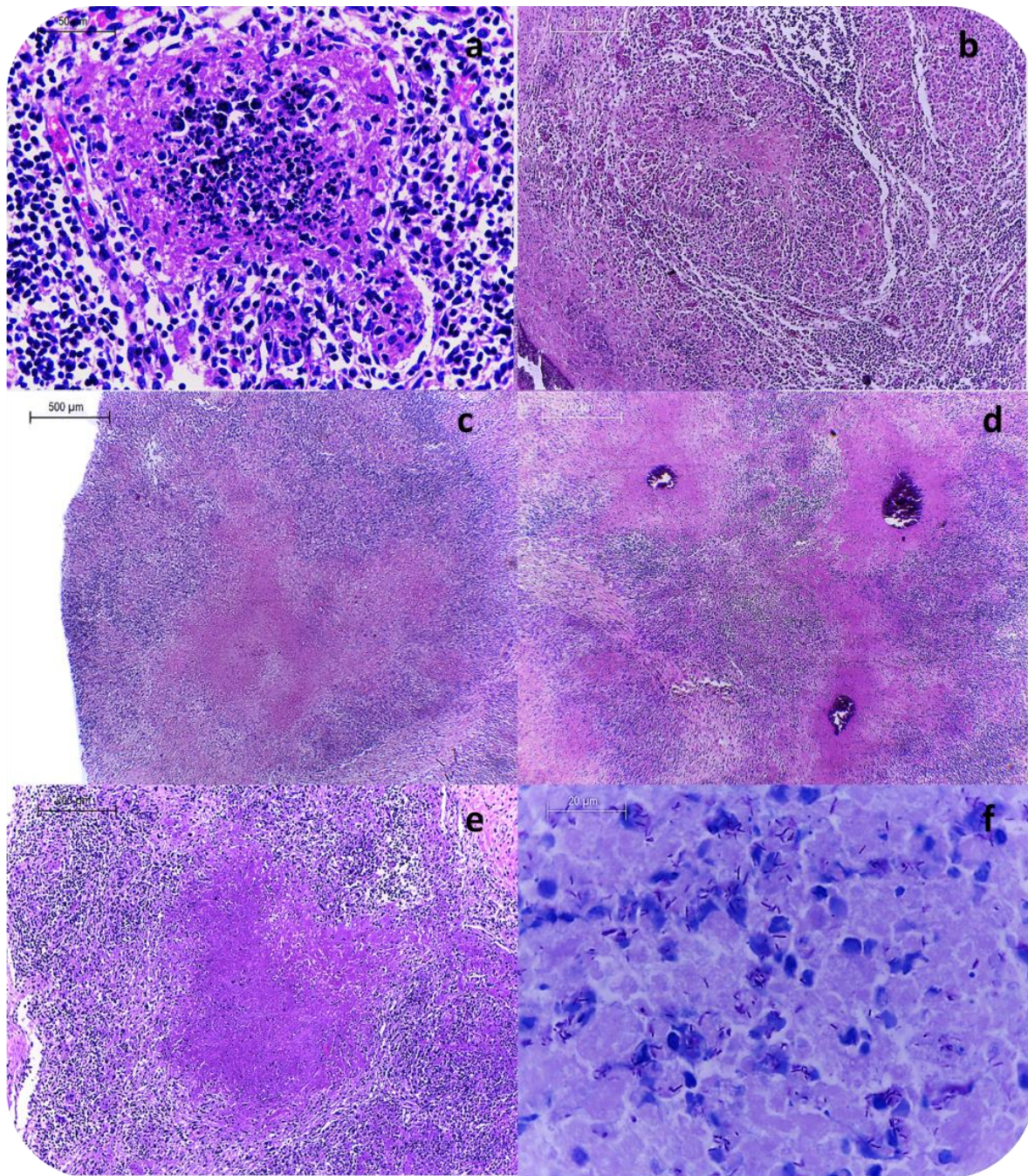


Figura 26: Clasificación histopatológica de granulomas en nódulos linfáticos de bovinos menores de cuatro meses de edad. H&E (a.- 400x, b.-200x, c.-d40x f.-1000x), a) Estadio I: pequeños focos difusos de células inflamatorias infiltradas, principalmente macrófagos, macrófagos epitelioides y abundantes detritos celulares al centro de la lesión. **b) Estadio II:** Estructura de mayor tamaño donde se encuentran macrófagos epitelioides, células a veces se observan células gigantes multinucleadas, mayor cantidad de detritos celulares y necrosis. **d) Estadio II-III,** grandes áreas de necrosis, que no presentan bordes delimitados, no presentan capsula de tejido conectivo ni acumulo de linfocitos en la periferia. **e) Estadio III-IV:** lesiones que muestran extensas áreas de necrosis, mineralización y detritos celulares sin bordes definidos, rodeados principalmente por macrófagos, pero sin cápsula de tejido conectivo ni linfocitos en la periferia, estas lesiones tienden fusionarse con otras e) acercamiento de un estadio II-III **f) Ziehl Neelsen 1000x** con abundantes bacilos BAARs extracelulares provenientes de un estadio II-III.

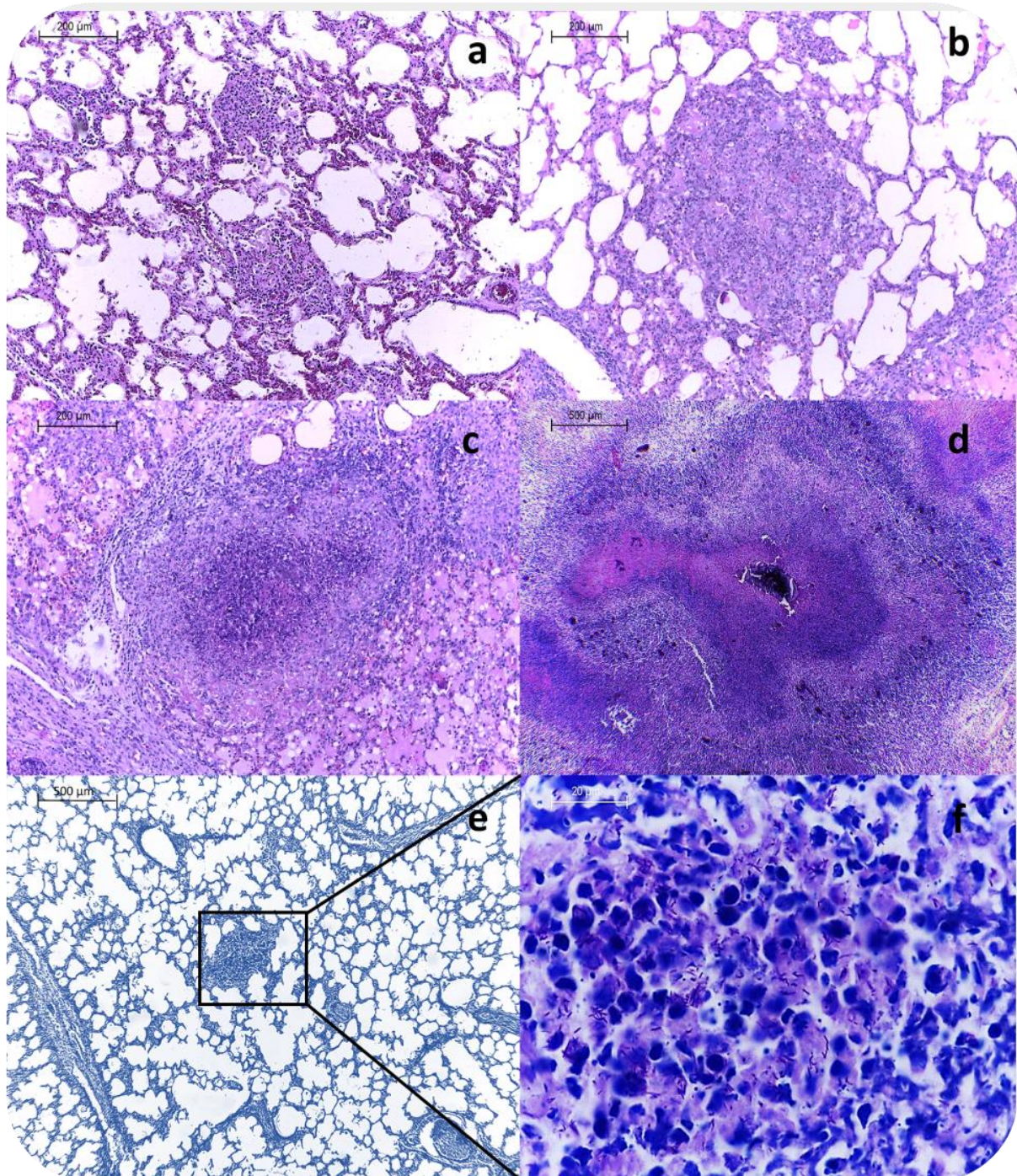
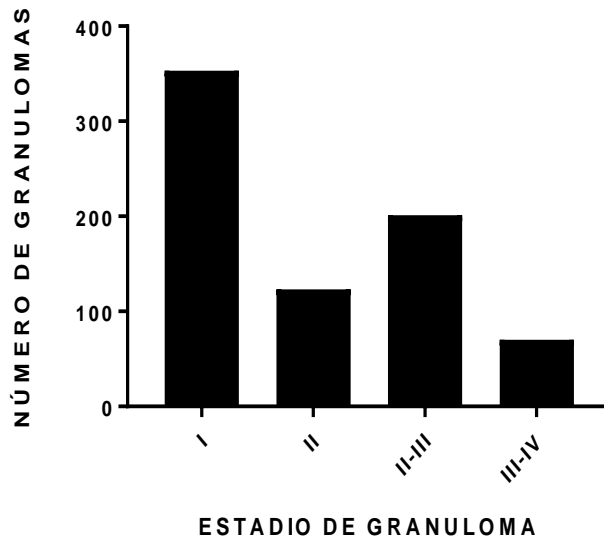


Figura 27: Clasificación histopatológica de granulomas en tejido pulmonar de bovinos menores de cuatro meses de edad. H&E (a.-c 200x, d-e 40x f.-1000x), **(a) Estadio I:** pequeños focos difusos en los alveolos de células inflamatorias infiltradas, principalmente macrófagos, macrófagos epitelioides y abundantes detritos celulares al centro de la lesión. **(b) Estadio II:** Estructura de mayor tamaño donde se encuentran macrófagos epitelioides, en algunos casos, células gigantes multinucleadas, mayor cantidad de detritos celulares y necrosis. **(d) Estadio II-III,** grandes áreas de necrosis, que no presentan bordes delimitados, no presentan cápsula de tejido conectivo ni acumulo de linfocitos en la periferia. **(e) Estadio III-IV:** lesiones que muestran extensas áreas de necrosis, mineralización y detritos celulares sin bordes definidos, rodeados principalmente por macrófagos, pero sin cápsula de tejido conectivo ni linfocitos en la periferia, estas lesiones tienden a fusionarse con otras **(e) Estadio I** **(f) Zielh Neelsen 1000x** con abundantes bacilos BAARs extracelulares del estadio I del inciso e.

Figura 28: Total de granulomas identificados y clasificados en animales menores de cuatro meses de edad infectados naturalmente por *M. bovis*



7.3.3 El precipitado de calcio en lesiones granulomatosas causadas por *Mycobacterium bovis* es independiente de la presencia de capsula de tejido conectivo

Para obtener una mejor caracterización de las lesiones encontradas en bovinos menores de cuatro meses de edad, se realizó la tinción de tricrómica de Masson con el objetivo de identificar tejido conectivo en las lesiones, interesante fue observar que en ninguna de los diferentes estadios se observó tejido conectivo que rodeara la lesión. Sin embargo, algunas lesiones mostraron tinción positiva a fibras de tejido conectivo dentro de la lesión las cuales se ven desorganizadas tanto en nódulos linfáticos como en pulmón (**Figura 29**).

Se realizó la tinción de Von kossa en busca de calcificación lo cual permite comprobar la presencia de calcio en lesiones consideradas estadio III-IV, donde se observó abundante marcaje positivo al centro de la necrosis indicando la presencia de precipitados de calcio que ocupan la mayor parte de la lesión (**Figura 30**), En este estudio se identificaron 70 lesiones que presentaron calcificación sin la presencia de cápsula de tejido conectivo rodeando esta.

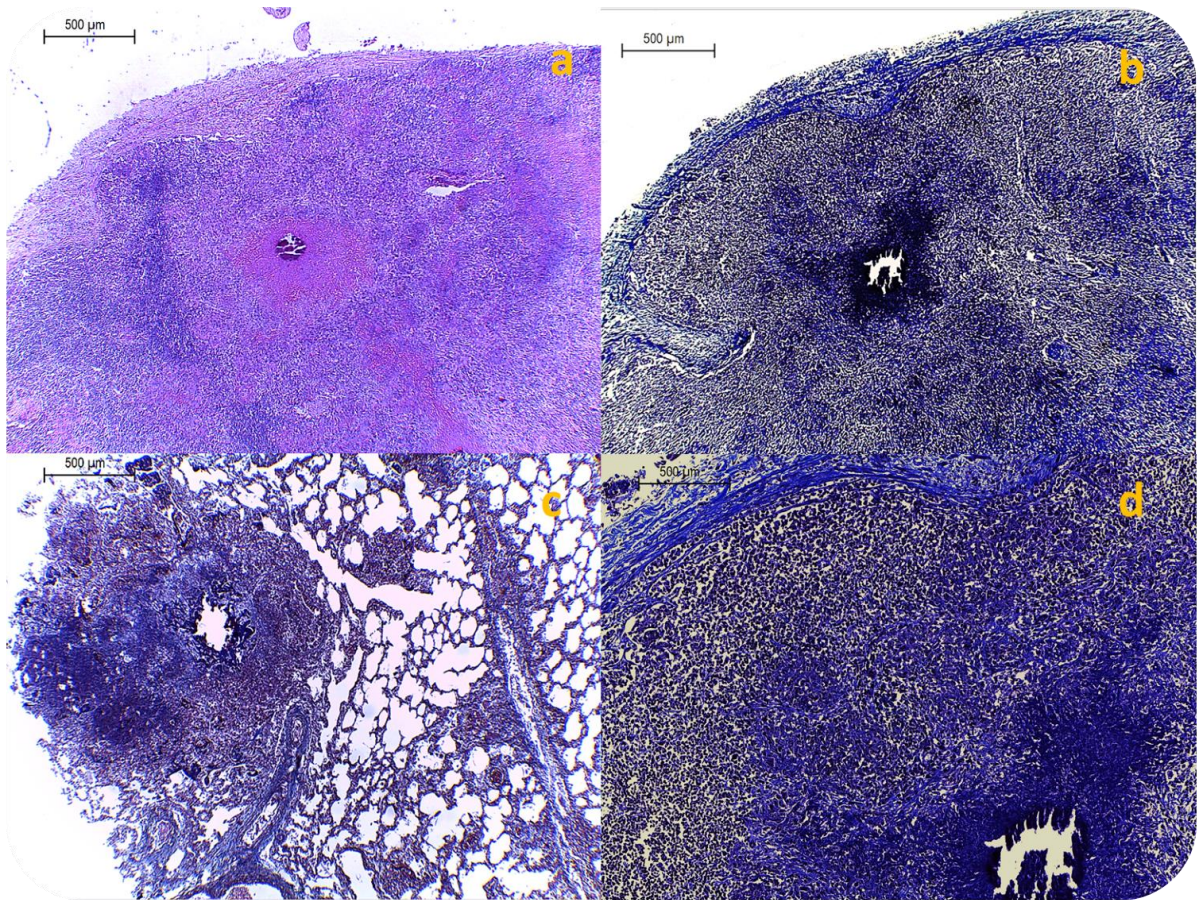


Figura 29: Lesiones granulomatosas estadio III-IV en nódulos linfáticos y pulmón en bovinos menores de cuatro meses, carecen de capsula de tejido conectivo. (a) H&E, 40x nódulo linfático de bovino con estadio III-IV (b) Tricrómica de Masson, 40x estadio III-IV con clasificación y sin capsula de tejido conectivo (d) Acercamiento del inciso b (200x), se observa marcaje de fibras de colágeno sin organización, al centro calcificación (c) Tricrómica de Masson, 40x estadio III-IV con clasificación y sin cápsula de tejido conectivo en tejido pulmonar de bovino.

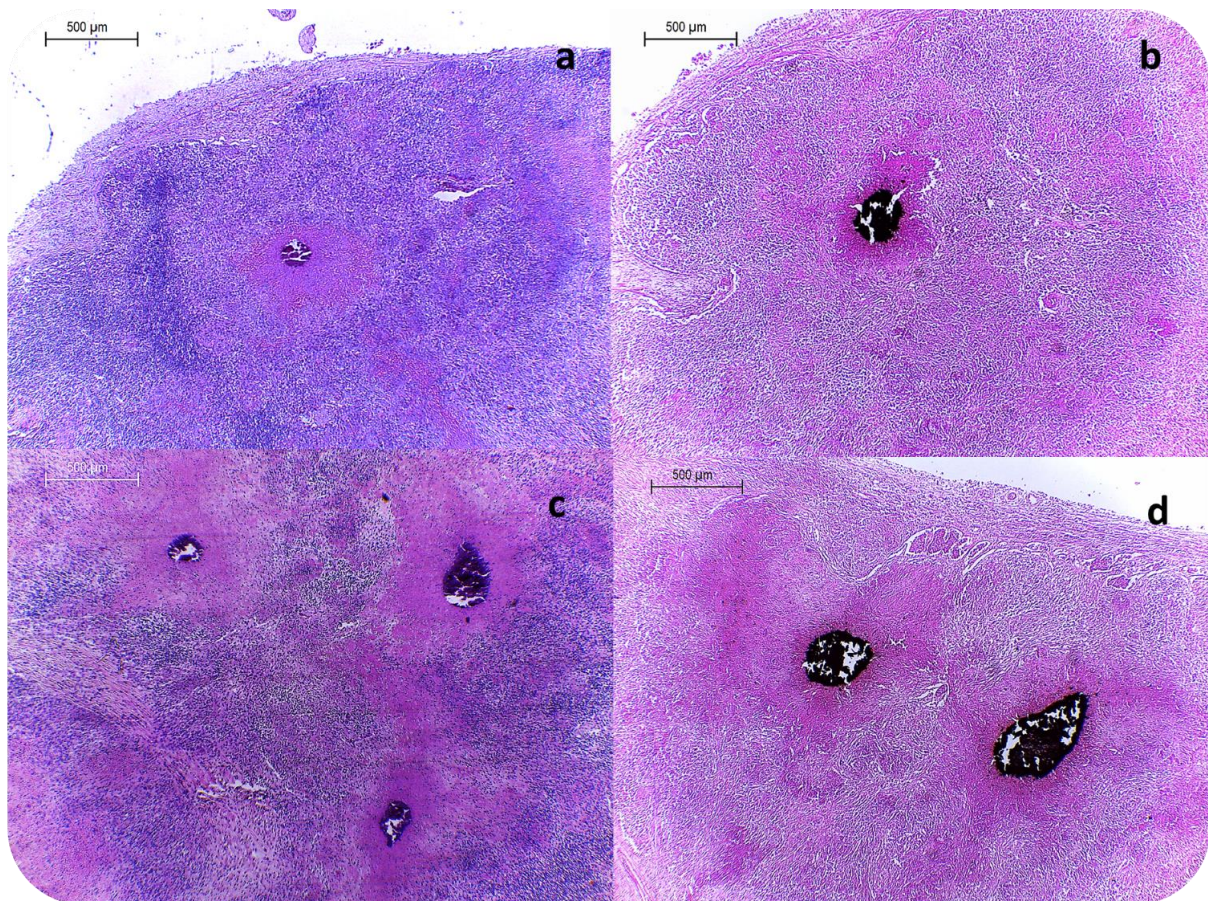


Figura 30: Lesiones granulomatosas estadio III-IV en nódulos linfáticos de bovinos menores de cuatro meses, con presencia de precipitado de calcio el cual se observa de color negro en la imagen (b y f), identificado mediante la tinción de Von Kossa.

7.3.4 Bovinos menores de cuatro meses presentan una mayor cantidad de lesiones granulomatosas y bacilos comparado con animales mayores de un año infectados naturalmente por *Mycobacterium bovis*.

Realizando una comparación de la cantidad de lesiones granulomatosas identificadas en ambos grupos, se observó una mayor cantidad en bovinos menores de cuatro meses, en promedio 62.25 lesiones por caso, comparado con 24.75 en promedio de lesiones en bovinos mayores de un año (**Figura 31**). También se identificó un mayor número de bacilos ácido alcohol resistentes por lesión, en animales menores de cuatro meses en una proporción de 55.28 % lesiones con más de 50 bacilos en comparación con un 34.09% en animales mayores de un año infectados naturalmente por *M. bovis* respectivamente; por otra parte, los animales adultos tuvieron mayor porcentaje de lesiones sin bacilos con un 47.9 % y solo 7.4% de este tipo de lesiones fue observada en el grupo de animales menores de cuatro meses (**Figuras 32 y 33**).

En ambos grupos se obtuvo una asociación entre el estadio de la lesión y la cantidad de BAARs con un valor de $P= 0.0001$ y una significancia estadística del $\alpha=0.05$.

Interesante fue observar que bovinos menores de cuatro meses en promedio tienden a tener una menor cantidad de células gigantes multinucleadas 1.4 comparado con 14.5 con bovinos mayores de un año (**Figura 34**). Además de que la célula gigante identificada en lesiones de animales jóvenes tenía una gran cantidad de bacilos (**Figura 35**).

Figura 31: Promedio de lesiones en el grupo de animales mayores de un año y menores de cuatro meses infectados naturalmente por *M. bovis*.

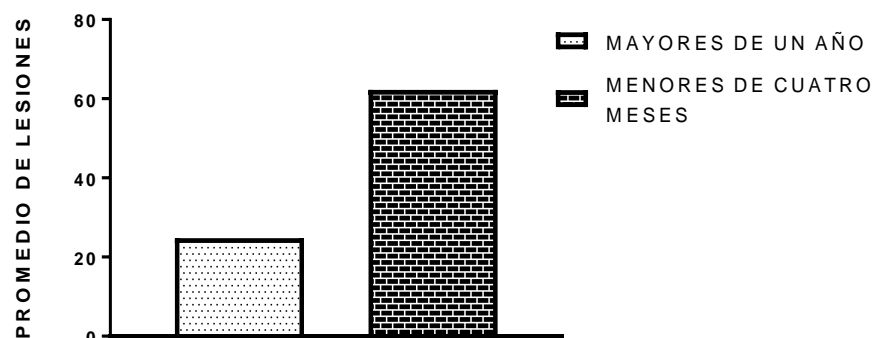
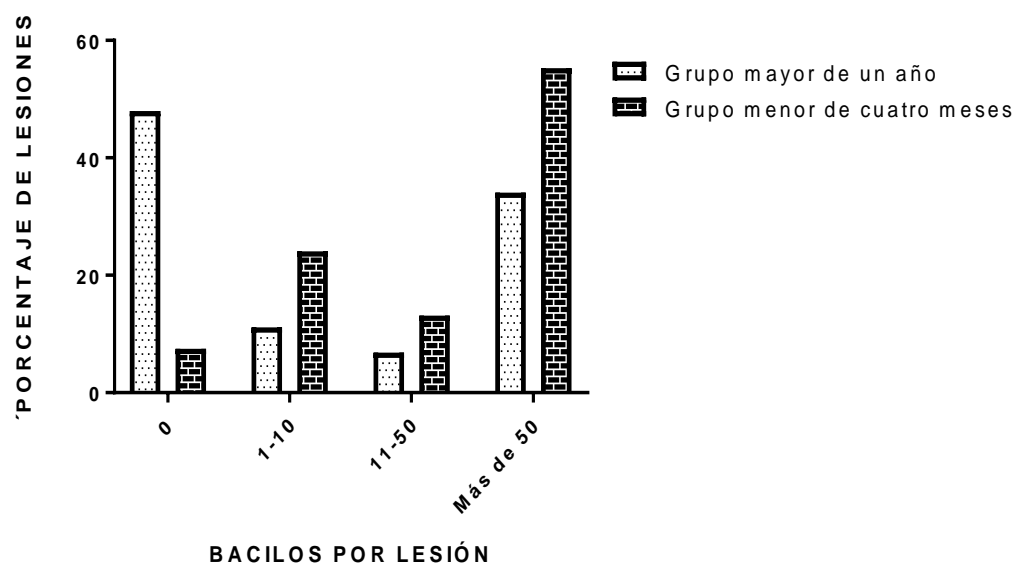


Figura 32. Porcentaje de lesiones con diferentes rangos de BAARS en el grupo de animales menores de cuatro meses y mayores de un año infectados naturalmente por *M. bovis*.



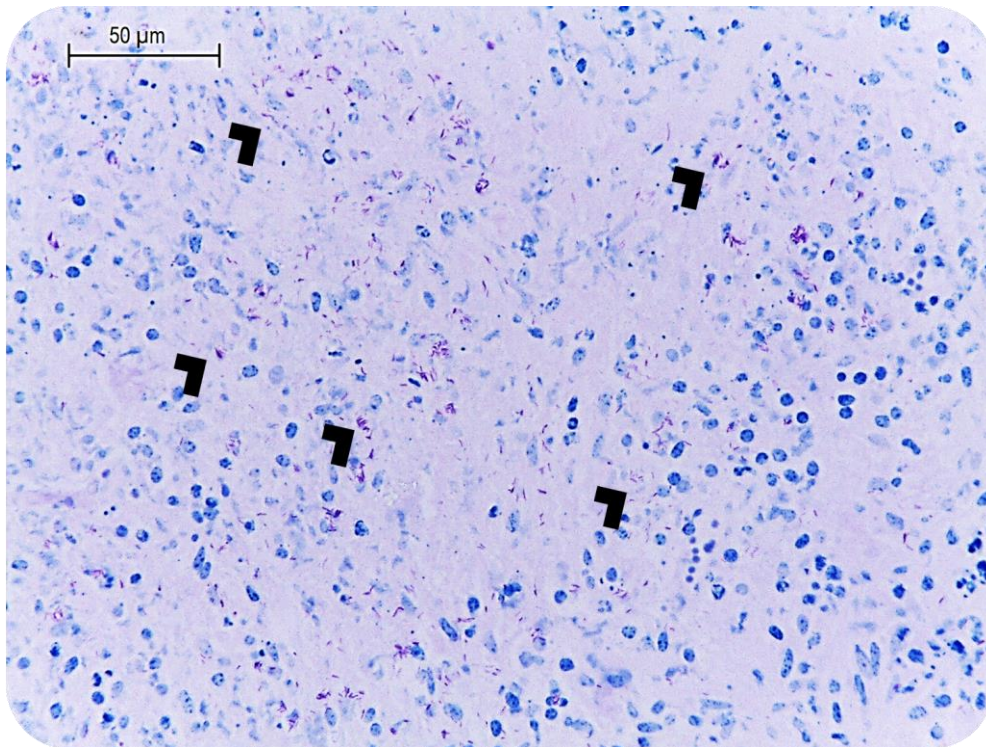
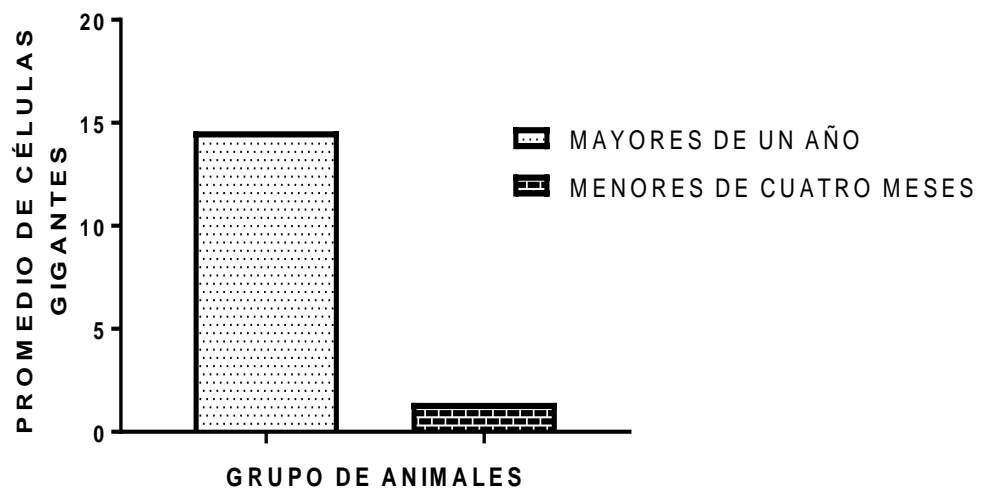


Figura 33: Abundante marcaje de BAARs en granuloma de bovino menor de cuatro meses de edad. Zielh Nelseen, 400x.

Figura 34. Promedio de células gigantes multinucleadas por lesión en el grupo de animales menores de cuatro meses y mayores de un año infectados naturalmente por *M. bovis*



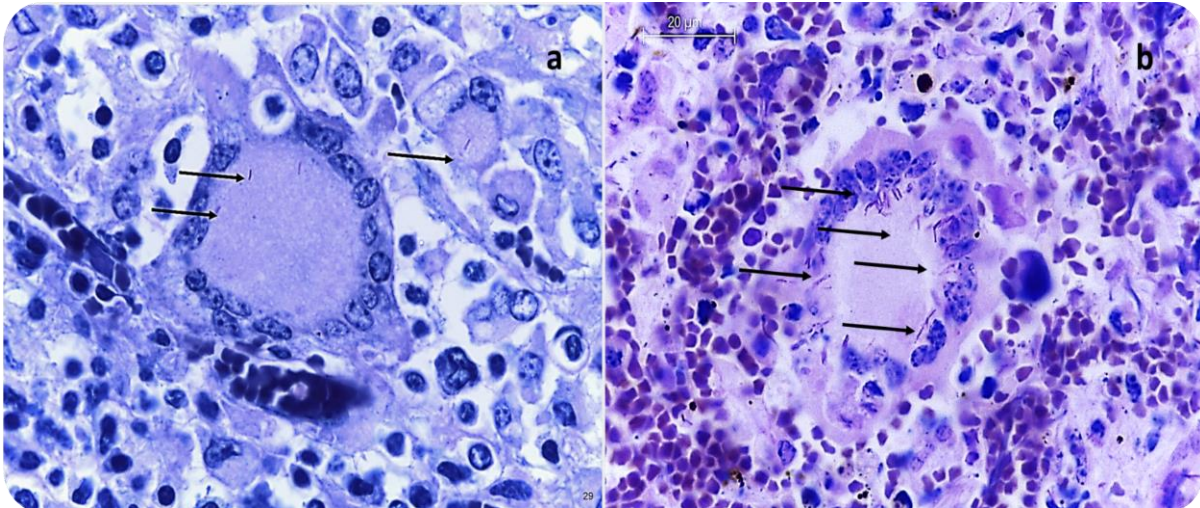


Figura 35: las Células gigantes multinucleadas de bovinos menores de cuatro meses presentan una mayor cantidad de bacilos. Ziehl Neelsen, 1000x. **(a)** Célula gigante en bovino mayor de un año y **(b)** Célula gigante en bovino menor de cuatro meses con abundantes bacilos marcados con flechas.

7.4 Aislamiento bacteriológico y diagnóstico molecular mediante PCR de tejidos con lesiones sugestivas a tuberculosis en animales naturalmente infectados.

Se realizó el cultivo bacteriológico de 20 muestras de tejido de bovinos que en el examen *post mortem* presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis, se obtuvo crecimiento sugerente a *Mycobacterium spp* en el 55 % (11/20), los cuales fueron confirmados mediante un PCR anidado del gen Mpb70 y M22 que identifica micobacterias patógenas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y donde el 100% (11/11) de las muestras fue positivo a PCR. Tanto en los nueve casos donde no se observó crecimiento en el cultivo bacteriológico, así como en 12 casos donde solo se contaba con bloques de parafina pero que fueron positivos a histopatología y a la tinción de Ziehl Neelsen de tejido se realizó la técnica de PCR como se mencionó anteriormente, donde se obtuvo el 76.1 % (16/21) con resultado positivo a Mpb70 y M22.

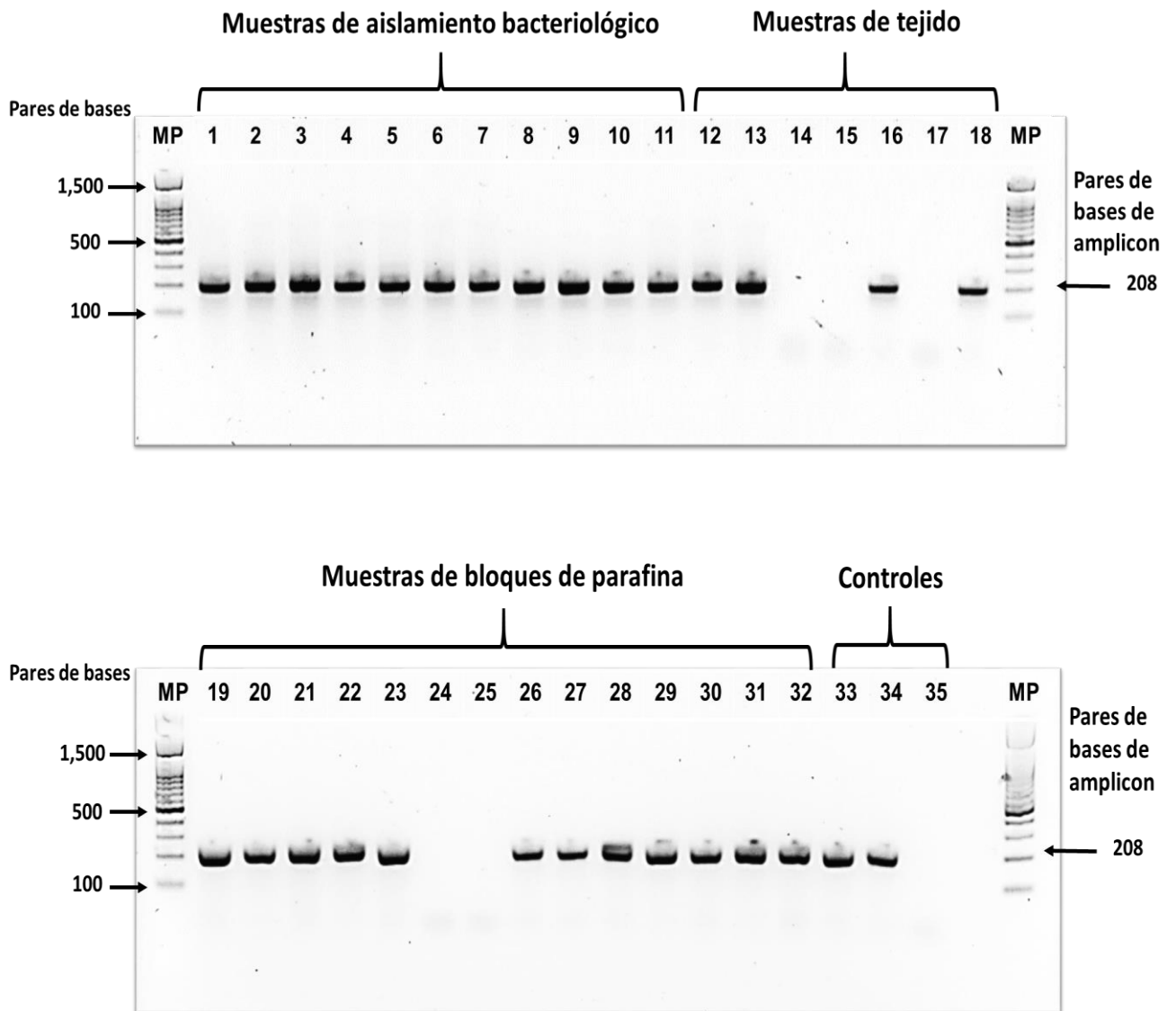


Figura 36: Resultado de PCR anidado del gen mpb70 de muestras de cultivo bacteriológico, muestras de tejido y de bloques de parafina que resultaron con lesiones sugestivas a tuberculosis. Carriles 1-11 corrida de reacción de PCR de aislados bacteriológicos. **Carriles 12-18** muestras de tejido donde no hubo crecimiento bacteriano. **Carril 19-32** muestras de bloques de parafina **Carril 33**. Control positivo de *M. bovis* AN5 **Carril 34**. Control positivo de *M. tuberculosis* H37rv **Carril 35**. Control negativo.

Cuadro 2: Resultado de cultivo bacteriológico, histopatología y PCR de bovinos que presentaron lesiones sugestivas a tuberculosis en el examen *post mortem*.

Número de caso	Edad	Genero	Histopatología	Aislamiento bacteriológico	PCR
1	2 AÑOS	H	+	+	+
2	4 MESES	M	+	+	+
3	4 MESES	H	+	+	+
4	4 MESES	H	+	+	+
5	3 AÑOS	H	+	+	+
6	3 AÑOS	H	+	+	+
7	6 AÑOS	H	+	+	+
8	3 AÑOS	H	+	+	+
9	2 AÑOS	H	+	+	+
10	6 AÑOS	H	+	+	+
11	5 AÑOS	H	+	+	+
12	3 AÑOS	H	+	-	+
13	5 AÑOS	H	+	-	+
14	5 AÑOS	H	+	-	-
15	4 AÑOS	H	+	-	-
16	5 AÑOS	H	+	-	+
17	3 AÑOS	H	+	-	-
18	4 AÑOS	H	+	-	+
19	4 AÑOS	H	+	-	+
20	4 AÑOS	H	+	-	+
21	4 MESES	H	+	S/C	+
22	8 DÍAS	H	+	S/C	+
23	1 MES	H	+	S/C	+
24	1 MES	H	+	S/C	-
25	1.5 MESES	H	+	S/C	-
26	3 MESES	H	+	S/C	+
27	3 MESES	H	+	S/C	+
28	2 MESES	H	+	S/C	+
29	1 MES	H	+	S/C	+
30	2.5 MESES	H	+	S/C	+
31	1 MES	H	+	S/C	+
32	3.5 MESES	H	+	S/C	+

(H: Hembra, M: Macho, S/C: Sin cultivo)

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La tuberculosis bovina es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas tanto en la industria ganadera como en salud pública debido a su capacidad zoonótica, representa un gran reto para su erradicación, en donde la vacunación parece ser un camino prometedor para su posible control. Las características del granuloma de ganado bovino experimentalmente vacunado con *M. bovis* BCG y posteriormente desafiados con cepas virulentas de *M. bovis* como son: estadio de la lesión, cantidad de tejido conectivo y el número de micobacterias por lesión, han sido utilizados en la evaluación de los candidatos vacunales (Johnson et al. 2006). Sin embargo, pocos estudios han caracterizado las lesiones encontradas en bovinos naturalmente infectados por *M. bovis*, que puede ser útil en la identificación de nuevos indicadores de resistencia natural a la enfermedad. Por lo que en este estudio se caracterizaron macroscópica, microscópica y bacteriológicamente lesiones de 32 bovinos que habitan en un lugar con una prevalencia de *M. bovis* mayor al 16%. Los casos analizados fueron clasificados en dos grupos el 53.2% (17/32) en animales con más de un año de edad y el resto 46.8 % (15/32) menos de cuatro meses debido a la diferencia de las lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas en ambos grupos.

Los principales órganos con lesiones macroscópicas al examen *post mortem* de bovinos infectados naturalmente se ha descrito en los pulmones y nódulos linfáticos asociados (Menin et al. 2013), este resultado es parecido a lo observado en este estudio con 32 bovinos de la raza Holstein Friesian infectados naturalmente por *M. bovis*, con una frecuencia del 100 % (32/32) y el 50 % (16/32) en nódulos linfáticos mediastínicos y pulmones respectivamente; esto se asocia con la ruta aerógena considerada la principal vía de ingreso de la micobacteria. Desafortunadamente, debido a que no fue posible analizar todo el tejido pulmonar de los bovinos que presentaron lesiones macroscópicas en nódulos linfático mediastínicos, no se descarta la posibilidad de que existieran lesiones en este tejido que no fueron vistas.

Macroscópicamente el grupo de bovinos menores de cuatro meses de edad, el 80 % (12/15) resultó con lesiones en los pulmones, donde las lesiones eran fácilmente visibles ya que en algunos casos más del 50% del parénquima pulmonar se

encontraba afectado. Este resultado fue algo inesperado ya que se piensa que las lesiones en animales jóvenes están principalmente asociadas a los nódulos linfáticos mesentéricos debido a la ingesta de leche contaminada (Moiane et al. 2014). En este estudio, solo el 33.3% (5/15) de los animales menores de cuatro meses presentaron lesiones en nódulos linfáticos mesentéricos (**Cuadro 1**). En estos animales no se descarta la posibilidad de una infección simultánea por ambas rutas. Por otra parte, se observó que este grupo es también susceptible de ser infectado vía aerógena, debido a esto, debe considerarse a la tuberculosis bovina como una enfermedad de diagnóstico diferencial en la necropsia de animales jóvenes con sospecha de infecciones respiratorias, además de utilizar el equipo necesario que asegure la integridad del personal que realiza la necropsia, ya que en estos animales se observó un mayor número de bacilos por lo que pueden representar un alto riesgo para el personal.

En el análisis microscópico, se encontraron diferentes estadios de granulomas dentro del mismo tejido analizado, esto mismo se ha reportado también en infecciones experimentales, lo que demuestra la presencia de diferentes microambientes en el mismo tejido infectado con *M. bovis* (Palmer et al. 2002; Palmer et al. 2007). Por otra parte, se han observado granulomas estadio I desde los 15 días después de la infección experimental con *M. bovis*, al igual que en un reporte de caso de un becerro de 15 días de edad que falleció por tuberculosis bovina (Ozyigit et al. 2007). Interesante, en este estudio se identificó un becerro de 8 días de edad que presentó lesiones granulomatosas, por lo que en este caso la infección congénita no se descarta.

En el grupo de animales mayores de un año se identificaron microscópicamente 396 granulomas, que de acuerdo a la clasificación de Wangoo *et al* (2005) fueron principalmente estadios tipo IV rodeados de granulomas satélites estadios I (**Figura 14**). Este tipo de lesiones se ha asociado como un bajo control en la infección, ya que se ha visto que en animales vacunados y desafiados con *M. bovis* presentan un menor número de este tipo de lesiones (Salguero et al. 2016; Johnson et al. 2006). La abundante presencia de granulomas estadio IV en animales naturalmente infectados, ilustran la cronicidad de la infección aunado a un predominio de la repuesta inmune antiinflamatoria relacionado con la presencia de abundante tejido conectivo que rodean las lesiones. El menor número de lesiones fueron los estadio

III que como en otro estudio estos han sido poco identificados (Aranday-Cortes et al. 2013)

En el grupo de bovinos menores de cuatro meses, macroscópica y microscópicamente mostraron lesiones diferentes a las observadas en animales adultos, debido a esto, los resultados muestran que las lesiones en animales infectados naturalmente por *M. bovis* difieren en las observadas en infecciones experimentales, por lo que se sugiere la revisión de mayor número de animales que permitan proponer una clasificación que represente lo observado en este tipo de lesiones.

En este estudio se propone una nueva clasificación de las lesiones encontradas en animales menores de cuatro meses infectados con *M. bovis* naturalmente que se basa en el criterio propuesto por Wangoo *et al.* (2005). Se identificaron cuatro estadios (I, II, II-III y III-IV) donde el estadio I y II histológicamente son parecidos a los encontrados en la clasificación de Wangoo et al (2005). Sin embargo, estos muestran una mayor cantidad de células necróticas, así como un mayor número de bacilos ácido alcohol resistente. El estadio II-III está compuesto principalmente por áreas de necrosis rodeadas por macrófagos sin presencia de capsula de tejido conectivo. El estadio III-IV al igual que el estadio anterior carecen de cápsula de tejido conectivo, pero presentan acumulo de precipitado de calcio al centro de la lesión. De acuerdo a esta categorización se identificaron 747 lesiones de las cuales el mayor porcentaje fue de estadios tipo I con un 47.2% (353/747), seguido del 26.9% (201/747) de estadios II-IV y en menor frecuencia estadios tipo III-IV con 9.3% (70/747). Este resultado puede interpretarse como un fallo en el control de la infección inicial donde las micobacterias pueden escapar del acumulo de células formando otra lesión inicial, por otra parte, este hallazgo puede asociarse con alta carga bacteriana que ingreso a estos animales.

Se observó que no es necesario una cápsula de tejido conectivo que se encuentre rodeando la lesión causada por *M. bovis* para que esté presente mineralización, ya que, en este estudio, 70 lesiones granulomatosas identificadas en bovinos menores de cuatro meses presentaron precipitados de calcio que se determinó con la tinción de Von Kossa.

Debido al hallazgo observado en los granulomas de bovinos menores de cuatro meses naturalmente infectados por *M. bovis*, el rumbo de la investigación se enfocó en realizar una comparación histopatológica y bacteriológica entre el grupo de bovinos adultos y jóvenes anteriormente mencionados. Debido a esto, no fue posible cumplir el objetivo particular que pretende identificar la población celular presente en estas lesiones. Sin embargo, actualmente se continua con esta investigación.

En conclusión, en este estudio se identificó un mayor número de lesiones macroscópicas en los nódulos linfáticos mediastínicos y pulmón de bovinos infectados por *M. bovis*, lo que muestra la principal ruta de ingreso de la micobacteria en una infección natural. Los estadios tipo IV son los principales observados en animales mayores de un año infectados naturalmente por *M. bovis* lo que ilustra la cronicidad de la enfermedad, desafortunadamente no fue posible establecer una asociación entre los estadios de granulomas con la cantidad de bacilos en ambos grupos. Sin embargo, en general se observó que en las lesiones de bovinos menores de cuatro meses infectados naturalmente por *M. bovis* tienen una mayor cantidad de bacilos comparado con los bovinos mayores de un año, estas lesiones “atípicas” tanto macroscópica como microscópicamente, muestran que los bovinos menores de cuatro meses son incapaces de controlar la infección.

9. AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IN-220415 de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el proyecto con el número 167488 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). El estudiante Jacobo Carrisoza Urbina fue becado por el CONACYT a través del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la FMVZ-UNAM.

Al MC Mario Adán Bedolla por su asesoría en la colecta de muestras, así como en proporcionar tejidos en bloques de parafina y fotografías de bovinos con lesiones sugestivas a tuberculosis que fueron incluidos en este estudio.

Al MC Adolfo Ortiz Rico por asesoría en la parte de cultivo bacteriológico y capacitación para trabajar en la unidad de bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

10. REFERENCIAS

- Aranday-Cortes, E. et al., 2013. Upregulation of IL-17A, CXCL9 and CXCL10 in early-stage granulomas induced by *Mycobacterium bovis* in cattle. *Transboundary and emerging diseases*, 60(6), pp.525–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22909117> [Accessed December 9, 2015].
- Cassidy, J.P., 2006. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology*, 112(2–4), pp.151–161. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113505003895> [Accessed August 27, 2017].
- Co, D.O. et al., 2004. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 113(2), pp.130–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661604002542> [Accessed December 10, 2015].
- Corleis, B. et al., 2012. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cellular Microbiology*, 14(7), pp.1109–1121. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2012.01783.x> [Accessed June 3, 2016].
- Dallenga, T. & Schaible, U.E., 2016. Neutrophils in tuberculosis – first line of defence or booster of disease and targets for host directed therapy? *Pathogens and Disease*, 74(3), p.ftw012. Available at: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1093/femspd/ftw012> [Accessed February 27, 2017].
- Davis, J.M. et al., 2002. Real-Time Visualization of *Mycobacterium*-Macrophage Interactions Leading to Initiation of Granuloma Formation in Zebrafish Embryos. *Immunity*, 17(6), pp.693–702. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761302004752> [Accessed August 27, 2017].
- Domingo, M., Vidal, E. & Marco, A., 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97, pp.S20–S29. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528814000927> [Accessed August 23, 2017].
- Eruslanov, E.B. et al., 2005. Neutrophil Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. *Infection and Immunity*, 73(3), pp.1744–1753. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731075> [Accessed February 26, 2017].
- Estrada-Chávez, C. et al., 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*, 35(3), pp.225–236. Available at: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=6869> [Accessed September 24, 2017].

- García-Jiménez, W.L. et al., 2013. Comparative Pathology of the Natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(2), pp.102–109. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1865-1682.2012.01321.x> [Accessed March 3, 2017].
- García-Jiménez, W.L. et al., 2012. Histological and immunohistochemical characterisation of *Mycobacterium bovis* induced granulomas in naturally infected fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary immunology and immunopathology*, 149(1–2), pp.66–75. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242712002036> [Accessed December 11, 2015].
- Guirado, E., Schlesinger, L.S. & Kaplan, G., 2013. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Seminars in immunopathology*, 35(5), pp.563–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864058> [Accessed September 10, 2017].
- Guzman, E. et al., 2012. Bovine $\gamma\delta$ T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1), pp.161–167.
- van Helden, P.D. et al., 2001. Isolation of DNA from *Mycobacterium tuberculosis*. In *Mycobacterium Tuberculosis Protocols*. New Jersey: Humana Press, pp. 019–030. Available at: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-147-7:019> [Accessed September 24, 2017].
- Herrtwich, L. et al., 2016. DNA Damage Signaling Instructs Polyploid Macrophage Fate in Granulomas. *Cell*, 167(5), p.1264–1280.e18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28084216> [Accessed September 12, 2017].
- Johnson, L. et al., 2006. Immunohistochemical markers augment evaluation of vaccine efficacy and disease severity in bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccinated cattle challenged with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111(3–4), pp.219–229. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242706000110> [Accessed December 11, 2015].
- Kabelitz, D., 2011. T-cells: Cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(14), pp.2331–2333. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-011-0696-4> [Accessed September 17, 2017].
- Kozakiewicz, L. et al., 2013. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Advances in experimental medicine and biology*, 783, pp.225–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23468112> [Accessed September 15, 2017].
- Lowe, D.M. et al., 2012. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends in Immunology*, 33(1), pp.14–25.

- Majoer, C.J. et al., 2011. Epidemiology of Mycobacterium bovis disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerging infectious diseases*, 17(3), pp.457–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3166011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 10, 2015].
- Menin, Á. et al., 2013a. Asymptomatic Cattle Naturally Infected with Mycobacterium bovis Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination P.-J. Cardona, ed. *PLoS ONE*, 8(1), p.e53884. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0053884> [Accessed February 26, 2017].
- Moiane, I. et al., 2014. Prevalence of Bovine Tuberculosis and Risk Factor Assessment in Cattle in Rural Livestock Areas of Govuro District in the Southeast of Mozambique P.-J. Cardona, ed. *PLoS ONE*, 9(3), p.e91527. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091527> [Accessed October 5, 2017].
- Mosser, D.M. & Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp.958–969. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2448> [Accessed September 10, 2017].
- Ndlovu, H. & Marakalala, M.J., 2016. Granulomas and Inflammation: Host-Directed Therapies for Tuberculosis. *Frontiers in immunology*, 7, p.434. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27822210> [Accessed September 10, 2017].
- Ozyigit, M.O., Senturk, S. & Akkoc, A., 2007. Suspected congenital generalised tuberculosis in a newborn calf. *Veterinary Record*, 160(9), pp.307–308. Available at: <http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.160.9.307> [Accessed October 5, 2017].
- Palmer, M. V., Thacker, T.C. & Waters, W.R., 2016. Multinucleated giant cell cytokine expression in pulmonary granulomas of cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 180, pp.34–39.
- Palmer, M. V., Thacker, T.C. & Waters, W.R., 2015. Analysis of Cytokine Gene Expression using a Novel Chromogenic In-situ Hybridization Method in Pulmonary Granulomas of Cattle Infected Experimentally by Aerosolized Mycobacterium bovis. *Journal of comparative pathology*, 153(2–3), pp.150–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997515001048> [Accessed December 11, 2015].
- Palmer, M. V., Waters, W.R. & Thacker, T.C., 2007. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis. *Veterinary pathology*, 44(6), pp.863–74. Available at: <http://vet.sagepub.com/content/44/6/863.long> [Accessed November 3, 2015].

- Palmer, M.V., Ray Waters, W. & Whipple, D.L., 2002. Aerosol delivery of virulent *Mycobacterium bovis* to cattle. *Tuberculosis*, 82(6), pp.275–282. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979202903410> [Accessed August 24, 2017].
- Pereira-Suárez, A.L. et al., 2006. Coexpression of NRAMP1, iNOS, and Nitrotyrosine in Bovine Tuberculosis. *Veterinary Pathology*, 43(5), pp.709–717. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.43-5-709> [Accessed February 21, 2017].
- Plattner, B.L., Doyle, R.T. & Hostetter, J.M., 2009. Gamma-delta T cell subsets are differentially associated with granuloma development and organization in a bovine model of mycobacterial disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(6), pp.587–597. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2613.2009.00679.x> [Accessed June 23, 2016].
- Pollock, J.M. et al., 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Veterinary Microbiology*, 112(2–4), pp.141–150. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113505003883> [Accessed August 26, 2017].
- Price, S. et al., 2010. *Differential distribution of WC1+ $\gamma\delta$ TCR+ T lymphocyte subsets within lymphoid tissues of the head and respiratory tract and effects of intranasal M. bovis BCG vaccination*,
- Ramakrishnan, L., 2012a. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), p.352. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3211> [Accessed January 3, 2017].
- Rao, M. et al., 2015. B in TB: B Cells as Mediators of Clinically Relevant Immune Responses in Tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 61 Suppl 3(Suppl 3), pp.S225-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26409285> [Accessed September 14, 2017].
- Russell, D.G., 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), pp.569–586. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/35085034> [Accessed September 4, 2017].
- Salguero, F.J. et al., 2016. Differential Cell Composition and Cytokine Expression Within Lymph Node Granulomas from BCG-Vaccinated and Non-vaccinated Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Transboundary and Emerging Diseases*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1111/tbed.12561/full> [Accessed September 17, 2017].
- Sanchez, J. et al., 2011. Microscopical and immunological features of tuberculoid granulomata and cavitory pulmonary tuberculosis in naturally infected goats. *Journal of comparative pathology*, 145(2–3), pp.107–117. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997510003646> [Accessed December 9, 2015].

- Shu, D. et al., 2014. Comparison of gene expression of immune mediators in lung and pulmonary lymph node granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 160(1–2), pp.81–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524271400083X> [Accessed December 1, 2015].
- Thacker, T.C., Palmer, M. V & Waters, W.R., 2007. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 119(3–4), pp.204–13. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242707001687> [Accessed December 2, 2015].
- Tsairidou, S. et al., 2014. Genomic prediction for tuberculosis resistance in dairy cattle. *PloS one*, 9(5), p.e96728. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096728> [Accessed December 10, 2015].
- Ulrichs, T. et al., 2004. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *The Journal of Pathology*, 204(2), pp.217–228. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15376257> [Accessed September 17, 2017].
- Vantourout, P. & Hayday, A., 2013. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), pp.88–100. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3384> [Accessed June 20, 2016].
- Wang, J. et al., 2013. Investigation of the effect of *Mycobacterium bovis* infection on bovine neutrophils functions. *Tuberculosis*, 93(6), pp.675–687.
- Wangoo, A. et al., 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of comparative pathology*, 133(4), pp.223–34. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997505000630> [Accessed December 10, 2015].
- Waters, W.R. et al., 2014. Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: Historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 159(3–4), pp.113–132. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242714000452> [Accessed August 20, 2017].
- Widdison, S., Watson, M. & Coffey, T.J., 2009. Correlation between lymph node pathology and chemokine expression during bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 89(6), pp.417–22. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979209000857> [Accessed December 11, 2015].
- Widdison, S., Watson, M. & Coffey, T.J., 2011. Early response of bovine alveolar macrophages to infection with live and heat-killed *Mycobacterium bovis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(5), pp.580–591.