CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.

ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS BACTERICIDA E INFLAMATORIA DEL MACRÓFAGO HACIA *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN BOVINOS SANOS EXPUESTOS Y SUS CONVIVIENTES ENFERMOS DE TUBERCULOSIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

EN LA OPCIÓN TERMINAL DE BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA

PRESENTA

QFB. CINDY GARCÍA GIL

GUADALAJARA, JAL. A 07 DE FEBRERO DE 2014.

La presente tesis de maestría se llevó a cabo gracias a la beca CONACYT otorgada a la QFB. Cindy García Gil, registro número 423856 y al proyecto FOMIX 2009-05-124324 y CB-2009-01 132068 otorgado al Dr. Hugo Esquivel Solís.

RESÚMEN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Mycobacterium bovis*, que induce la formación de granulomas o tubérculos, y es capaz de infectar al humano. Una alternativa de apoyo para la erradicación de la TBB es la selección genética de animales con resistencia natural a la infección por la micobacteria. Un animal naturalmente resistente es aquel que aun estando expuesto a *M. bovis* no se infecta. El estudio de macrófagos derivados de monocitos provenientes de vacas sanas de establos con alta prevalencia de TBB permitirá evaluar sus funciones bactericidas, inflamatoria y definir su papel en la resistencia natural a la infección en condiciones de exposición continua de forma natural y comparando a los macrófagos de animales expuestos e infectados con *M. bovis*. En el presente trabajo se observó que los macrófagos de bovinos expuestos sanos restringen la replicación de *M. bovis* BCG *in vitro*, producen mayor cantidad de ON, y sobreexpresan el gen *iNOS*, mientras que los macrófagos de bovinos naturalmente expuestos enfermos de TBB no controlan la replicación de *M. bovis* BCG, producen menores niveles de ON, y no sobreexpresan el gen *iNOS*, lo que sugiere que la generación de ON es clave para controlar la replicación de *M. bovis* BCG. Los resultados sugieren que el macrófago tiene un papel determinante en la resistencia natural a la infección por *M. bovis* en condiciones de exposición natural y que el ON es una molécula clave en este mecanismo.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (TBB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, which induces the formation of granulomas or tubercles, and is able to infect humans. An alternative to support the eradication of TBB is the breeding of animals with natural resistance to mycobacterial infection. A naturally resistant animal is one that even being exposed to *M. bovis* is not infected. The study of monocyte-derived macrophages from healthy cow stables with high prevalence of TBB will assess their bactericidal functions, inflammatory and define their role in natural resistance to infection under conditions of continuous exposure naturally and comparing macrophages animals exposed and infected with *M. bovis*. In the present study we found that macrophages from healthy cattle exposed restrict replication of *M. bovis* BCG *in vitro* produce extra NO, and overexpressing the *iNOS* gene, while macrophages of patients exposed cattle naturally TBB no control replication of *M. bovis* BCG, produced lower levels of NO, and not overexpress the *iNOS* gene, suggesting that the NO generation is key to controlling the replication of *M. bovis* BCG. The results suggest that the macrophage plays a decisive role in natural resistance to infection with *M. bovis* in conditions of natural exposure and that NO is a key molecule in this mechanism.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por esta experiencia.

Le agradezco a CIATEJ por permitirme ser parte de su grupo de estudiantes, y al Dr. Hugo Esquivel Solís por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

A mi comité tutorial; Dr. Ciro Estrada Chávez y Dra. Ana Laura Pereira Suárez por su asesoría durante este trabajo de tesis.

Gracias a mis papás y hermanos por enseñarme los valores importantes de la vida, por su apoyo incondicional, y sobre todo por el amor que me han brindado. Ustedes junto a mi esposo han sido el principal motor que me ha ayudado a salir adelante.

Gracias Juan por estar siempre a mi lado, en las subidas y sobre todo en las bajadas de mi camino por el posgrado, gracias por tu paciencia y por tu apoyo.

Gracias a mis amigos y compañeros Gladys y Carlos que durante estos 2 años y medio siempre estuvieron a mi lado, gracias por sus consejos y por su apoyo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio de la UBMyF, los cuales no voy a nombrar por temor a olvidar algún nombre, gracias por su compañerismo y por hacer de mi estancia en CIATEJ más amena.

A la Dra. Ana Laura por sus asesorías durante los ensayos de PCR. También le quiero agradecer al Dr. Gonzalo López por sus enseñanzas, las cuales me ayudaron en la realización de esta tesis.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Prevalencia nacional de tuberculosis bovina.

Figura 2. Pared celular micobacteriana.

Figura 3. Posibles resultados de la exposición del ganado bovino con Mycobacterium bovis.

Figura 4. Polarización del macrófago.

Figura 5. Mecanismos bactericidas del macrófago.

Figura 6. Inóculo de *M. bovis* BCG.

Figura 7. Cultivo de macrófagos.

Figura 8. Producción de ON.

Figura 9. Porcentaje de sobrevivencia de *M. bovis* BCG en macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles a la TBB.

Figura 10. Producción de ON por macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles a la TBB.

Figura 11. Producción de ROS por macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles a la TBB.

Figura 12. Ensayo de NBT.

Figura 13. Expresión relativa del gen *CCL2.*

Figura 14. Expresión relativa del gen *TNF-α.*

Figura 15. Expresión relativa del gen *iNOS.*

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión.

Tabla 2. Parámetros de la PCR tiempo real

Tabla 3. Oligonucleótidos de los genes utilizados para PCR tiempo real.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin Trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
cDNA	Ácido desoxiribunucléico complementario
FAD	Flavín adenin dinucleotido
FBS	Suero fetal bovino
GTP	Guanidin Trifosfato
IFN	Interferón
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
LAM	Liproarabinomanana
M. bovis	*Mycobacterium bovis*
mAGP	Micolil arabinogalactano peptidoglicano
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroblue tetrazolium
Nramp	Proteína del macrófago asociada a resistencia natural
ON	Óxido nítrico
Pb	Pares de bases
PIM	Fosfatidilinositol manósido

PPD	Derivado Proteico Purificado
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
TBB	Tuberculosis bovina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
1.1 Tuberculosis bovina……...……..1
1.2 Etiología de la tuberculosis bovina…….....3
1.3 Patogénesis de la tuberculosis bovina…….....5
1.4 Macrófagos……..8
1.4.1 Clasificación…….....9
1.4.2 Funciones…….11
1.4.2.1 Fagocitosis…….....12
1.4.2.2 Procesamiento y presentación de antígeno……...12
1.4.2.3 Mecanismos bactericidas……..13
1.4.2.3.1 Acidificación del fagolisosoma….……...13
1.4.2.3.2 Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno…….....14
1.4.3 Producción de citocinas y quimiocinas…….....15
1.4.4 Macrófagos en la resistencia…….....17
2. ANTECEDENTES
2.1 Resistencia a la tuberculosis bovina……..18
3. JUSTIFICACIÓN ……...21
4. HIPÓTESIS……..22
5. OBJETIVOS……..……...23
6. DISEÑO EXPERIMENTAL
6.1 Animales……24
6.1.1 Criterios de inclusión……24
6.1.2 Criterios de exclusión……25
7. MATERIALES Y MÉTODOS
7.1 Obtención de PBMC bovino……..27
7.2 Preparación del inóculos de *M. bovis* BCG…….....27
7.3 Ensayo bactericida……29
7.4 Cuantificación de nitritos (Ensayo de Griess)……...30

7.5 Ensayo de reducción del azul de tetrazolio.……...31
7.6 Preparación de la muestra y extracción de RNA……...31
7.7 Síntesis de cDNA……...33
7.9 PCR tiempo real…….33
8. RESULTADOS……35
9. DISCUSIÓN…….....44
10. CONCLUSIONES……...48
11. PERSPECTIVAS…….49
12. BIBLIOGRAFÍA…….51
13. ANEXOS…….56

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad crónica bacteriana que se caracteriza por el desarrollo de lesiones granulomatosas llamadas tubérculos en los sitios de infección (Bloom 1994), cualquier tejido del cuerpo puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con mayor frecuencia en los ganglios linfáticos, pulmones, intestinos, hígado, bazo y peritoneo.

La TBB es causada por *Mycobacterium bovis*, bacilo, ácido alcohol resistente, que tiene una pared celular gruesa, hidrofóbica y cerosa, que le proporciona resistencia a las respuestas del sistema inmunológico de sus huéspedes, impidiendo la maduración del fagosoma y así evitando el arsenal antimicrobiano (generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) (Nguyen *et al.* 2005). La compleja superficie de la micobacteria le permite interactuar con diversos receptores de su hospedero, lo que confiere a la bacteria gran capacidad de adaptación a la vida dentro del mismo, ya que interfiere con los eventos de tráfico intracelular después de la fagocitosis por el macrófago lo que le permite a la bacteria vivir y replicarse dentro de él (Stewart *et al.* 2003).

El principal hospedador de *M. bovis* es el ganado bovino. Sin embargo, se ha logrado aislar al microorganismo de otras especies animales de vida silvestre que sirven como un reservorio, haciendo difícil el control de la enfermedad (Garnier *et al.* 2003), por lo que resulta complicado la detección del animal infectado y el sacrificio del mismo, además de que es una importante zoonosis, ya que la TBB se puede transmitir a los humanos a través de la inhalación de gotas que contienen *M. bovis* y por la ingestión de leche no pasteurizada o sus productos (Thoen *et al.* 2006).

Mycobacterium bovis infecta cerca de 50 millones de bovinos alrededor del mundo ocasionando pérdidas financieras significativas. En nuestro país esto representa una pérdida de 450 millones de dólares anuales, que se deben a la comercialización restringida de animales infectados o sus productos, a la disminución en la producción de leche (17%) y carne, y al decomiso de canales por lesiones tuberculosas provenientes de hatos con la enfermedad (SAGARPA 2012).

Según datos de SAGARPA (Figura 1), debido a la Campaña Nacional de control y erradicación de TBB basada en la prueba de la tuberculina que realiza la detección de animales infectados por *M. bovis* (PPD+) y su sacrificio, el 83% del territorio nacional se encuentra en una fase de erradicación con una prevalencia global menor al 0.5%, mientras que el resto del país tiene un prevalencia promedio del 2.05%, exceptuando las cuencas lecheras en las cuales se reportó una prevalencia mayor del 16.5% para el año 2011 (SAGARPA 2012), el escaso éxito de la campaña en establos lecheros es debido en gran parte a la baja participación de los productores de leche en la campaña (Zendejas-Martinez *et al.* 2008), al confinamiento de los animales que provoca contacto continuo en las salas de ordeño, los comederos, los parideros y en general en todo el establo, lo que aumenta la probabilidad de estar en acercamiento con la micobacteria, además de que el ganado lechero está sometido a mas condiciones de estrés por el proceso de ordeña, y debido a que estas tienen una vida más larga en comparación al ganado de carne que incrementa el periodo de exposición, la probabilidad de infección y el desarrollo de la enfermedad.

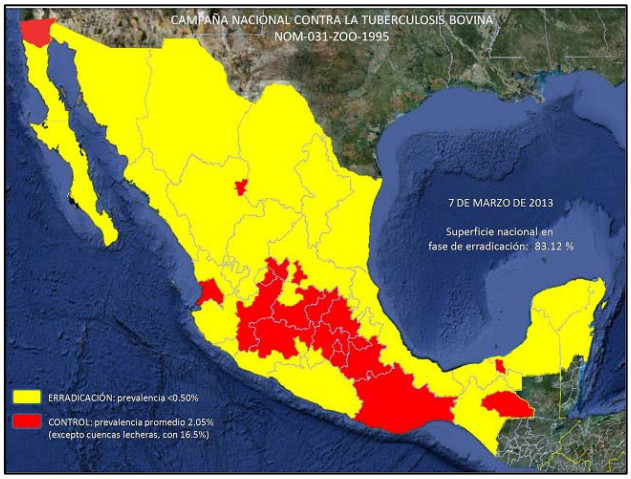


Figura 1. Prevalencia nacional de tuberculosis bovina. Fuente: http://www.senasica.gob.mx/?id=4369

La falta de éxito en la erradicación de la tuberculosis indica la necesidad de crear nuevas estrategias de control. Una alternativa es la identificación y selección de animales

naturalmente resistentes a la TBB para poder establecer programas de selección y reproducción e incrementar la inmunidad de la población hacia esta enfermedad. Sin embargo, actualmente no existen parámetros *ante-mortem* que definan la condición de resistencia a la TBB en el ganado. El desafío *ex vivo* de las células del sistema inmune podría ser útil para identificar animales con un fenotipo de resistencia a *M. bovis*, y ayudaría al establecimiento de marcadores genéticos útiles para identificar en vida bovinos que sean resistentes a esta enfermedad.

1.2 Etiología de la tuberculosis bovina

M. bovis, agente causal de la tuberculosis bovina, es un bacilo ácido alcohol resistente, de lento crecimiento, inmóvil y no formador de esporas, con un alto contenido de lípidos de alto peso molecular en su pared. Este microorganismo pertenece al grupo del orden Actinomicetales de la familia *Mycobacteriaceae*, y es un miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye patógenos de animales y humanos como, *M. tuberculosis, M. africanum, M, canetti, M. microti, M. bovis, M. caprae* y *M. pinnipedii.* Los miembros de este grupo son micobacterias altamente relacionadas que exhiben gran similitud en la secuencia de nucleótidos (99.95%) (Fleischmann *et al.* 2002), a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y algunas características fisiológicas, tales como la morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a inhibidores (Thoen *et al.* 2006).

Mycobacterium bovis además de causar enfermedad en los animales, es una de las tres especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que causa tuberculosis en el humano (Thoen *et al.* 2006).

M. bovis posee un genoma de 4’ 345,492 pb, con 4,003 genes que codifican para 3,952 proteínas y 50 RNAs estructurales, incluye un profago y 42 secuencias de inserción. Estructuralmente *M. bovis* contiene 65% de G+C, lo que se refleja en el contenido de aminoácidos básicos de sus proteínas, en su mayoría enzimas necesarias para el metabolismo de lípidos constitutivos de su pared celular (Garnier *et al.* 2003).

La pared celular de las micobacterias está compuesta por dos segmentos. Además de la membrana está el peptidoglicano en unión covalente al arabinogalactano, el cual está unido a los ácidos micólicos con sus cadenas largas de meromicolato y cadenas-α cortas. Esto está denominado como el núcleo de la pared celular el complejo micolil arabinogalactano peptidoglicano (mAGP). La parte superior está compuesta de lípidos libres, algunos ácidos grasos de cadenas largas que complementan las cadenas-α más cortas, y algunos con ácidos grasos de cadenas cortas complementando las cadenas largas. De manera intercalada están las proteínas de la pared celular, el fosfatidilinositol manosido (PIMs), lípidos que contienen tiocerol, lipomanana y liporabinomanana (Figura 2) (Chatterjee *et al.* 1998; Brennan 2003).

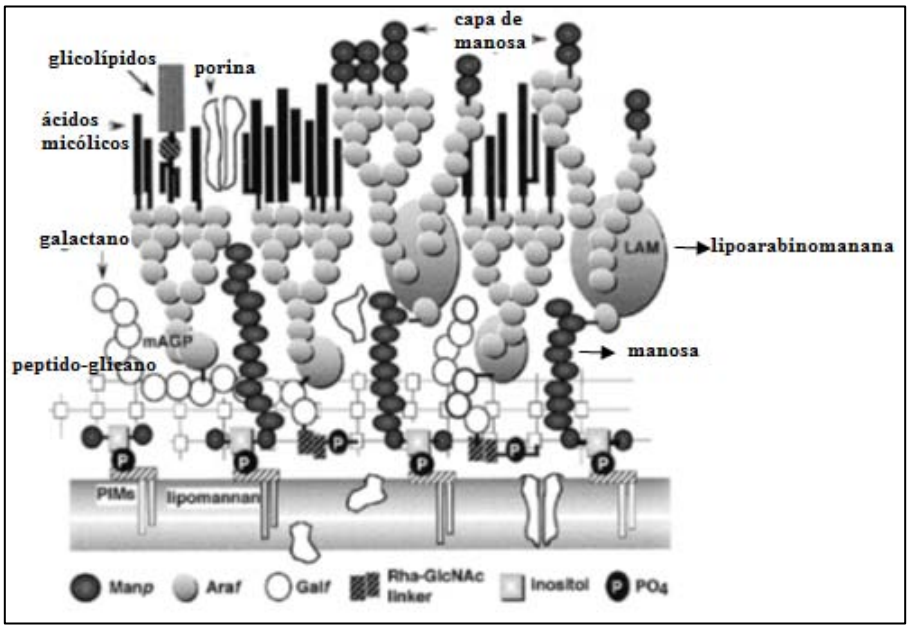


Figura 2. Pared celular micobacteriana. Manp: 2, 3,4-tri-O-metil-D-manosa, Araf: 2, 3,5-tri-O-metil-D-arabinosa, Galf: galactofuranosa, Rha-GlcNAc: N-acetil glucosamina-L-ramnosa, PO_4: fosfatos. Fuente: (Chatterjee *et al.* 1998)

La resistencia que presenta este bacilo a la deshidratación y a ciertos antibióticos está relacionada a la baja permeabilidad de su membrana y su ácido resistencia se atribuye a la habilidad de retener colorantes siguiendo el tratamiento con ácidos fuertes debido principalmente a los ácidos micólicos presentes en su membrana (Saunders *et al.* 2007).

La pared celular de las micobacterias es una compleja estructura que contribuye al resultado entre el encuentro de esta con su hospedero (sobrevivencia), ya que presenta diversos tipos de ligandos que pueden ser reconocidos por receptores presentes en las células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas, la fagocitosis de *M. bovis* y la activación de genes de respuesta inmune innata son resultado de este reconocimiento (Means *et al.* 2001). Componentes de la pared celular micobacterial como LAM y peptidoglicanos están involucrados en la activación de macrófagos vía receptores de la familia TLRs, principalmente por TLR2 y TLR4, este reconocimiento ha mostrado ser de importancia para la inducción de una respuesta protectora por parte de los macrófagos, también se ha visto que la interacción de ManLAM, con TLR2 de células dendríticas y macrófagos, puede guiar a la inhibición de la síntesis de citocinas como la IL-12 y TNF-α, las cuales son citocinas de importancia para la inducción de una respuesta inflamatoria (Nigou *et al.* 2001), además LAM es capaz de inhibir la maduración fagosomal (Fratti *et al.* 2003; Vergne *et al.* 2003). Otro componente de la pared celular es el fosfatidil inositol manósido (PIM), cuya interacción con los TLR2 de los macrófagos se ha visto que aumenta la fusión de los fagosomas con los endosomas tempranos (Vergne *et al.* 2004). El muramil dipéptido, componente del peptidoglicano bacteriano es sensado por los receptores tipo NOD, y se ha observado en un modelo *in vitro* que la producción de TNF-α está mediado por esta interacción (Divangahi *et al.* 2008). También se ha visto que las manosas terminales de los liposácaridos micobacteriales son determinantes en la infección de macrófagos, ya que promueven la expresión de una respuesta inflamatoria, cuando se unen a receptores de lectinas de unión a manosa como la dectina -1 que activa las expresión de citocinas inflamatorias como TNF-α, IL-6, IL-1B, IL-12, IL-23 e IL-17 (van de Veerdonk *et al.* 2010).

1.3 Patogénesis de la tuberculosis bovina

La infección natural comienza con la inhalación de la micobacteria que es expectorada por un animal enfermo dentro de pequeñas gotas microscópicas en forma de aerosoles, que permanecen en la atmósfera, suelo o instalaciones por poco tiempo y posteriormente son inhaladas por otro animal. El bacilo entra al organismo por el sistema respiratorio, donde

escapa a las mucosas y cilios epiteliales que son las primeras barreras de la inmunidad innata, pasa por los bronquiolos y gana el acceso a los alveolos debido a su pequeño tamaño (1-4µm, comparado al de los alveolos 20µm). Dentro de los alveolos la bacteria es fagocitada por los macrófagos alveolares, después ocurre la fusión del fagolisosoma para la posterior destrucción de la micobacteria y el procesamiento de antígenos (Hope *et al.* 2004). Sin embargo esta micobacteria es capaz de sobrevivir y de multiplicarse principalmente en estas células (Pollock *et al.* 2006) y de dispersarse a otros sitios (Corner 1994). La infección también ocurre en las células dendríticas, las cuales tienen la capacidad de entrar a la circulación linfática hasta llegar a los nódulos linfáticos, donde ocurre la presentación de antígenos a los LT vírgenes, los cuáles se reclutarán a los sitios de infección para activar a los macrófagos infectados mediante la secreción de IFN-γ (Saunders *et al.* 2007).

En las primeras etapas de la infección los macrófagos producen citocinas inflamatorias como el TNFα e IL-12, y quimiocinas como CCL2 y CXCL10, las cuales guían al reclutamiento de células de sangre periférica al sitio de infección y comienzan a construir el granuloma o tubérculo (Russell 2007). El granuloma consiste en una semilla de macrófagos infectados rodeados por macrófagos epiteloides, LB, células gigantes multinucleadas tipo Langhans, fibroblastos y LT, (Ulrichs *et al.* 2006). Existe un estudio en los cuales se ha investigado la proporción de las diferentes subpoblaciones de LT en bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis,* en este estudio se observa que a los 16 días posinfección hay una disminución en la población de LTγδ, lo cual sigue por un incremento en la proporción de LT CD4+:CD8+, cuyo máximo ocurre a los 44 días después de la infección, esta proporción disminuye a los 95 días a niveles presentados antes de la inoculación. Además se ha observado que los LT CD4+ de memoria predominan, y en estudios inmunopatológicos se ha visto que estas células son las primeras envueltas en la formación del granuloma (Cassidy *et al.* 2001).

En etapas tardías, en el granuloma puede llegar a desarrollarse una cápsula fibrosa con lo que se disminuye el número de vasos sanguíneos generando hipoxia y necrosis observándose un aspecto caseoso derivado de la acumulación de restos celulares (Cassidy *et al.* 1998; Russell 2007). En bovinos infectados experimentalmente estas lesiones son observados mayormente en el tracto respiratorio y en nódulos linfáticos asociados (Cassidy *et al.* 1998). En humanos, el control del granuloma puede fracasar por fallas en el sistema inmune, lo cual puede ser

consecuencia de una edad avanzada o desnutrición, básicamente cualquier condición que reduzca el número o afecte la función de las linfocitos T CD4+ de perfil Th1 (productoras de IFN-γ). Debido a estos cambios en el sistema inmune el granuloma caseoso se debilita y se rompe y libera los bacilos viables e infecciosos, lo cual resulta en su diseminación dentro del organismo y a la transmisión hacia otros individuos a través de la expectoración (Russell 2007), lo cual nos hace suponer que en el bovino los eventos son muy similares (Pollock *et al.* 2002).

Otras extirpes celulares pertenecientes al sistema inmune innato además de los macrófagos han sido estudiados para dilucidar el papel que pueden jugar durante la infección con la micobacteria. En modelos murino, humano y bovino se ha visto que las células Natural Killer (NK) tienen un papel en la TB, reduciendo el crecimiento intracelular de la micobacteria. Además, estas células son productoras de IFN-γ, citocina importante en la inducción de los mecanismos bactericidas del macrófago, además tiene capacidades citolíticas contra células infectadas (Yoneda *et al.* 1998). En un modelo de bovinos provenientes de establos libres de TBB, se observó que al realizar un co-cultivo de células NK con macrófagos infectados con *M. bovis*, la replicación micobacterial disminuía en comparación al cultivo sin células NK, además de que se observó un aumento en la producción de IL-12 y ON (Denis *et al.* 2007).

Cuando el ganado bovino es expuesto a *M. bovis* pueden surgir diferentes resultados que se ilustran en la Figura 3. Algunas vacas pueden resistir a la infección, eliminando a la micobacteria inmediatamente mediante una eficaz respuesta inmune innata, estas vacas no desarrollan granulomas y son negativas a la prueba de la tuberculina.

Otro posible escenario es que la vaca se infecte pero controle al bacilo mediante una inmunidad adquirida, la cual sea capaz de mantener al bacilo en un estado de latencia dentro de los granulomas, resultando positivas a la prueba de la tuberculina, exceptuando los casos de anergia lo cuales pueden dar un resultado contrario a dicha prueba. En estos estados de latencia la infección puede ser reactivada durante una inmunosupresión, posiblemente debido a una coinfección con otros patógenos como por ejemplo el virus de la diarrea viral bovina, o por un estado de estrés, edad y estado nutricional.

Otro de los posibles resultados de la exposición a la micobacteria es que la vaca no logre eliminar al bacilo ni mantenerlo en latencia dentro de los granulomas, lo cual lleva al animal a un estado de enfermedad (Pollock *et al.* 2002). Sin embargo, algunas de ellas pueden dar lecturas positivas a dichas pruebas debido a falsos positivos que se pueden deber quizás a una reacción cruzada con micobacterias ambientales, esto se ha observado durante las examinaciones post mortem en los rastros donde existen animales positivos a PPD con ausencia de lesiones granulomatosas.

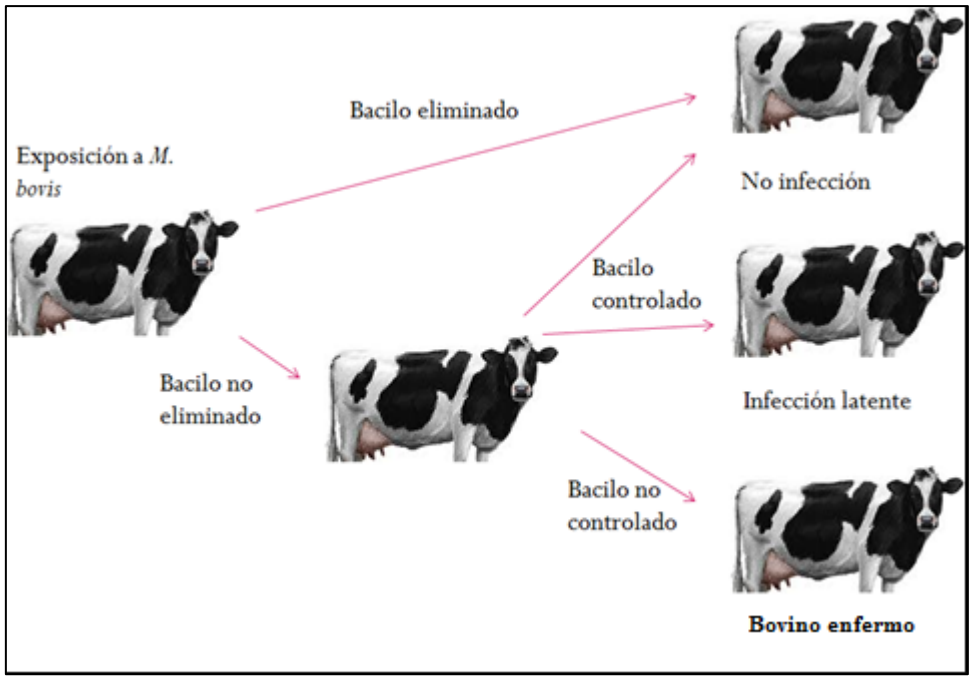


Figura 3. Posibles resultados de la exposición del ganado bovino con *Mycobacterium bovis*. Fuente: modificado de (Pollock *et al.* 2002)

1.4 Macrófagos

Los macrófagos fueron inicialmente reconocidos por Elie Metchnikoff como células fagocíticas responsables de la eliminación de patógenos y con funciones de limpieza en un amplio rango de organismos (Martinez *et al.* 2009). Durante la hematopoyesis en la médula ósea las células progenitoras de granulocitos y monocitos se diferencian en promonocitos, que

salen de la médula ósea y pasan a la sangre, en donde se diferencian de modo adicional en monocitos maduros, los cuales son células que no están completamente diferenciadas y que son muy susceptibles a los estímulos ambientales, estas células permanecen circulantes en el torrente sanguíneo alrededor de ocho horas, durante las cuales crecen; a continuación, se extravasan mediante el endotelio y migran hacia los tejidos donde se diferencian en macrófagos maduros ejerciendo funciones inmunológicas específicas (Thomas J. Kindt 2007), que contribuyen a la defensa del huésped y a la remodelación y reparación del tejido dañado (Gordon *et al.* 2005; Solinas *et al.* 2009).

Los macrófagos se dispersan en la totalidad del cuerpo, algunos residen en tejidos particulares y se constituyen en macrófagos fijos, en tanto que otros permanecen movibles y se llaman macrófagos libres o errantes, los cuales se desplazan a través de los tejidos mediante movimientos ameboides (Pixley 2012). Conforme a su localización tisular los macrófagos son denominados y cumplen diferentes funciones: macrófagos alveolares en el pulmón, histiocitos en los tejidos conectivos, células de Kupffer en el hígado, células mesangiales en el riñón, células microgiales en el cerebro y osteoclastos en el hueso.

1.4.1 Clasificación de los macrófagos

Los macrófagos pueden responder a diversas señales, como estímulos endógenos que típicamente son generados por células del sistema inmune innato o a señales que provienen de células inmunes específicas de antígeno. Según el estímulo recibido, el macrófago tiene la capacidad de producir factores que influyen en su propia fisiología. Basado en esto se han clasificado a estas células según sus funciones inmunológicas como se muestra en la figura 4. Los macrófagos “activados clásicamente” (M1) y macrófagos “activados alternativamente” (M2) (Mosser *et al.* 2008; Pollard 2009; Solinas *et al.* 2009).

El término M1 ha sido designado a los macrófagos efectores generados durante la respuesta inmune mediada por células. Estos son aquellos que responden al encuentro con el IFN-γ que en combinación con el factor de necrosis tumoral (TNF) resulta en la liberación citocinas pro-inflamatorias, tales como la IL-12 e IL-23, que consecuentemente activan a las células T polarizadas tipo Th1, además, presentan actividad citotóxica en contra de microorganismo

fagocitados y células neoplásicas, expresan altos niveles de ROI, y tienen una buena capacidad como célula presentadora de antígeno (Mosser *et al.* 2008; Pollard 2009).

Los macrófagos M2 se pueden diferenciar en diferentes subtipos, cuando son estimulados con IL-4 o IL-13 (M2a), con complejos inmunes/ligandos TLR (M2b), o con IL-10 y glucocorticoides (M2c) (Solinas *et al.* 2009). Los macrófagos M2 se caracterizan por la alta producción de IL-10, IL-1ra, CCL17 y CCL22, por la alta expresión de receptores de manosa, de receptores tipo galactosa y *scavenger*, y por la pobre capacidad de presentación de antígenos. Además, el tipo M2 expresa cambios específicos en algunas vías metabólicas: el metabolismo de arginina es orientado hacia la producción de ornitina y poliamina en lugar de citrulina y ON. Los macrófagos tipo M2 controlan la respuesta inflamatoria regulando de manera negativa las funciones mediadas por los M1, responden a las citocinas tipo Th2, tales como la IL-4 e IL-13, que están envueltas en fibrosis, reparación de tejido e inmunidad humoral, y son competentes células efectoras en contra de las infecciones por parásitos (Castillo-Velazquez *et al.* 2011).

La pérdida en el equilibrio de M1 y M2 puede guiar a eventos patológicos: un exceso en células M1 podría inducir enfermedades inflamatorias crónicas, mientras una elevación en células M2 generaría una severa supresión inmunológica (Mosser *et al.* 2008; Pollard 2009; Solinas *et al.* 2009).

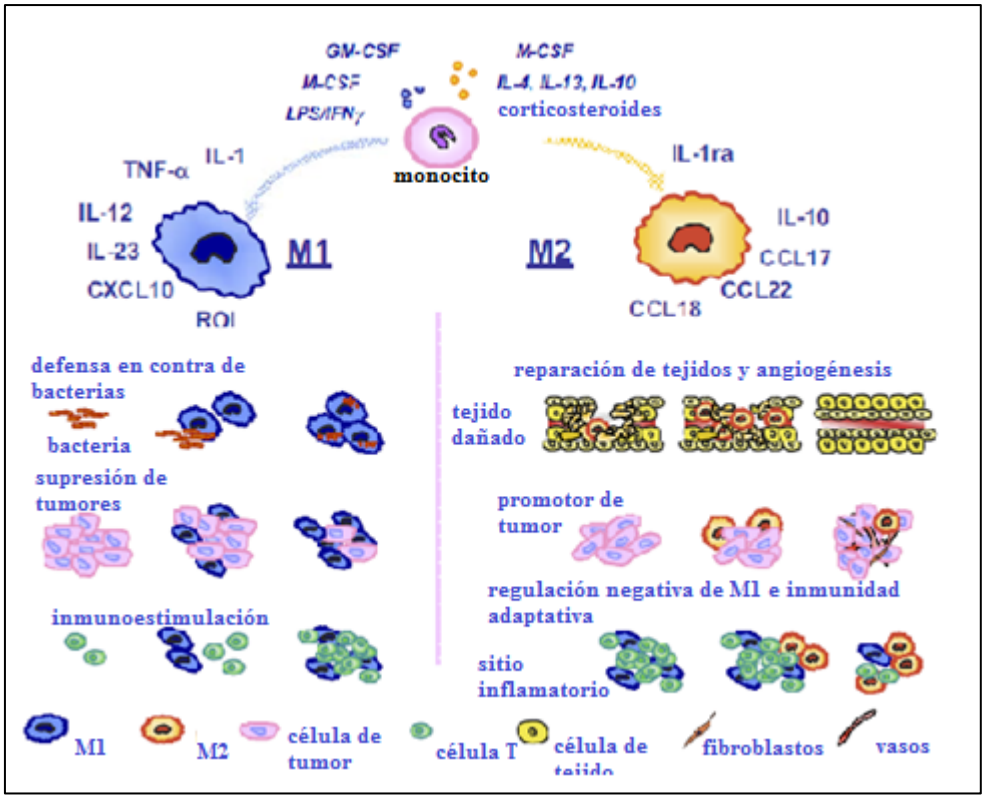


Figura 4. Polarización del macrófago. Los macrófagos pueden responder a diversas señales,. Según el estímulo recibido, el macrófago tiene la capacidad de producir factores que influyen en su propia fisiología. Basado en esto se han clasificado a estas células según sus funciones inmunológicas, Los macrófagos "activados clásicamente" (M1) y macrófagos "activados alternativamente" Fuente: (Solinas *et al.* 2009).

1.4.2 Funciones

Los macrófagos expresan un amplio rango de receptores localizados en la membrana, en los compartimentos vacuolares y en el citosol, que median sus interacciones con componentes propios alterados y con amplio rango de microorganismos. La habilidad del macrófago para reconocer un amplio rango de ligandos extracelulares e intracelulares y responder de una manera apropiada a estos contribuye a la homeostasis, a la defensa del organismo mediante la generación de una respuesta inmune innata, y a la inducción de una respuesta inmune adquirida (Taylor *et al.* 2005; Gordon 2007).

1.4.2.1 Fagocitosis

Los macrófagos han sido referidos como fagocitos profesionales y son muy eficientes internalizando partículas. La internalización y subsecuente destrucción de patógenos son claves para la respuesta de la inmunidad innata, promueve la presentación de antígeno para el desarrollo de una inmunidad adaptativa.

La fagocitosis es un proceso complejo debido a la diversidad de receptores capaces de estimularla, y debido a la capacidad que tiene muchos microorganismos para evadir este proceso. A pesar de esta complejidad asociada con los diferentes mecanismos de fagocitosis, existe un número de características asociadas que son las siguientes: la internalización de la partícula es iniciado por la interacción de receptores específicos sobre la superficie del fagocito con ligandos sobre la superficie de la partícula, esta interacción del microorganismo con el macrófago puede ser de manera directa mediante el reconocimiento de moléculas asociadas al patógeno, o de manera indirecta mediante opsoninas. El microorganismo es atrapado, junto con fluido extracelular, en una vacuola o fagosoma derivado de la membrana plasmática. Esto guía a la polimerización de actina al sitio de ingestión, y a la internalización de la partícula vía a un mecanismo basado en actina (Aderem *et al.* 1999).

1.4.2.2 Procesamiento y presentación de antígenos

Los macrófagos son células que cumplen con la función de procesar y presentar antígenos. Una vez interiorizados los antígenos dentro del fagosoma, estas vesículas se pueden fusionar con los lisosomas dando origen a los fagolisosomas, donde los antígenos se degradan por la acción de enzimas como las catepsinas, para dar lugar a péptidos con propiedades estructurales que les permita unirse al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC). Las moléculas del MHC-II son ensambladas en el retículo endoplasmático, viajan a través del aparato de Golgi hasta llegar al fagolisosoma donde se encuentran los péptidos antigénicos y ahí ocurre el ensamblaje del complejo péptido-MHC-II, una vez ensamblado, este complejo es llevado a la superficie celular donde presentará al antígeno a los linfocitos $CD4^+$. En el caso de antígenos citosólicos (antígenos intracelulares o proteínas propias), estos son degradados a péptidos por los proteosomas, una vez degradados estos péptidos son transportados hacia el

retículo endoplasmatico donde se encuentran las moléculas del MHC-I, aquí mismo ocurre el ensamblaje del complejo péptido-MHC-I, una vez ensamblado viajan a través del aparato de Golgi y se expresan en la superficie celular, donde serán presentados a los linfocitos CD8 (Unanue 1984; Majlessi *et al.* 2007)

1.4.2.3 Mecanismos bactericidas

1.4.2.3.1 Acidificación del fagosoma

La formación del fagosoma es un proceso crítico para la eliminación de los patógenos invasores y como ya se mencionó anteriormente para el procesamiento y presentación de los antígenos (Vergne *et al.* 2004).

La maduración o acidificación del fagosoma inicia inmediatamente después de que el fagosoma es sellado y es cortado de la superficie de membrana, enseguida este experimenta fusiones con endosomas tempranos, endosomas tardíos y con lisosomas para la formación de un fagolisosoma. Durante la maduración, el fagosoma adquiere hidrolasas y experimenta una progresiva acidificación causada por la bomba de protones V-ATPasa. Esta bomba de protones facilita la generación de superóxido (O_2^-) por el transporte de H^+ contrarrestando así las cargas negativas translocadas por la oxidasa NADPH, cuyos productos consecuentemente se combinaran con los H+ que se encuentran en el fagosoma para generar especies reactivas de oxígeno.

Todos estos eventos convierten el fagosoma en un ambiente hostil para el patógeno. Sin embargo diversos patógenos han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en este ambiente (Aderem *et al.* 1999; Flannagan *et al.* 2009), un ejemplo son los fagosomas micobacteriales, los cuales se caracterizan por tener una incompleta acidificación y por la ausencia de hidrolasas lisosomales maduras.

Se ha observado que LAM (lipoarabinomanana), componente de la pared micobacterial, inhibe la maduración fagosomal mediante dos procesos: inhibiendo el reclutamiento de Ca^{+2} dependiente de calmodulina que normalmente acompaña la fagocitosis, y reclutando el fosfatidil inositol 3-cinasa dependiente de Rab5 (proteínas de unión a GTP) al fagosoma micobacterial, teniendo como resultado la inhibición del reclutamiento de organelos

fagosomales necesarios para la liberación de V_0H+ ATPasa y de hidrolasas lisosomales (Fratti *et al.* 2003; Vergne *et al.* 2003).

1.4.2.3.2 Generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

Dentro de los fagosomas (Figura 5), el macrófago cuenta con mecanismos dependientes de oxígeno para la eliminación de los patógenos. Uno de estos mecanismos es la generación ROS (estallido respiratorio), la célula huésped consume oxígeno vía transferencia de electrones desde el NADPH citosólico al oxígeno molecular liberando O_2^- dentro del lumen fagosomal, que puede dismutarse a H_2O_2 la cual puede en turno reaccionar con el O_2 para generar OH- y oxígeno singulete (Minakami *et al.* 2006). Colectivamente estos ROS altamente tóxicos pueden matar a los microorganismos intrafagosomales (Flannagan *et al.* 2009).

Similarmente a ROS existe las RNS que tienen importantes efectos antimicrobiales. Mediante la actividad de la óxido nítrico sintasa la isoforma más relevante en los macrófagos, que funciona como un dímero ya que una subunidad transfiere electrones del NADPH al FAD, después del FMN (flavin mononucleotido) al hierro del grupo hemo de la subunidad subadyacente, para producir óxido nítrico y citrulina a partir de L-arginina y oxígeno. El óxido nítrico es sintetizado en la cara del citoplasma del fagosoma pero tiene la capacidad de difundirse a través de la membrana hasta llegar a su objetivo. Ya dentro del fagosoma, donde se encuentran las especies reactivas de oxígeno, el óxido nítrico puede sufrir conversiones a un rango de especies reactivas de nitrógeno como, dióxido de nitrógeno (N_2O_3), peroxinitritos ($ONOO^-$) y nitroxilos (HNO).

Las ROS y RNS sinergizan para ejercer efectos tóxicos a los patógenos intrafagosomales, ya que ineractúan con tioles, centros metálicos, residuos de tirosina, ácidos nucleicos y proteínas, lo que resulta en proteínas inactivadas y lípidos con daño oxidativo, además, el material genético del patógeno sufre daños irreparables (Flannagan *et al.* 2009).

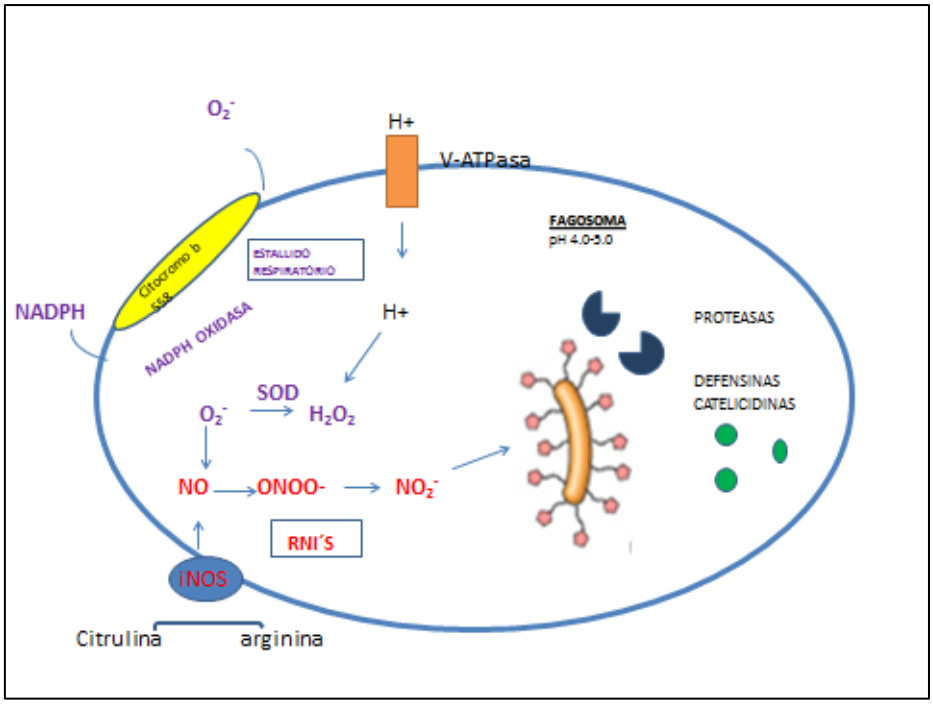


Figura 5. Mecanismos bactericidas del macrófago. Dentro del fagosoma el macrófago cuenta con mecanismo para la eliminación de patógenos. Estos mecanismos pueden ser dependientes de oxígeno tales como la generación de especies reactivas de ROS y RNS, y mecanismo independientes de oxígeno como péptidos antimicrobianos. Estos mecanismos junto con la acidificación del fagolisosoma llevan a la eliminación del patógeno. Fuente: adaptado de (Flannagan, Cosio et al. 2009).

1.4.3 Producción de citocinas y quimiocinas

El reconocimiento de patógenos por parte de los macrófagos guía a la producción de diversas citocinas y quimiocinas. Las citocinas proinflamatorias son proteínas de importancia en la resolución de infecciones micobacteriales, de estas se pueden mencionar pincipalmente TNF e IL-12.

TNF es una citocina clave para la formación del granuloma, en modelo murino se ha reportado que en ausencia de esta citocina hay un retardo en el reclutamiento de monocitos al tejido

infectado y una desregulación de la respuesta inflamatoria, lo que conlleva a la formación de lesiones necróticas y al descontrol del crecimiento bacterial (Saunders *et al.* 2007), también se ha reportado que una descontrolada producción de esta citocina puede causar una acumulación innecesaria de células llevando al daño del tejido (Kaufmann *et al.* 1996). Un importante papel de esta citocina es la inducción de la activación del macrófago (Orme *et al.* 1999) es decir, la producción de ROS, RNS y quimiocinas (Zuniga *et al.* 2012). En bovinos se ha mostrado que esta citocina es producida de manera temprana después de la estimulación de monocitos de vacas infectadas con *M. bovis* (Aldwell *et al.* 1996; Waters *et al.* 2001). En macrófagos bovinos tratados con anti-TNF, se observó que hay una prevención de las funciones bactericidas y la inducción de la apoptosis, la cual está ligada a la resistencia del macrófago a la replicación de *M. bovis* (Denis *et al.* 2005).

Otra citocina de importancia en el control de infecciones micobacteriales es IL-12. La producción de esta citocina es seguida por la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis,* y su importancia radica en que promueve el desarrollo de una respuesta Th1 por parte de los LT, induciendo la producción de IFN-γ (Zuniga *et al.* 2012). En ratones deficientes de IL-12 se muestra que la infección es progresiva en pulmones, y hay una deficiente formación del granuloma (Cooper *et al.* 1997). En humanos la deficiencia en esta citocina incrementa la susceptibilidad a infecciones micobacteriales (Filipe-Santos *et al.* 2006). En nódulos linfáticos de bovinos infectados con *M. bovis* se ha observado una expresión constante de IL-12, sugiriendo que esta citocina contribuye al control de la infección (Widdison *et al.* 2006).

Las quimiocinas son una familia de pequeñas proteínas con un papel en la inmunidad y las reacciones inflamatorias. Sus funciones son inducir la migración de leucocitos, la angiogénesis, la producción de colágena y la proliferación de precursores quimiotácticos (Mantovani *et al.* 2004). Estudios han mostrado que la infección de macrófagos con micobacterias resulta en la expresión de quimiocinas. La proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) también conocida como CCL2, resulta crucial para el reclutamiento de células inflamatorias y su agregación para la formación de granulomas y la contención de la micobacteria (Arji *et al.* 2012). En ratones deficientes de CCR2 infectados con *M. tuberculosis* muestran una disminución en el reclutamiento de monocitos. Se ha reportado que la quimiocina CCL2 es de importancia en el reclutamiento de LT Th1 y Th2, y una elevación

en la producción de esta puede guiar a una polarización de LT hacia Th2, lo que conlleva al no control de la infección micobacteriana (Siveke *et al.* 1998). En bovinos no existe reporte de la participación de esta quimiocina.

1.4.4 Macrófagos en la resistencia a la TBB

El papel que juega el macrófago en la resistencia a infecciones con patógenos intracelulares ha sido evaluada en trabajos previos. En modelo murino se demostró que la resistencia o la susceptibilidad a infecciones intracelulares esta mediada por los macrófago bajo la influencia del gen *Nramp1*(Vidal *et al.* 1993). En bovinos existen estudios en los cuales muestran que el macrófago juega un papel importante en le resistencia a infecciones con bacterias intracelulares, entre ellas *B. abortus*, *Salmonella dublin*, *M. bovis* BCG (Qureshi *et al.* 1996) y *M. bovis* (cepa de campo) (Gutiérrez-Pabello 2003), lo que demuestra que el macrófago es una célula que juega un importante papel en la resistencia a la TB y a otras enfermedades causadas por bacterias intracelulares.

2. ANTECEDENTES

2.1 Resistencia a Tuberculosis Bovina

La resistencia natural a enfermedades bacterianas ha sido observada desde cientos de años atrás, el hecho de que las manifestaciones de las enfermedades no ocurrían en todos los miembros de una población que fueron expuestos al patógeno causaban gran interés. Sin embargo, las implicaciones genéticas de estas observaciones no fueron evaluadas. No fue hasta el redescubrimiento de los estudios desarrollados acerca de los principios genéticos por Gregor Mendel que en la década de 1920, animales experimentales fueron entrecruzados para el estudio de la resistencia natural a una variedad de enfermedades infecciosas como *Salmonella pullorum* en aves y *Brucella suis* en cerdos (Roberts *et al.* 1926), confirmando la genética en la resistencia a las enfermedades.

El término de resistencia natural fue definida en el año de 1958 como la capacidad heredable de un animal de evitar la presentación del proceso de enfermedad cuando ha sido expuesto al agente causal que la provoca, sin haber tenido previa exposición o haber sido inmunizado (Hutt 1958).

En hatos con alta prevalencia de tuberculosis se ha observado que existen animales que resisten a la infección natural con *M. bovis* o no desarrollan la enfermedad a pesar de la exposición prolongada a *M. bovis* por convivencia con animales enfermos (Ellwood *et al.* 1972), estos animales son capaces de montar una respuesta inmune eficaz contra *M. bovis* sin haber tenido previo contacto con la micobacteria, evitando desde el establecimiento de la infección, hasta el desarrollo de lesiones granulomatosas y posiblemente la transmisión (Barthel *et al.* 2000).

Un bovino naturalmente resistente a la TBB será aquel expuesto a *M. bovis* pero que no se infecta (PPD-). Sin embargo también se puede definir como ganado resistente a la TBB, aquel que de infectarse (PPD+) no desarrolla lesiones macroscópicas evidentes (latencia). No obstante, estos últimos también pueden coincidir con un proceso inicial de infección debido a que las lesiones son muy pequeñas a la vista, o resultados falsos positivos a la tuberculina, los cuales se deben de descartar con pruebas bacteriológicas (Corner 1994). De cualquier forma,

es necesario conocer el papel de la respuesta inmune para delimitar los grados de resistencia de otros estados de infección.

Las bases moleculares de la resistencia a la tuberculosis han sido estudiadas ampliamente, sin embargo, los resultados que se han obtenido en unas especies no aplican a las demás. En ratones se ha observado que la proteína Nramp1 (la cual funciona como un transportador de iones divalentes a través de la membrana fagosomal, deprivando a la bacteria de nutrientes), juega un importante papel en la resistencia a la TB (Frehel *et al.* 2002). En el ganado bovino está presente un ortólogo del Nramp1, pero en este modelo animal todavía no se ha logrado observar un papel de esta proteína en la resistencia a la TBB en condiciones naturales (Barthel *et al.* 2000).

El término de resistencia natural ya ha sido descrito en el bovino para diferentes enfermedades causadas por patógenos intracelulares. Existen estudios previos hechos en ganado bovino en los cuáles se ha observado que los macrófagos de las vacas resistentes a *B. abortus*, controlan mejor la replicación de otros patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG y *Salmonella dublin* en comparación a los macrófagos provenientes de las vacas susceptibles a *B. abortus* (Qureshi *et al.* 1996). En el caso de los macrófagos que controlan mejor la replicación de BCG (resistentes), también controlan mejor la replicación de una cepa de campo de *M. bovis* virulento en comparación a los macrófagos permisivos a BCG. No obstante, estos estudios se realizaron en bovinos provenientes de hatos libres de *M. bovis*, seleccionados en base a la infección *in vivo* con una cepa de *B. abortus* (Gutiérrez-Pabello 2003).

Por otro lado, el grado de susceptibilidad entre razas de ganado bovino también ha sido manifiesto. En un estudio realizado en Etiopía se observó que la prevalencia de TBB era mayor en vacas Holstein (*Bos taurus)* comparadas a las de especie cebú (*Bos indicus)*, y mayor a las de vacas entrecruzadas, además de que la severidad de la enfermedad era mayor en la raza europea (Ameni *et al.* 2007). Al comparar el perfil de citocinas de monocitos (precursores de macrófagos) retados con *M. bovis* entre vacas Holstein y cebú, se encontraron diferencias en la producción de IL-6, la cual se produjo en mayor cantidad en las vacas Holstein, poniendo de manifiesto las diferencias de funcionalidad entre macrófagos de animales con distintos grados de susceptibilidad (Vordermeier *et al.* 2012). En este sentido, se

ha demostrado previamente que un macrófago con bajo estallido respiratorio (producción de especies reactivas de oxígeno vía transferencia de electrones del NADPH), y con alta producción de interleucina (IL-10), potente citocina antiinflamatoria, favorece la replicación de *M. bovis* y suprime la respuesta inflamatoria eficaz de los macrófagos, que en conjunto promueven la progresión de la enfermedad (Buddle *et al.* 2005). Adicionalmente, también se ha demostrado que un macrófago que produce RNS y ROS a partir del estallido respiratorio, y que produce mayores niveles de IL-12, citocina proinflamatoria y moduladora de la respuesta inmune hacia Th1, favorece el control de *M. bovis* (Welsh *et al.* 2005; Esquivel-Solis *et al.* 2013). Sin embargo, aún se desconoce si estas respuestas representan el fenotipo de resistencia a la TBB en condiciones naturales de infección. Por lo que se puede suponer que las respuestas eficaces del macrófago contra la infección de *M. bovis*, es decir los que controlan mejor su replicación, están basadas en el estallido respiratorio y la producción de ON_x y que además la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF y la IL -12, ayudarían a establecer el control de la infección *in vivo*. Por lo tanto, es posible que exista un fenotipo bactericida y proinflamatorio en los macrófagos de bovinos sanos expuestos a *M. bovis* (resistentes a la tuberculosis) versus un perfil permisivo y antiinflamatorio en los macrófagos de bovinos con la infección (susceptibles a la tuberculosis).

3. JUSTIFICACIÓN

Existen evidencias previas de las diferencias funcionales (microbicida e inflamatoria) entre macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles a la TB. Sin embargo, estas no han sido estudiadas en condiciones naturales de infección, donde no se controlan las condiciones (inóculo, cepa, tiempo de infección, exposición, etc.) para que un bovino se infecte (PPD+) o permanezca sin infectarse (PPD -) a pesar de estas condiciones. Debido a que en ocasiones lo demostrado *in vitro* o en estudios experimentales controlados no se cumple en condiciones *in vivo* o naturales es necesario validarlo. Este estudio, es en parte una validación de lo demostrado en el laboratorio, que ayudará a describir los mecanismos de la respuesta inmune relacionados con la resistencia a la TBB, que posteriormente permita identificar los genes involucrados y la selección de los animales con este perfil de resistencia.

4. HIPÓTESIS

Los macrófagos de bovinos expuestos a *Mycobacterium bovis* y no infectados, controlan mejor el crecimiento de la micobacteria, ya que producen mayor cantidad de radicales de oxígeno, óxido nítrico, y presentan una mayor expresión de los genes *TNF-a*, *iNOS* y *CCL2* que los macrófagos de bovinos enfermos de tuberculosis.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Describir el papel de las respuestas bactericida e inflamatoria del macrófago en animales expuestos sanos (PPD-) y sus convivientes enfermos de tuberculosis (PPD+).

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el control de la replicación intracelular de *M. bovis* BCG en macrófagos de bovinos sanos expuestos y enfermos de tuberculosis.
2. Evaluar el estallido respiratorio en la infección con *M. bovis* BCG en los macrófagos de bovinos sanos expuestos y enfermos de tuberculosis.
3. Analizar la producción de óxido nítrico en la infección con *M. bovis* BCG en macrófagos de bovinos sanos expuestos y enfermos de tuberculosis.
4. Definir la expresión de los genes *TNFα, iNOS y CCL2*, en la infección con *M. bovis* BCG en macrófagos de bovinos sanos expuestos y enfermos de tuberculosis.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Animales

Al inicio del estudio se propuso evaluar 24 vacas, 16 vacas infectadas (PPD+) y 8 vacas sin infección (PPD-). En total se sangraron 25 vacas, de las cuales al final solo se tuvo resultados de 3 vacas infectadas (PPD+) y 3 vacas sin infección (PPD-), esto debido a resultados incompletos, sin replicas, y a diversos problemas técnicos. Todas las vacas fueron procedentes del mismo establo, con historia de infección crónica (mayor a 5 años) de *M. bovis* con prevalencia mayor al 20%. Los animales fueron vacas lecheras Holstein-Friesan no gestantes de más de dos partos y menores a 8 años de edad. Los animales se seleccionaron en base a la respuesta al PPD caudal en dos aplicaciones intradérmica de acuerdo a la NOM035 de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina. El número propuesto de vacas contempla la comparación pertinente de la resistencia bajo las condiciones naturales de infección en los hatos lecheros de Jalisco, tomada con base a estudios previos en ganado sin lesiones de establos con TBB en el estado de Jalisco (Barthel *et al.* 2000; Feinstein 2002) y considera la heterogeneidad genética (no emparentadas).

5.1.1 Criterios de inclusión

Como se muestra en la Tabla 1 las vacas tuvieron más de 2 partos para asegurarnos de que son vacas adultas en edad reproductiva, donde ocurre en mayor frecuencia la aparición de lesiones de TBB debido a la exposición desde el nacimiento.

Fueron menores de 8 años de edad ya que a esta edad son consideradas viejas, y así se evita el sesgo por una posible respuesta inmunológica no competente por edad.

Los animales de estudio no fueron gestantes para evitar el sesgo por una posible influencia de las hormonas sexuales sobreexpresadas durante la gestación.

Además, todas las vacas eran nacidas en la explotación para poder así asegurar que han sido sometidas a las mismas condiciones de vida desde el nacimiento.

Los criterios anteriormente descritos son para ambos grupos de estudio, animales sanos y expuestos a la TB (PPD-) y animales enfermos de TB (PPD+). El criterio de inclusión por grupos de estudio es el resultado a la prueba de la tuberculina (PPD), la prueba utilizada por la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina, el grupo de vacas sanas y expuestas deberán ser negativos a la prueba de la tuberculina, mientras el grupo de las vacas enfermas deberá dar una respuesta positiva a esta prueba.

5.1.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión utilizados son los siguientes (Tabla 1); la presencia de lesiones *post mortem* para el grupo de los animales sanos y expuestos, ya que evidenciaría un resultado falso negativo en la prueba de la tuberculina, lo cual no aseguraría que el animal esté libre de la infección con *M. bovis*. La no presencia de lesiones en los animales del grupo de enfermos, evidenciaría una respuesta falsa positiva a la prueba de la tuberculina, ya que la presencia de lesiones es un signo característico de la TBB. El otro criterio establecido es el resultado de cultivo. Un cultivo positivo en nuestro grupo de animales sanos y expuestos, y un cultivo negativo en nuestro grupo de animales enfermos serán de exclusión en ambos grupos, respectivamente. Hasta la fecha de la escritura de esta tesis, solo se cuentan con los datos *post mortem* de una de las vacas, se está en la espera de los otros resultados.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión

	ANIMALES SANOS Y EXPUESTOS A TB	***ANIMALES ENFERMOS DE TB***
CRITERIOS DE INCLUSIÓN		
MAS DE 2 PARTOS	+	+
MENOR 8 AÑOS DE EDAD	+	+
NO GESTANTE	+	+
NACIDAS EN LA EXPLOTACIÓN	+	+
PPD (DOBLE PRUEBA CON UN MES DE INTERVALO AL MENOR)	NEGATIVO	POSITIVO
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN		
LESIONES	POSITIVO	NEGATIVO
CULTIVO	POSITIVO	NEGATIVO

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de macrófagos a partir de PBMC bovino

Se obtuvo la sangre con anticoagulante ácido cítrico dextrosa o heparina de litio. Se colocó la sangre en tubos Falcon estériles de 50 ml y se centrifugó durante 10 minutos a una fuerza de 1200 g, con el freno de la centrífuga desactivado. Una vez centrifugado, con ayuda de una pipeta de transferencia estéril se retiró el paquete celular y se colocó dentro de otro tubo Falcon de 50 ml estéril, y se colocó en la misma proporción solución PBS 1X estéril, se homogenizó la mezcla con ayuda de una pipeta serológica. Con ayuda de una jeringa estéril se colocó Ficoll Paque 1.077 (Ge Healthcare) en un tubo Falcon de 50 ml estéril, enseguida, se colocó de manera cuidadosa, por las paredes del tubo, el resuspendido celular anterior, formando un gradiente, la relación del homogenizado- Ficoll fue de 2:1, se centrifugó a 1200 g por 20 minutos. Una vez centrifugado, se retiró la capa de células blancas formada con la ayuda de una pipeta de transferencia estéril, teniendo cuidado de tomar la menor cantidad posible de células rojas, se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml estéril, y se lavaron colocando en el tubo solución PBS 1X estéril hasta llenar, se centrifugó a 800 g por 10 minutos, se decantó el PBS y se repitió el procedimiento de lavado por dos ocasiones más para eliminar la mayor cantidad de células contaminantes. A la pastilla obtenida de células blancas, se colocó 5 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con 4% de FBS, se homogenizó lentamente. Se transfirió este homogenizado a un matraz de teflón y se colocó 5 ml más de medio de cultivo. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 y se cultivó durante 24h, se retiraron las células no adherentes y se adicionó más medio de cultivo. Se realizó el lavado y se cambió de medio de las células cada tercer día o cuando fue necesario con medio RPMI suplementado con 10% de FBS. Se dejó en cultivo de 5 a 7 días hasta su diferenciación a macrófagos.

7.2 Preparación del inóculo de **M. bovis** *BCG*

M. bovis BCG cepa Pasteur, fue crecido en medio Middlebrook 7H11 agar (Bacto, Difco Laboratories, Detroit MI, EUA) enriquecido con 10% de OADC (*Oleic acid- Albumin-*

Dextrose-Catalase) (BBL Middlebrook OADC Enrichment, Becton Dickinson, Sparks MD, EUA). Se obtuvieron 10 colonias uniformes de 21 días y se sembraron en 30 mL de medio Middlebrook 7H9 (BBL Middlebrook 7H9 Broth Base, Becton Dickinson, Cockeysville MD, EUA) con 10% de OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma, St Louis MO, EUA) en tubos de polipropileno de 50 mL. Se incubaron por 8 días a 37°C con agitación constante de 100 revoluciones por minuto (rpm) en un agitador orbital (Back to basics Orbital Shaker, Bellco Biotechnology, Vineland NJ, EUA). Se transfirieron los 30 mL del cultivo a 270 mL de medio Middlebrook 7H9 con 10% OADC, en un recipiente de poliestireno de 600 mL de capacidad y se mantuvo bajo las condiciones de cultivo antes descritas. Se centrifugó todo el cultivo en tubos de polipropileno de 50 mL durante 20 min a 2500 X *g* a TA. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se lavó en medio CRPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, N.Y., EUA). Se centrifugaron a 2500 X *g* durante 10 minutos a TA. Se realizó un segundo lavado y la pastilla se resuspendió en CRPMI 15 % de SFB. Se disgregaron las bacterias, pasando el cultivo dos veces a través de una aguja de calibre 29 G. Se homogeneizó perfectamente con agitación vigorosa (vórtex) (Mystral Mixer) y se tomaron alícuotas de 1 mL depositándose en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las alícuotas se mantuvieron por –80°C hasta su uso. La concentración de Unidades Formadoras Colonias (UFC) del inóculo, se determinó descongelando una alícuota en baño María a 37 °C por 60 min, escogida al azar. Una vez descongelada la alícuota, se prepararon tres series de diluciones decimales seriadas iniciando a partir de la 10^{-1} hasta la 10^{-5}, observando que los volúmenes fueran lo más exacto posibles. En cada paso se homogeneizó perfectamente con un vórtex. Se sembraron 100 µl de cada serie de dilución a partir de la 10^{-3} hasta la 10^{-5} en placas de agar Middlebrook 7H11, se incubaron por 18-21 días y se contaron las UFC. La concentración de UFC por mililitro, se obtuvo por la siguiente fórmula:

$$\frac{CP \times FD}{VolS} = UFC / ml$$

Dónde:

CP: colonias contadas por placa

FD: factor de multiplicación correspondiente al factor de dilución (pe. 10^5 corresponde a 10^{-5})

VolS: volumen sembrado en mililitros

7.3 Ensayo bactericida

Para este ensayo se contó con dos placas de 96 pozos, una para el tiempo 0h y otra para el tiempo de 24h. En cada pozo de las placas se colocaron 90µl de medio RPMI suplementado con 10% de FBS, se incubaron a 37°C y 5% de CO_2. Se hizo una suspensión de las células cosechadas de $1x10^6$ células /ml, de esta suspensión se tomaron 10µl y se colocaron en cada uno de los pozos designados para el ensayo, para tener una concentración final de $1x10^4$ células/pozo. Se observaron las placas al microscopio, para asegurarnos de que las células permanecen viables. Se incubaron las placas a 37°C y 5% de CO_2 para permitir la adherencia de los macrófagos a la superficie, una vez adheridos, se removió el sobrenadante de los pozos y se infectaron las células con una suspensión de 100 µl *M. bovis* BCG de $1x10^6$ UFC/ml de medio RPMI suplementado con 5% de glucosa, para tener un índice de infección de 10:1. Se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 4h. Se observar las placas al microscopio, se realizaron 3 lavados con PBS para retirar las bacterias que no fueron fagocitadas. A la placa de 24h se le colocó en cada pozo 200µl de CRPMI y se incubó a 37°C y 5% de CO_2 hasta cumplir 24h de incubación. A la placa de tiempo 0h, se lisaron las células colocando 100µl de Tritón 1% (SIGMA), se pipeteó repetidamente teniendo cuidado de solo tocar los bordes del pozo y no el fondo, se retiró el tritón y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5ml, se hicieron 3 repeticiones de este procedimiento de lisis. Los 300µl de Tritón que fueron recolectados se resuspendieron con 700 µl de PBS 1X estéril para tener una concentración de 10^{-1}. A partir de esta suspensión, se prepararon disoluciones seriadas de 10^{-2} y 10^{-3} en un volumen de 1ml de las cuales se tomaron un décimo (100µl) para sembrar en placas con agar Middlebrook 7H11 por triplicado. Se incubaron las placas a 37°C y 5% de CO_2 durante 21 días. Transcurrido el tiempo para la placa de 24h, se repitió el procedimiento realizado para la placa de tiempo 0h. Se contaron las UFC de las placas a los 21 días de incubación que contenían de 30 a 300 UFC y se calculó la cantidad de UFC por mililitro:

UFC/ml= Promedio de las colonias contadas x recíproco de dilución x 10 (décimo de mililitro sembrado)

Un resultado de porcentaje de sobrevivencia del 100% equivale a que el total de las bacterias fagocitadas por los macrófagos lograron sobrevivir a las 24h, es decir los macrófagos cumplieron con una función bacteriostática, evitando la replicación intracelular de *M. bovis*, pero no eliminándola. Un resultado menor al 100% equivale a que el macrófago cumplió con una función bactericida, es decir logró eliminar a la bacteria, y un resultado mayor al 100% nos dice que los macrófagos no cumplieron con su función bactericida, es decir la bacteria pudo replicarse dentro de él. En un estudio previo (Qureshi *et al.* 1996), establecieron un punto de corte, en el cual, los macrófagos bovinos que permiten un porcentaje de sobrevivencia bacteriana ≤65%, eran considerados como resistentes.

7.4 Cuantificación de nitritos. Ensayo de Griess

En una placa de 96 pozos se colocaron 50µl de una suspensión de $1x10^6$ células/ml en los pozos designados para el ensayo, para tener $5x10^4$ células/pozo y se agregaron 150 µl de medio RPMI suplementando con 10% de FBS. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 24h. Se retiró el sobrenadante y se hizo un lavado y cambio de medio. Se infectaron las células con $5x10^5$ UFC (MOI 10:1) en cada pozo. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 24h. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su uso. En una placa de 96 pozos se colocaron 50µl del sobrenadante por triplicado, enseguida se colocaron 50µl del reactivo de Griess (SIGMA) y se dejó la reacción en la oscuridad durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se leyeron las muestras en un lector de placa a 540nm. Se hizo el cálculo de la concentración de nitritos obtenidos a partir de una curva estándar de nitrito de sodio ($NaNO_2$).

7.5 Ensayo de reducción del azul de tetrazolio (NBT)

En una placa de 96 pozos se colocó 100µl de una suspensión de $5x10^5$ células/ml, en los pozos designados para el ensayo, para tener $5x10^4$ células/pozo. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 24h. Se retiró el sobrenadante y se hizo lavado y cambio de medio. Se infectaron las células con $5x10^5$ UFC de *M. bovis* BCG (MOI 10:1) o LPS (100ng/ml), se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 4h. Se retiró el sobrenadante y se colocaron 100 µl de una solución de NBT (1 mg/ml) en RPMI filtrada con membrana de 0.2µ (Mahida *et al.* 1989) en cada pozo. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 24h. Se centrifugó la placa a una fuerza de 500g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se observaron las células al microscopio. Se fijaron las células con metanol y se secaron al aire. Se añadieron 120µl de KOH 2M para solubilizar las membranas de las células. Se agregaron 140µl de DMSO y se agitaron por 10 minutos a temperatura ambiente, para disolver el azul de formazán. Se leyó en un lector de placas a una absorbancia de 620nm (Choi *et al.* 2006).

7.5.1 Preparación de la muestra y extracción de RNA

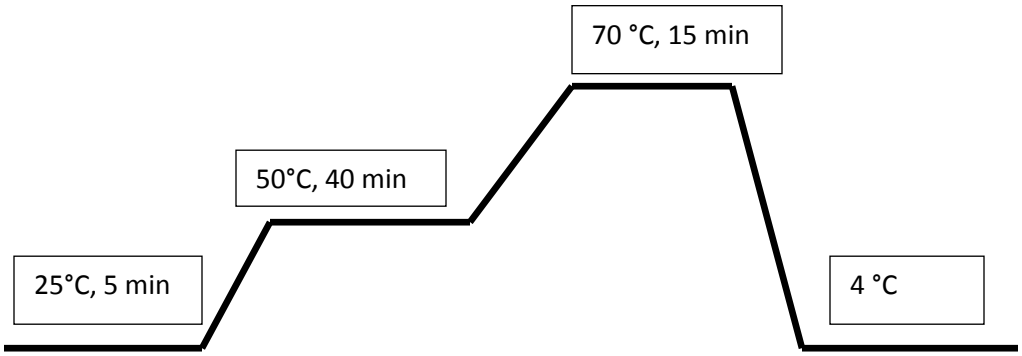
En una placa de 24 pozos se sembraron en cada pozo $5x10^5$ células por triplicado, se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 24h para permitir la adherencia de las células, una vez adheridos, se removió el sobrenadante de los pozos y se infectaron las células con 500 µl de una suspensión de *M. bovis* BCG de $5x10^6$ UFC en medio RPMI, para tener un índice de infección de 10:1. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 4h. Se observar las placas al microscopio, se removió el sobrenadante, y se realizaron 3 lavados con PBS. A la placa de 24h se le colocó en cada pozo 200µl de CRPMI y se incubó a 37°C y 5% de CO_2 hasta cumplir 24h de incubación. A la placa de 0h se prosiguió con la preparación de la muestra para la extracción de RNA.

Se removió el medio de cultivo de los pozos, se agregaron 200µl de Trizol y se lisaron las células directamente pipeteando en repetidas ocasiones. Se almacenó el homogenizado a -80°C hasta su uso (no más de un mes). Al momento de su uso, se incubó el homogenizado por

5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 40µl de cloroformo. Se agitó en vórtex por 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Se centrifugó la muestra a 12,000 x g por 18 minutos a 4°C. Se removió la fase acuosa de la muestra inclinando el tubo 45° y retirando la solución con ayuda de una pipeta. Se colocó la fase acuosa en un tubo nuevo y se incubó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó sobre una gasa. Se adicionaron 500 µl de etanol al 75% en agua, se vortexeo ligeramente y se centrifugó a 13000rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se decantó cuidadosamente y se dejó secar los tubos invertidos sobre una gasa. Se resuspendió en 20µl de agua grado biología molecular, se pipeteó repetidamente para homogenizar. Se determinó la concentración del RNA por absorbancia 260/280.

7.5.2 Síntesis de cDNA

En un tubo de microcentrífuga se agregó 1µl de random primers, 1µl de dNTPs, 3µl de agua y 8µl de RNA (200 ng). Se calentó en el termociclador a 65°C por 5 minutos. Se incubó en hielo durante 1 minuto. En el mismo tubo se agregaron 4µl de buffer 5x, 1µl de DTT, 1µ de RNA asa out y 1µl de la enzima retrotranscriptasa SuperScript lll (Life Technologies), para tener un volumen final de reacción de 20µl. Se incubó en el termociclador bajo las siguientes condiciones:



7.5.3 PCR tiempo real

La PCR tiempo real fue hecha para ver la expresión de los genes *TNF-α, iNOS, y CCL2* el gen endógeno utilizado fue *18s*, la secuencia de los primers utilizados se muestra en la tabla 2. Se siguió el protocolo de SyBR green (Roche) y el termociclador utilizado fue LightCycler 1.5 de Roche.

Tabla 2. Parámetros de la PCR tiempo real

MODO DE ANÁLISIS	CICLOS	SEG-MENTO	TEMPERATURA	TIEMPO DE MANTE-NIMIENTO	MODO DE ADQUISICIÓN
			PRE-INCUBACIÓN		
Ninguno	1		95°C	10 min	Ninguno
			AMPLIFICACIÓN		
Cuantifica-ción	45	Desnaturali-zación	95°C	10 seg	Ninguno
		Alinea-miento	60°C	10 seg	Ninguno
		Extensión	72°C	=amplicon [pb]/25seg	Sencillo
			CURVA DE DISOCIACIÓN		
Curvas de disociación	1	Desnaturali-zación	95°C	0 seg	Ninguno
		Alinea-miento	65°C	60 seg	Ninguno
		Extensión	95°C Rampa de velocidad=0.1°C/seg	0 seg	Continuo
			ENFRIAMIENTO		
Ninguno	1		40°C	30 seg	Ninguno

Tabla 3. Oligonucleótidoss de los genes utilizados para PCR tiempo real.

GEN	OLIGO SENTIDO (5´-3´)	OLIGO ANTISENTIDO (3´-5´)	PB
RNA 18s	CTGAGAAGACGGTCGAA CTTGACT	TCCGTTAATGATCCTTCCGC AGGT	60
CCL2	CGCTCAGCCAGATGCAA T TA	GCCTCTGCATGGAGATCTTC TT	76
TNF	GCTCCAGAAGTTGCTTGT GC	AACCAGAGGGCTGTTGATGG	149
INOS	GCTCCTTCAAAGAGGCA AA	CAGCTGGTAGGTTCCTGTTG T	89

8. RESULTADOS

Para la realización de los ensayos descritos en esta tesis se realizaron 2 inóculos de *M. bovis* BCG. Del primero se obtuvo una concentración de $25x10^6$ UFC/ml y del segundo la concentración fue de $29x\ 10^9$ UFC/ml. Las colonias fueron contadas haciendo diluciones seriadas sembradas en placas con agar Middlebrrok 7H10. En los agares se observó la presencia de colonias que muestran un aspecto rugoso, granular y de color blanquesino, lo que es característico de las colonias de *M. bovis* (Figura 6A). Se realizó una tinción de Ziehl Neelsen para comprobar la presencia de la micobacteria, en el microscopio se logró observar bacilos con una coloración rojiza, lo que confirma la presencia del bacilo de la TB (Figura 6B).

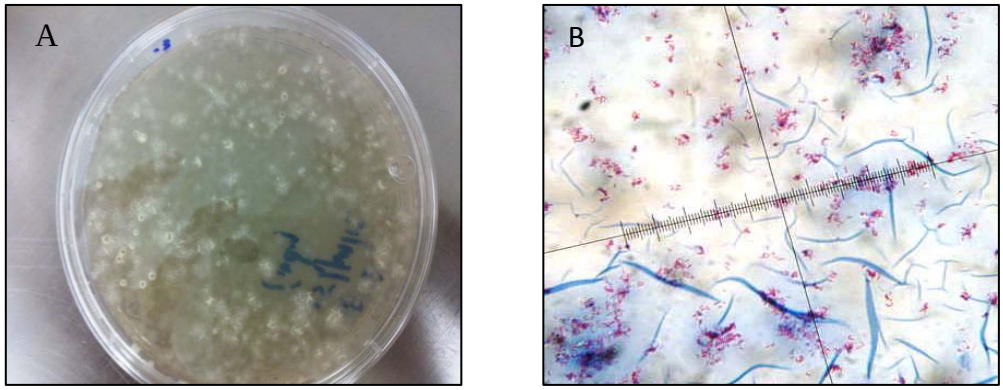


Figura 6. Inóculo de *M. bovis* BCG A) Cajas de agar Middlebrook 7H10 con colonias de *M. bovis* BCG, las colonias muestran un aspecto rugoso, granular y de color blanquesino. B) Tinción de Ziehl Neelsen al cultivo de *M. bovis* BCG, se observan los bacilos acortados de color rojo, morfología característica de *M. bovis* BCG.

Los macrófagos utilizados en los ensayos se obtuvieron en una densidad promedio de $2x10^6$ células por cada 100 ml de sangre procesada, con un porcentaje de viabilidad del 85%. En el microscopio se observaron células adheridas a la superficie, con formas ovoidales y algunas de ellas con prolongaciones (Figura 7).

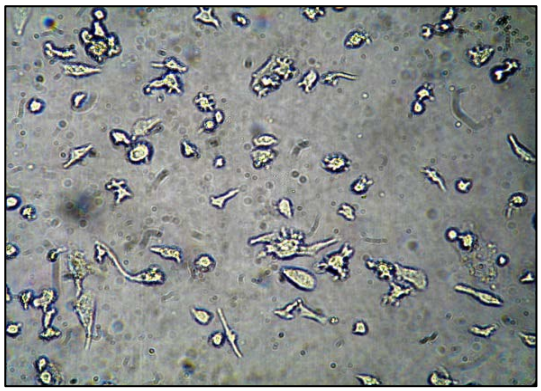


Figura 7. Cultivo de macrófagos. La imagen fue tomada desde el microscopio con un objetivo 40x y muestra un cultivo de macrófagos de 7 días.

Como ensayo de validación se realizó el ensayo de Griess. Los macrófagos obtenidos fueron estimulados con zymosan (10 partículas/célula) y LPS (10 y 100 ng/ml) para demostrar que los macrófagos eran activos y funcionales. Se observó que los macrófagos estimulados con LPS (100 ng/ml) respondían generando mayor cantidad de ON, en comparación con los otros estímulos. Los datos mostrados en la gráfica fueron normalizados con los datos obtenidos de macrófagos sin estímulo (Figura 8).

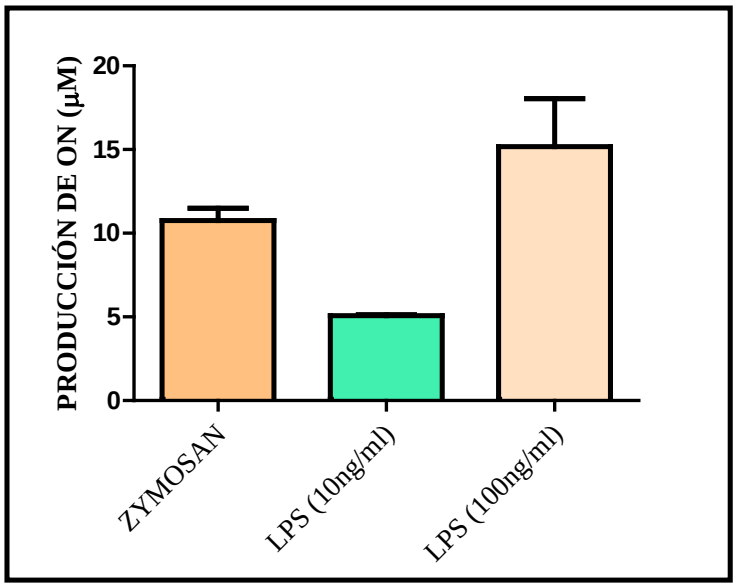


Figura 8. Producción de ON. Los datos mostrados fueron normalizados con los datos obtenidos con macrófagos sin estímulo.

8.1 Los macrófagos de bovinos PPD (-) controlan mejor la replicación micobacteriana que aquellos provenientes de bovinos PPD (+)

Los macrófagos provenientes de vacas expuestas PPD+ y PPD-, fueron retados con *M. bovis* BCG para ver si estos eran capaces de contener la replicación de la micobacteria.

Los resultados muestran (Figura 9), que los macrófagos de vacas PPD- controlaron mejor la replicación de la micobacteria (61%) que los provenientes de vacas PPD+ (228%).

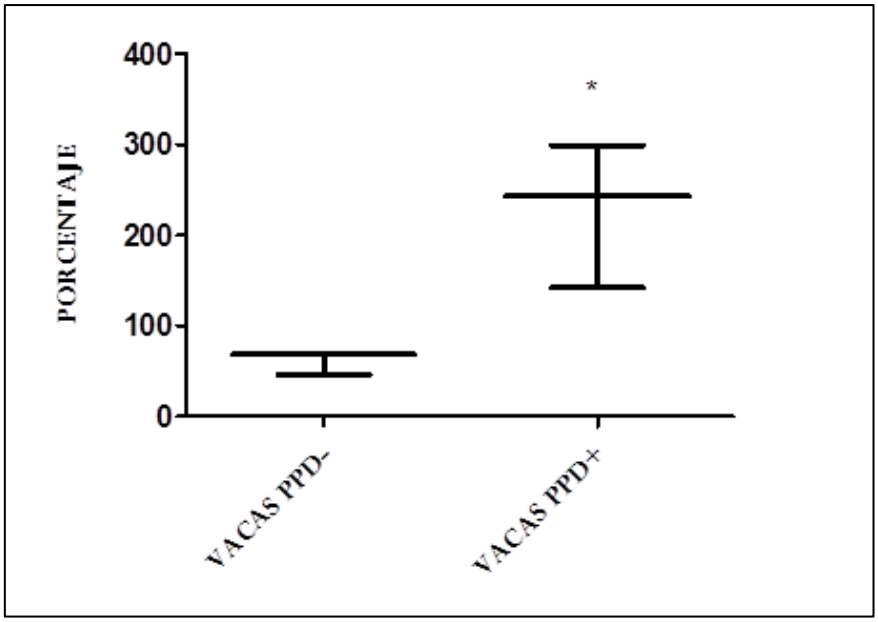


Figura 9. Porcentaje de sobrevivencia de *M. bovis* BCG en macrófagos de bovinos resistentes y susceptibles a la TBB. El porcentaje de sobrevivencia bacteriana fue significativamente diferente entre el grupo de vacas PPD+ y PPD-. $p<0.05$

8.2 los macrófagos de bovinos PPD (-) al ser infectados con M. bovis *BCG, generan mayor cantidad de ON que los provenientes de bovinos PPD (+)*

La generación de óxido nítrico es uno de los mecanismos bactericidas dependientes de oxígeno utilizados por el macrófago para eliminar a los patógenos dentro de su fagosoma. La medición de la concentración de este gas puede ser posible mediante la cuantificación indirecta de nitritos utilizando un método colorimétrico como es el ensayo de Griess.

Nuestros resultados muestran que los macrófagos provenientes de las vacas sanas y expuestas (PPD-) al ser infectados con *M. bovis* BCG durante 24h producen cantidades significativamente mayores de ON (117 µM) que aquellos que provienen de vacas enfermas (PPD+) (36 µM), lo que confirma que la generación de ON es clave para detener la replicación de *M. bovis* dentro del macrófago (Figura 10).

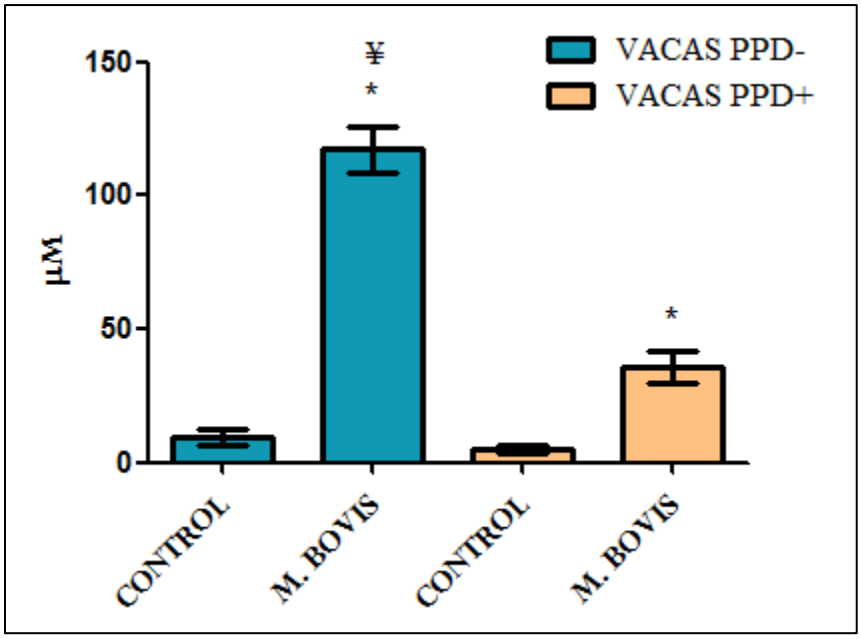


Figura 10. Producción de ON por macrófagos de vacas resistentes y susceptibles a TBB. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Mann Whitney *p<0.05 vs control, ¥p<0.05 entre grupos.

8.2 Los macrófagos de bovinos PPD (+) al ser infectados con M. bovis *BCG, generan mayor cantidad de ROS que los provenientes de bovinos PPD (-).*

Las especies reactivas de oxígeno generadas por los fagocitos juegan un papel importante en la defensa contra patógenos. El propósito de este ensayo fue evaluar si los macrófagos de vacas PPD- generaban mayores cantidades de radicales de oxígeno que aquellos provenientes de vacas PPD+, cuando eran infectadas con *M. bovis* BCG. Se utilizó un control positivo, LPS (100ng/ml), esto para demostrar que los resultados obtenidos se debían a la infección y no a un mal funcionamiento celular. Los resultados muestran que los macrófagos de bovinos PPD+ generan mayor cantidad de radicales de oxígeno que aquellos provenientes de vacas PPD- (Figura 11).

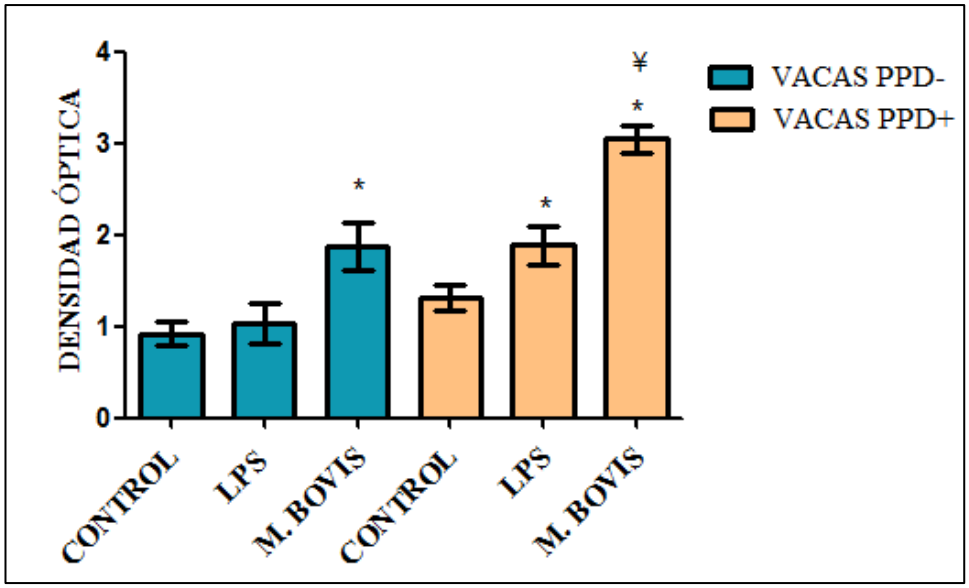


Figura 11. Producción de radicales de oxígeno en macrófagos de vacas resistentes y susceptibles a la TBB. Los estímulos fueron hechos con *M. bovis* BCG (MOI 10:1) y LPS (100 ng/ml). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Mann Whitney y muestran diferencia significativa. *$p<0.05$ versus control ¥$p<0.05$ entre grupos.

En la Figura 12 se muestran fotografías tomadas desde el microscopio, en el panel "A" se observan macrófagos sin estímulo, en el panel "B" se observan los macrófagos estimulados con LPS los cuales se pueden ver algunos aglomerados y con una tenue coloración azul, en el panel "C" se pueden observar que los macrófagos infectados con *M. bovis* responden formando una mayor cantidad de aglomerados y con una mayor intensidad de color azul.

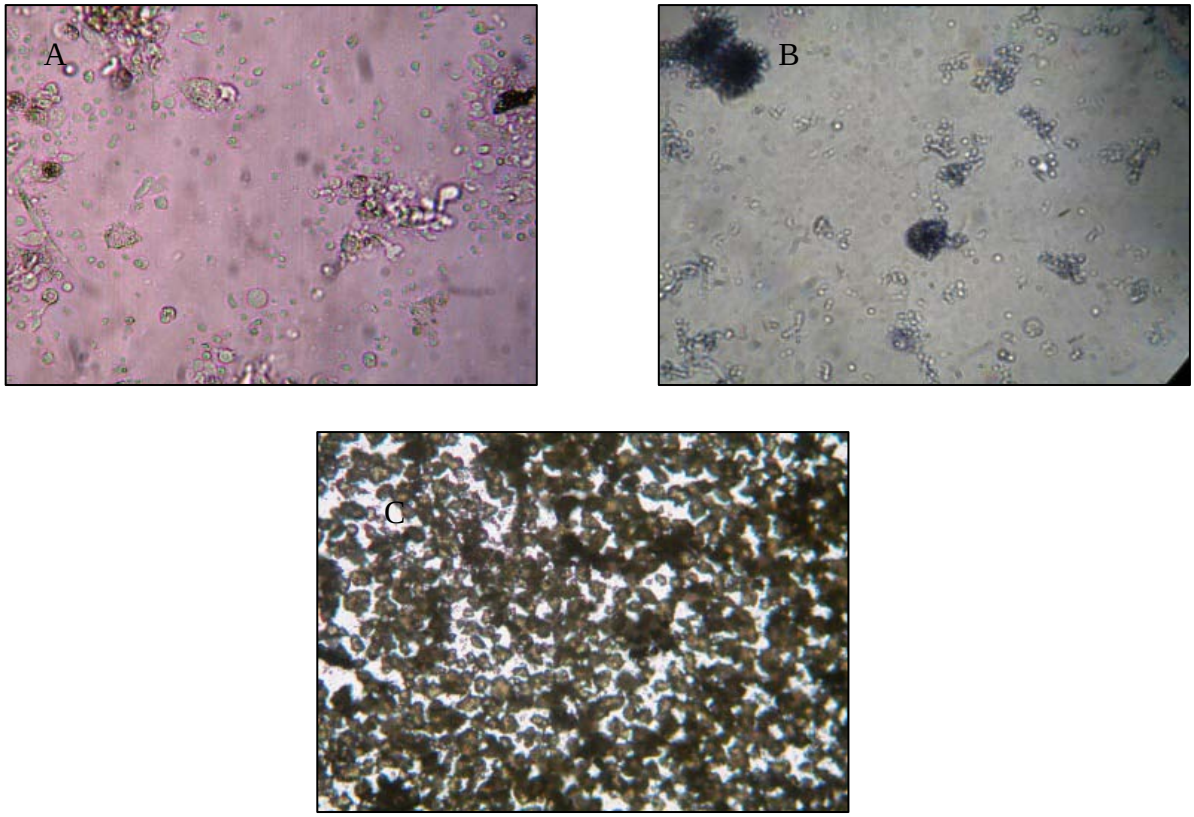


Figura 12. Ensayo NBT. A) Macrófagos sin estímulo, B) macrófagos estimulados con LPS (100ng/ml), C) macrófagos infectados con *M. bovis* BCG (MOI 10:1). Las imágenes fueron tomadas desde el microscopio con un objetivo de 20X.

8.4 Los macrófagos de bovinos PPD (-) al ser infectados con M. bovis BCG, expresan mayormente el gen **iNOS** *que los provenientes de bovinos PPD (+)*

Los datos obtenidos en este ensayo fueron normalizados utilizando el gen de referencia *18s*, y como calibrador se utilizaron los datos de macrófagos sin infección.

No se mostró diferencia en la expresión de los genes *TNF-α* y *CCL2* entre los macrófagos de vacas sanas expuestas y las enfermas de TB (Figura 13 y 14).

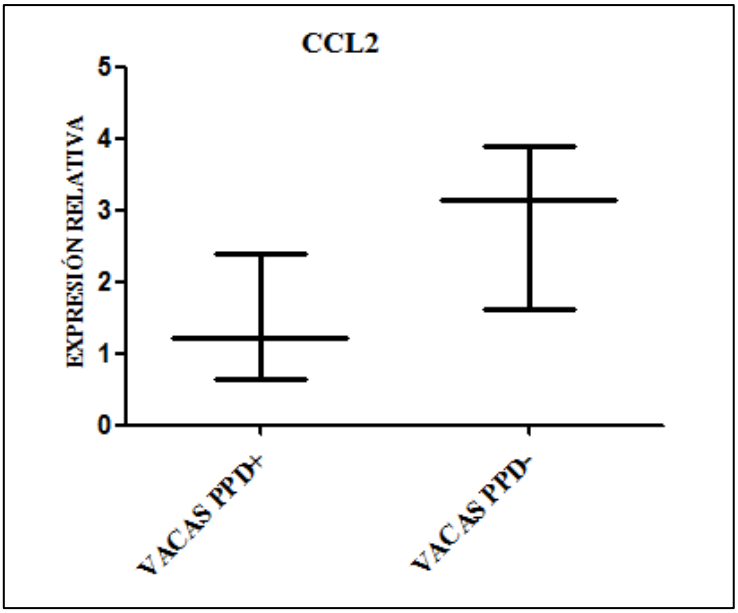


Figura 13. Expresión relativa del gen *CCL2*. Los datos fueron normalizados utilizando el gen de referencia 18s, y como calibrador se utilizaron los datos de macrófagos sin infección. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Mann Whitney y no muestran diferencia significativa.

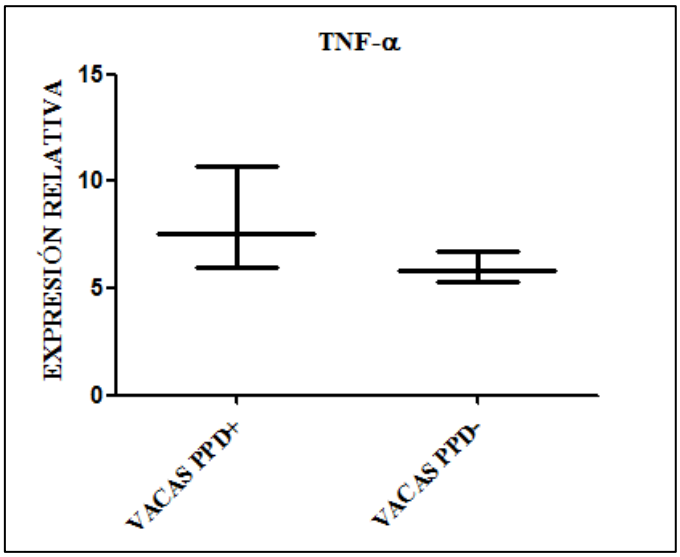


Figura 14. Expresión relativa del gen *TNF-α*. Los datos fueron normalizados utilizando el gen de referencia 18s, y como calibrador se utilizaron los datos de macrófagos sin infección.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Mann Whitney y no muestran diferencia significativa.

Los macrófagos de vacas sanas expuestas mostraron mayor expresión del *iNOS*, de hasta una vez más, en comparación a los provenientes de vacas enfermas de TB (Figura 15), lo que se correlaciona con los resultados de producción de nitritos.

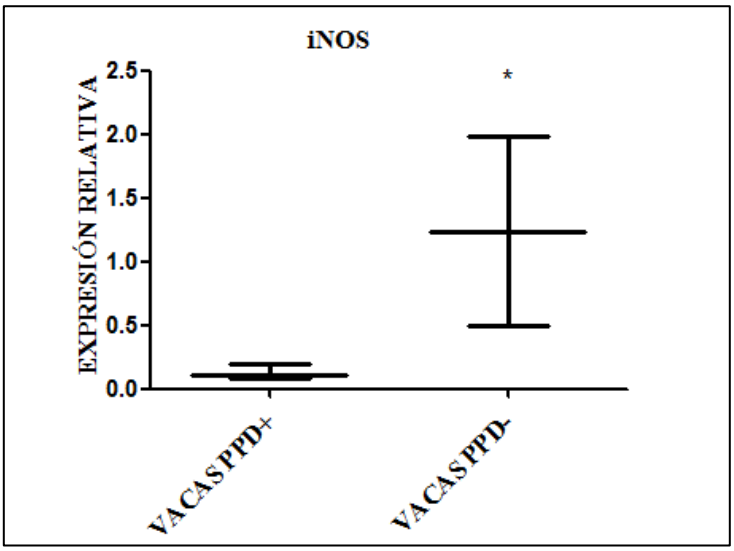


Figura 15. Expresión relativa del gen *iNOS*. Los datos fueron normalizados utilizando el gen de referencia 18s, y como calibrador se utilizaron los datos de macrófagos sin infección. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Mann Whitney y muestran diferencia significativa $p<0.05$.

9. DISCUSIÓN

Los macrófagos pueden jugar un papel dual en la infección con micobacterias, ya que son las células encargadas de eliminar al bacilo pero también constituyen el principal nicho para la sobrevivencia de estas. El papel que juega esta célula en la resistencia a la tuberculosis en condiciones de campo no había sido descrito. Existen estudios en los cuales evalúan las capacidades bactericidas de los macrófagos al ser infectados con micobacterias.

En este trabajo se utilizan macrófagos provenientes de vacas de hatos lecheros de Jalisco con una prevalencia alta de tuberculosis (> 40%), las cuales se clasificaron como animales sanos expuestos (PPD-) y animales enfermos de TB (PPD+), basados en la respuesta dada a la prueba de la tuberculina después de la exposición prolongada y la edad.

Se observa que aquellos macrófagos provenientes de vacas resistentes controlan mejor la replicación de la micobacteria que aquellos provenientes de vacas susceptibles (61% vs 228%). Este resultado concuerda con lo reportado por otros autores, en los que se observa que macrófagos de las vacas resistentes a *B. abortus*, controlan mejor la replicación de patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG y *Salmonella dublin* en comparación a los macrófagos provenientes de las vacas susceptibles (Qureshi *et al.* 1996). Además se ha demostrado que los macrófagos que controlan mejor la replicación de BCG (resistentes), también controlan mejor la replicación de una cepa de campo de *M. bovis* virulento en comparación a los macrófagos permisivos a BCG. No obstante, estos estudios se realizaron en bovinos provenientes de hatos libres de *M. bovis*, seleccionados en base a la infección *in vivo* con una cepa de *B. abortus* (Gutiérrez-Pabello 2003).

Un mecanismo bactericida utilizado por los macrófagos es la generación de ON, existen modelos *in vitro* e *in vivo* que asocian la producción de este gas y la eliminación de micobacterias. Estudios realizados en modelos murinos han mostrado que existe una relación entre la eliminación de *Mycobacterium tuberculosis* y la generación de especies reactivas de nitrógeno (Chan *et al.* 1992), además se ha reportado que los macrófagos de una cepa de ratones resistentes a *M. bovis* BCG, producen 3 veces mayor cantidad de ON que los de

ratones susceptibles a la bacteria, y observaron una correlación entre la actividad bacteriostática y la producción de ON (Barrera *et al.* 1994).

El papel que juega el ON en la infección con *M. tuberculosis* en humanos todavía no ha sido esclarecido. Algunos autores sugieren que los macrófagos humanos poseen un mecanismo antimicobacterial independiente de ON (Chan *et al.* 2001; Liu *et al.* 2008), sin embargo, existen otras publicaciones en los cuales muestran que los macrófagos humanos son capaces de generar ON, observando una correlación entre la generación de este y la inhibición del crecimiento intracelular del bacilo (Rich *et al.* 1997; Schon *et al.* 2004).

En ensayos hechos en vacas provenientes de hatos libres de TB clasificadas como resistentes y susceptibles basados en un ensayo bactericida con *M. bovis* BCG muestran que macrófagos de vacas R producen mayor cantidad de ON que los provenientes de vacas S (Esquivel-Solis *et al.* 2013), estos datos concuerdan con lo encontrado en este trabajo, en el cual se observa que los macrófagos de vacas R producen mayor cantidad de nitritos que aquellos macrófagos provenientes de vacas S (117µM vs 36 µM), lo que confirma que la generación de ON juega un papel importante en la actividad bactericida del macrófago hacia *M. bovis.*

Los fagocitos como los macrófagos y neutrófilos tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (anión superóxido y el peróxido de hidrógeno) como resultado de la interacción con patógenos. Existen reportes en modelos murinos en los que no se observa una relación entre la eliminación de la micobacteria con la formación de ROS (Chan *et al.* 1992). Trabajos en los cuales utilizan ratones transgénicos a los que deletan la subunidad $gp91^{phox}$ de la oxidasa fagocítica, (por lo cual estos ratones son incapaces de producir ROS), se observó que fueron capaces de inhibir el crecimiento de una cepa virulenta de *M. tuberculosis*, por lo cual aportan evidencias de que en este modelo animal los ROS no están involucrados en la eliminación de la micobacteria (Adams *et al.* 1997; Jung *et al.* 2002).

Datos contrarios son mostrados en humanos, ya que en una población de jóvenes chinos se encontraron mutaciones en el gen $gp91^{phox}$, por lo que los autores sugieren que el estallido respiratorio es esencial para el control de la tuberculosis (Lau *et al.* 1998).

En este trabajo se observa que macrófagos de vacas PPD+ producen mayor cantidad de radicales de oxígeno que los provenientes de vacas sanas expuestas PPD-, por lo que se

sugiere que la generación de ROS podría no estar involucrada en la eliminación de la micobacteria.

En este trabajo se midió el nivel de expresión de moléculas inflamatorias importante en la TBB como lo son el TNF-α y CCL2, así como la expresión de la enzima encargada de la generación de ON.

El papel que juega TNF-α en las infecciones micobacteriales ha sido estudiada en ratones, en los cuales se ha reportado que ratones deficientes TNF $^{(-/-)}$ infectados con estos bacilos presentan una retardada inducción de quimiocinas, fallando en la formación de granulomas, lo que resulta en una progresiva infección (Bean *et al.* 1999; Roach *et al.* 2002).

En humanos se ha mostrado que esta citocina juega un papel importante en la contención de la infección, ya que la neutralización de esta citocina lleva a la reactivación de la TB (Mohan *et al.* 2001). En un trabajo de metaanálisis realizado en China no se mostró una asociación entre el TNF (polimofismo -238G/A) y la susceptibilidad a la TB (Zhang *et al.* 2012)

Existe un estudio realizado en ganado bovino, en el cual los autores comparan el perfil de citocinas (en las cuales incluyen al TNF-α) entre dos razas, una que ha mostrado ser susceptible a la TB (Holstein) y otra resistente a esta misma enfermedad (Sahiwal cebú), ellos muestran que no existe una diferencia entre la producción de TNF-α entre ambas razas al menos en monocitos (Vordermeier *et al.* 2012), por lo cual el grado de susceptibilidad y resistencia no está mediada por esta citocina.

Este resultado concuerda con lo mostrado en este trabajo, en el cual se no muestran una diferencia significativa en la expresión del gen *TNF-α* en macrófagos provenientes de vacas sanas expuestas y enfermas de TB, con lo cual se podría corroborar que esta citocina no determina la resistencia a la TB.

CCL2 o también conocida como proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), es una quimiocina producida por los macrófagos durante la infección con *M. tuberculosis*, para la formación del granuloma, ya que recluye monocitos y linfocitos al sitio de infección.

En una población de Marruecos se ha mostrado una alta prevalencia del alelo homocigoto MCP-1 -2518G en pacientes sanos, por lo que se ha sugerido que esta quimiocina tiene un

papel protector en la TB (Arji *et al.* 2012). Se ha mostrado también una alta expresión en suero de esta quimiocina en pacientes con TB activa comparados a los de TB latente (Frahm *et al.* 2011).

En bovinos no existen reportes en los cuales evalúen la participación de CCL2 en la infección con *M. bovis.*

En este trabajo no se muestra una diferencia significativa entre la expresión de *CCL2* entre los grupos de estudio, lo que podría sugerir que esta quimiocina no juega un papel en la resistencia a la TBB.

Estudios hechos en ratones han mostrado que iNOS es importante para la eliminación de la micobacteria, en ratones iNOS $^{(-/-)}$ se ha mostrado que son incapaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis,* además presenta un aumento en el riesgo de diseminación y mortalidad, comparados con los ratones de tipo salvaje (Adams *et al.* 1997; Chan *et al.* 2001).

Existe estudios realizados en ganado bovino en los cuales muestra una elevada presencia de la enzima iNOS en nódulos linfáticos y granulomas de pulmón durante la infección con la micobacteria, (Pereira-Suarez *et al.* 2006). Un trabajo realizado en vacas clasificadas como resistentes o susceptibles a la TB mediante un ensayo bactericida contra *M. bovis*, también muestra que las vacas resistentes a la TB tienen mayor expresión de *iNOS*, así como de otras moléculas inflamatorias como TNF-α, IL-1B, MIP-1 y MIP-3 (Castillo-Velazquez *et al.* 2013; Esquivel-Solis *et al.* 2013).

En este trabajo se muestra que macrófagos de vascas sanas y expuestas a la TB presentan mayor expresión de *iNOS* que los provenientes de vacas enfermas, dato que concuerda con lo mostrado en la parte de producción de ON, lo que sugiere que la producción de ON mediante la actividad de *iNOS* son de importancia para la resistencia ante la TBB.

10. CONCLUSIONES

Los macrófagos de vacas sanas y expuestas a la TB (PPD-) controlan mejor la replicación de *M. bovis* BCG que aquellos provenientes de vacas enfermas (PPD+), además de que generan mayor cantidad de ON, lo que confirma que la generación de óxido nítrico es fundamental para el control de la infección con *M. bovis* BCG y la resistencia a la TBB. Por lo contrario los macrófagos de vacas enfermas producen mayor cantidad de radicales de oxígenos que aquellos provenientes de vacas sanas expuestas.

11. PERSPECTIVAS

La continuación de esta investigación permitirá el establecimiento de biomarcadores para la detección *ante mortem* de la TBB, será conveniente aumentar la población de estudio, así como evaluar la expresión de otros genes como el de las citocinas IL-10, IL-12, las cuáles no se pudieron llevar a cabo en este trabajo por problemas técnicos. Conocer el nivel de expresión de estos proporcionará información acerca de la polarización del macrófago (M1 o M2), la cual se conoce que es determinante para la resolución de la infección con micobacteria. Una vez determinados estos genes se podrían realizar ensayos genéticos que ayuden a la búsqueda de polimorfismos que permitan la selección *ante mortem* de vacas resistentes a la TBB. También sería conveniente complementar esta parte con pruebas ELISA para evaluar a nivel de proteínas de estas citocinas y otras proteínas como iNOS, realizar cinéticas para observar el comportamiento del macrófago ante *M. bovis* durante diferentes tiempo post infección también nos proporcionaría valiosa información.

El estudio de la fagocitosis de *M. bovis* por parte del macrófago probablemente ayudaría a entender el resultado de la infección. Se ha reportado que esta puede estar mediada por diferentes receptores de superficie, y que cada uno de estos receptores puede dar un resultado diferente en la infección con el bacilo. Se ha propuesto que la fagocitosis mediada por receptores Fc favorece el estallido respiratorio y una respuesta inflamatoria, la mediada por receptores C3 evita la activación del macrófago, y la fagocitosis mediada por receptores de manosa se ha sugerido que evita la fusión del fagosoma con los lisosomas. Realizar ensayos en los cuáles se bloqueen cada uno de estos receptores de entrada nos puede arrojar información del comportamiento del macrófago hacia *M. bovis*, realizando ensayos bactericidas con cada uno de los ensayos y haciendo correlaciones de lo ya encontrado en este trabajo, se podría observar si hay diferencias en estos mecanismos de entrada en macrófagos de vacas R o S.

También se podría complementar este trabajo con la evaluación de la capacidad de presentación de antígenos micobacteriales por parte de los macrófagos, con esta parte se podría cumplir con el estudio de las actividades que realiza el macrófago durante una infección; la capacidad bactericida (que ya se realizó en este trabajo) y la capacidad de presentación de antígenos. La realización de citometrías con el uso de anticuerpos contra

MHC-I y MHC-II, nos daría información acerca de ello, y probablemente nos ayudaría a entender lo que sucede en la infección natural.

12. BIBLIOGRAFÍA

Adams, L. B., M. C. Dinauer, et al. (1997). "Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to Mycobacterium tuberculosis using transgenic mice." Tubercle and Lung Disease **78**(5–6): 237-246.

Adams, L. B., M. C. Dinauer, et al. (1997). "Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to Mycobacterium tuberculosis using transgenic mice." Tuber Lung Dis **78**(5-6): 237-246.

Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.

Aldwell, F. E., D. N. Wedlock, et al. (1996). "Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with Mycobacterium bovis BCG or virulent M. bovis." Immunol Cell Biol **74**(1): 45-51.

Ameni, G., A. Aseffa, et al. (2007). "High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia." Clin Vaccine Immunol **14**(10): 1356-1361.

Arji, N., M. Busson, et al. (2012). "The MCP-1 (CCL2) -2518 GG genotype is associated with protection against pulmonary tuberculosis in Moroccan patients." J Infect Dev Ctries **6**(1): 73-78.

Barrera, L. F., I. Kramnik, et al. (1994). "Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN-gamma and infection with BCG." Immunology **82**(3): 457-464.

Barthel, R., J. A. Piedrahita, et al. (2000). "Pathologic findings and association of Mycobacterium bovis infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis." Am J Vet Res **61**(9): 1140-1144.

Bean, A. G., D. R. Roach, et al. (1999). "Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin." J Immunol **162**(6): 3504-3511.

Bloom, B. R. (1994). "Tuberculosis. Pathogenesis, protection, and control."

Brennan, P. J. (2003). "Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **83**(1-3): 91-97.

Buddle, B. M., D. N. Wedlock, et al. (2005). "Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis." Vet Immunol Immunopathol **108**(1-2): 45-51.

Cassidy, J. P., D. G. Bryson, et al. (2001). "Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions." J Comp Pathol **124**(1): 46-51.

Cassidy, J. P., D. G. Bryson, et al. (1998). "Early lesion formation in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis." J Comp Pathol **119**(1): 27-44.

Castillo-Velazquez, U., E. Aranday-Cortes, et al. (2011). "Alternative activation modifies macrophage resistance to Mycobacterium bovis." Vet Microbiol **151**(1-2): 51-59.

Castillo-Velazquez, U., R. Gomez-Flores, et al. (2013). "Differential responses of macrophages from bovines naturally resistant or susceptible to Mycobacterium bovis after classical and alternative activation." Vet Immunol Immunopathol **154**(1-2): 8-16.

Cooper, A. M., J. Magram, et al. (1997). "Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis." J Exp Med **186**(1): 39-45.

Corner, L. A. (1994). "Post mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle." Vet Microbiol **40**(1-2): 53-63.

Chan, E. D., J. Chan, et al. (2001). "What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis?Current knowledge." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(5): 606-612.

Chan, J., Y. Xing, et al. (1992). "Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages." J Exp Med **175**(4): 1111-1122.

Chatterjee, D. and K. H. Khoo (1998). "Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects." Glycobiology **8**(2): 113-120.

Choi, H. S., J. W. Kim, et al. (2006). "A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells." J Immunoassay Immunochem **27**(1): 31-44.

Denis, M., D. L. Keen, et al. (2007). "Bovine natural killer cells restrict the replication of Mycobacterium bovis in bovine macrophages and enhance IL-12 release by infected macrophages." Tuberculosis (Edinb) **87**(1): 53-62.

Denis, M., D. N. Wedlock, et al. (2005). "IFN-gamma enhances bovine macrophage responsiveness to Mycobacterium bovis: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis." Immunol Cell Biol **83**(6): 643-650.

Divangahi, M., S. Mostowy, et al. (2008). "NOD2-Deficient Mice Have Impaired Resistance to Mycobacterium tuberculosis Infection through Defective Innate and Adaptive Immunity." Journal of Immunology **181**(10): 7157-7165.

Ellwood, D. C. and F. G. Waddington (1972). "A second experiment to challenge the resistance to tuberculosis in B.C.G. vaccinated cattle in Malawi." Br Vet J **128**(12): 619-626.

Esquivel-Solis, H., A. J. Vallecillo, et al. (2013). "Nitric Oxide Not Apoptosis Mediates Differential Killing of Mycobacterium bovis in Bovine Macrophages." PLoS One **8**(5): e63464.

Feinstein, A. R. (2002). Principles of Medical Statistics.

Filipe-Santos, O., J. Bustamante, et al. (2006). "Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features." Semin Immunol **18**(6): 347-361.

Flannagan, R. S., G. Cosio, et al. (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies." Nat Rev Microbiol **7**(5): 355-366.

Fleischmann, R. D., D. Alland, et al. (2002). "Whole-genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains." J Bacteriol **184**(19): 5479-5490.

Frahm, M., N. D. Goswami, et al. (2011). "Discriminating between latent and active tuberculosis with multiple biomarker responses." Tuberculosis (Edinb) **91**(3): 250-256.

Fratti, R. A., J. Chua, et al. (2003). "Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5437-5442.

Frehel, C., F. Canonne-Hergaux, et al. (2002). "Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages." Cell Microbiol **4**(8): 541-556.

Garnier, T., K. Eiglmeier, et al. (2003). "The complete genome sequence of Mycobacterium bovis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7877-7882.

Gordon, S. (2007). "The macrophage: past, present and future." Eur J Immunol **37 Suppl 1**: S9-17.

Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.

Gutiérrez-Pabello, L. G. A. (2003). "Sobrevivencia de Mycobacterium bovis en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares." Veterinaria México **34**(3): 277-281.

Hope, J. C., M. L. Thom, et al. (2004). "Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria." Vet Immunol Immunopathol **100**(3-4): 187-195.

Hutt, F. B. (1958). "Genetic resistance to disease in domestic animals." New York: Comstock Publishing Associates.

Jung, Y. J., R. LaCourse, et al. (2002). "Virulent but not avirulent Mycobacterium tuberculosis can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide Synthase 2-independent defense in mice." J Exp Med **196**(7): 991-998.

Kaufmann, S. H. and G. Kaplan (1996). "Immunity to intracellular bacteria." Res Immunol **147**(8-9): 487-489.

Lau, Y. L., G. C. Chan, et al. (1998). "The role of phagocytic respiratory burst in host defense against Mycobacterium tuberculosis." Clin Infect Dis **26**(1): 226-227.

Liu, P. T. and R. L. Modlin (2008). "Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis." Curr Opin Immunol **20**(4): 371-376.

Mahida, Y. R., K. C. Wu, et al. (1989). "Respiratory burst activity of intestinal macrophages in normal and inflammatory bowel disease." Gut **30**(10): 1362-1370.

Majlessi, L., B. Combaluzier, et al. (2007). "Inhibition of phagosome maturation by mycobacteria does not interfere with presentation of mycobacterial antigens by MHC molecules." J Immunol **179**(3): 1825-1833.

Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.

Martinez, F. O., L. Helming, et al. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." Annu Rev Immunol **27**: 451-483.

Means, T. K., B. W. Jones, et al. (2001). "Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses." J Immunol **166**(6): 4074-4082.

Minakami, R. and H. Sumimotoa (2006). "Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family." Int J Hematol **84**(3): 193-198.

Mohan, V. P., C. A. Scanga, et al. (2001). "Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology." Infect Immun **69**(3): 1847-1855.

Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.

Nguyen, L. and J. Pieters (2005). "The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages." Trends Cell Biol **15**(5): 269-276.

Nigou, J., C. Zelle-Rieser, et al. (2001). "Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor." J Immunol **166**(12): 7477-7485.

Orme, I. M. and A. M. Cooper (1999). "Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis." Immunol Today **20**(7): 307-312.

Pereira-Suarez, A. L., C. Estrada-Chavez, et al. (2006). "Coexpression of NRAMP1, iNOS, and nitrotyrosine in bovine tuberculosis." Vet Pathol **43**(5): 709-717.

Pixley, F. J. (2012). "Macrophage Migration and Its Regulation by CSF-1." Int J Cell Biol **2012**: 501962.

Pollard, J. W. (2009). "Trophic macrophages in development and disease." Nat Rev Immunol **9**(4): 259-270.

Pollock, J. M. and S. D. Neill (2002). "Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle." Vet J **163**(2): 115-127.

Pollock, J. M., J. D. Rodgers, et al. (2006). "Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection." Vet Microbiol **112**(2-4): 141-150.

Qureshi, T., J. W. Templeton, et al. (1996). "Intracellular survival of Brucella abortus, Mycobacterium bovis BCG, Salmonella dublin, and Salmonella typhimurium in macrophages from cattle genetically resistant to Brucella abortus." Vet Immunol Immunopathol **50**(1-2): 55-65.

Rich, E. A., M. Torres, et al. (1997). "Mycobacterium tuberculosis (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB." Tuber Lung Dis **78**(5-6): 247-255.

Roach, D. R., A. G. Bean, et al. (2002). "TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection." J Immunol **168**(9): 4620-4627.

Roberts, E. and L. E. Card (1926). "The Inheritance of Resistance to Bacillary White Diarrhea." Poultry Science **6**(1): 18-23.

Russell, D. G. (2007). "Who puts the tubercle in tuberculosis?" Nat Rev Microbiol **5**(1): 39-47.

SAGARPA. (2012).

Saunders, B. M. and W. J. Britton (2007). "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis." Immunol Cell Biol **85**(2): 103-111.

Schon, T., G. Elmberger, et al. (2004). "Local production of nitric oxide in patients with tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **8**(9): 1134-1137.

Siveke, J. T. and A. Hamann (1998). "T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines." J Immunol **160**(2): 550-554.

Solinas, G., G. Germano, et al. (2009). "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation." J Leukoc Biol **86**(5): 1065-1073.

Stewart, G. R., B. D. Robertson, et al. (2003). "Tuberculosis: a problem with persistence." Nat Rev Microbiol **1**(2): 97-105.

Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, et al. (2005). "Macrophage receptors and immune recognition." Annu Rev Immunol **23**: 901-944.

Thoen, C., P. Lobue, et al. (2006). "The importance of Mycobacterium bovis as a zoonosis." Vet Microbiol **112**(2-4): 339-345.

Thomas J. Kindt, R. A. G., Bárba A. Osborne (2007). Inmunología de Kuby.

Ulrichs, T. and S. H. E. Kaufmann (2006). "New insights into the function of granulomas in human tuberculosis." Journal of Pathology **208**(2): 261-269.

Unanue, E. R. (1984). "Antigen-presenting function of the macrophage." Annu Rev Immunol **2**: 395-428.

van de Veerdonk, F. L., A. C. Teirlinck, et al. (2010). "Mycobacterium tuberculosis induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1." J Leukoc Biol **88**(2): 227-232.

Vergne, I., J. Chua, et al. (2003). "Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca2+/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade." J Exp Med **198**(4): 653-659.

Vergne, I., R. A. Fratti, et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion." Mol Biol Cell **15**(2): 751-760.

Vidal, S. M., D. Malo, et al. (1993). "Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg." Cell **73**(3): 469-485.

Vordermeier, M., G. Ameni, et al. (2012). "Cytokine responses of Holstein and Sahiwal zebu derived monocytes after mycobacterial infection." Trop Anim Health Prod **44**(3): 651-655.

Waters, W. R., B. J. Nonnecke, et al. (2001). "Modulation of Mycobacterium bovis-specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3)." Clin Diagn Lab Immunol **8**(6): 1204-1212.

Welsh, M. D., R. T. Cunningham, et al. (2005). "Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis." Immunology **114**(1): 101-111.

Widdison, S., L. J. Schreuder, et al. (2006). "Cytokine expression profiles of bovine lymph nodes: effects of Mycobacterium bovis infection and bacille Calmette-Guerin vaccination." Clin Exp Immunol **144**(2): 281-289.

Yoneda, T. and J. J. Ellner (1998). "CD4(+) T cell and natural killer cell-dependent killing of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes." Am J Respir Crit Care Med **158**(2): 395-403.

Zendejas-Martinez, H., A. Townsend Peterson, et al. (2008). "Coarse-scale spatial and ecological analysis of tuberculosis in cattle: an investigation in Jalisco, Mexico." Geospat Health **3**(1): 29-38.

Zhang, Z., H. Zhu, et al. (2012). "Association between tumor necrosis factor alpha-238G/a polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study." BMC Infect Dis **12**: 328.

Zuniga, J., D. Torres-Garcia, et al. (2012). "Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis." Clin Dev Immunol **2012**: 193923.

ANEXO I

Inicio
Bienvenida
Comite organizador
Programa
Indice
Autores
Trabajos libres
Paneles simultáneos
Conferencistas
B
Q
4to
A
Congreso Internacional
Biología, Química
y Agronomía
"Innovación para el Desarrollo Sustentable"
25, 26 y 27 de septiembre de 2013
Documento de Internet
ISBN 978-607-719-003-5
Comite Editorial:
José Luis Zavala Aguirre, Efrén Aguilar Garnica, Juan Villafaña Rojas,
Eduardo Sahagún Godinez.

Función diferencial bactericida e inflamatoria hacia *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino

Cindy García Gil*, Hugo Esquivel Solís+

Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco (CIATEJ)/ Avenida Normalistas 800, Colinas de La Normal, CP.44270, Guadalajara, Jalisco. / hugoesquivels@gmail.com.

* Autor que presentará trabajo.

+ Autor a quien la correspondencia deba ser enviada; Tel.: (52)-(33)-33455200 ext. 1674, Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica. Email: hugoesquivels@gmail.com

Área del Conocimiento: ***Biología molecular***

Resumen: La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium bovis* que aún prevalece en México principalmente en el ganado lechero. Una alternativa de apoyo para la erradicación de la TBB es la selección genética de animales con resistencia natural a la infección por la micobacteria. El objetivo es encontrar parámetros *ante mortem* que ayuden a esta selección, para generar programas de entrecruza y así aumentar la resistencia de la población hacia la TBB. Macrófagos provenientes de bovinos resistentes y susceptibles a la TBB fueron infectados con una cepa de *M. bovis* BCG, para evaluar la capacidad bactericida, la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y la expresión de los genes *TNF-α, CCL2* e *iNOS*. Se muestra que los macrófagos de bovinos resistentes a la TBB restringen más la replicación de *M. bovis* BCG y producen mayor cantidad de NO, lo cual sugiere que la generación de NO es clave para controlar la replicación de *M. bovis* BCG. Además, se observó aumento en la expresión del gen *iNOS* en este grupo de resistentes. Por lo contrario los macrófagos de vacas susceptibles produjeron mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno.

Palabras Clave: Tuberculosis bovina; óxido nítrico; resistencia; *iNOS*

Abstract: Bovine tuberculosis (BTB) is a disease caused by *Mycobacterium bovis* in Mexico still prevalent mainly in dairy cattle. A support alternative for the eradication of BTB is the genetic selection of animals with natural resistance to infection by mycobacteria. The aim is to find parameters that help *ante mortem* selection, to produce crosslinks programs and increase the resistance of the population to the TBB. Macrophages from resistant and susceptible bovines to the TBB were infected with a strain of *M. bovis* BCG to assess bactericidal activity, production of reactive oxygen species and nitrogen, and the expression of *TNF-α, CCL2* and *iNOS* genes. It was shown that macrophages from resistant bovines further restrict replication of *M. bovis* BCG and produce more NO, suggesting that NO generation is key to controlling the replication of *M. bovis* BCG. It was also observed an increase in the expression of *iNOS* gene. Conversely macrophages from susceptible cows produced more reactive oxygen species.