



## Supervivencia intracelular de cepas de *Mycobacterium bovis* de alta y baja frecuencia probado en un modelo de macrófagos bovinos



Alejandro Nava-Vargas <sup>a</sup>

Feliciano Milián-Suazo <sup>b</sup>

Germinal Jorge Cantó-Alarcón <sup>b</sup>

José A. Gutiérrez-Pabello <sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales, Doctorado en Ciencias Biológicas, Querétaro, México.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales, Querétaro, México.

<sup>c</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ciudad Universitaria, Av. Universidad #3000, Colonia, C.U., Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México.

\* Autor de correspondencia: [jagp@unam.mx](mailto:jagp@unam.mx)

### Resumen:

Causada por *Mycobacterium bovis*, la tuberculosis bovina es una enfermedad que afecta al ganado y a otras especies, incluidos los humanos. *M. bovis* reside principalmente en macrófagos, por lo que la supervivencia de los bacilos dentro de los macrófagos está relacionada con la virulencia. El aislamiento y la identificación de cepas son importantes para el control de las enfermedades causadas por *M. bovis*. Se sabe poco sobre la virulencia de las cepas de *M. bovis* circulantes en las poblaciones de ganado. En este estudio se comparó la supervivencia intracelular de cepas de *M. bovis* de genotipos que se encuentran en altas y bajas frecuencias en los bovinos en México. Se identificaron cuatro genotipos de alta frecuencia y cuatro de baja frecuencia a las cuales se sometieron a ensayos de supervivencia intracelular en macrófagos bovinos. La proporción de

fagocitosis fue de aproximadamente 63% para todas las cepas. No hubo diferencias entre los grupos de alta y baja frecuencia en cuanto al promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC) en fagocitosis y supervivencia. Sin embargo, el promedio de UFC de fagocitosis sí difirió de UFC de supervivencia en ambos grupos. El crecimiento intracelular fue diferente entre las cepas de baja y alta frecuencia, pero también entre las cepas de baja frecuencia. El promedio de crecimiento intracelular no fue diferente entre las cepas de alta y baja frecuencia. Estos resultados sugieren que la supervivencia intracelular y la virulencia de las cepas de *M. bovis* evaluadas no están relacionadas con la frecuencia de los genotipos en una población bovina.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*, Tuberculosis bovina, Macrófagos.

Recibido: 19/10/2019

Aceptado: 11/08/2020

## Introducción

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad bacteriana crónica causada por *Mycobacterium bovis*, bacteria obligada patógena intracelular y de crecimiento lento, que se caracteriza por producir granulomas en diferentes órganos, especialmente en los pulmones y los ganglios linfáticos de diferentes especies animales y de los humanos<sup>(1-4)</sup>. En el ganado bovino, la formación de granulomas (es decir, tubérculos) puede ocurrir en cualquier tejido corporal, aunque las lesiones son más frecuentes en los ganglios linfáticos [retrofaríngea medial (29.4 %), mediastínica (28.2 %), traqueobronquial (18.0 %), mesentérica (2.9 %), parótida (2.4 %) y caudal cervical (2.4 %)], y menos frecuentes en los pulmones (8.0 %)<sup>(5-9)</sup>. La enfermedad provoca una reducción de alrededor del 10 al 20 % en la producción de leche y carne, lo cual limita la venta de los animales infectados y sus productos. Por lo tanto, el control de la tuberculosis bovina es una prioridad de la industria ganadera nacional para asegurar el potencial productivo del ganado y permitir la exportación de sus derivados<sup>(10,11)</sup>.

Como en muchos países del mundo, México tiene un programa nacional de control y erradicación de la tuberculosis bovina. En bovinos de carne este programa ha reducido la prevalencia a <0.5 % en el 85 % del territorio nacional; sin embargo, en las áreas de ganado lechero el programa no ha logrado un control adecuado y la prevalencia es alta (~16 %)<sup>(12,13)</sup>.

El papel de la variabilidad genética bacteriana en el resultado de la infección con *M. bovis* sigue siendo incierto. Hasta principios de la década de 1990, cuando se introdujeron las huellas de ADN, se creía que el complejo *M. tuberculosis* era un grupo de bacterias

altamente conservadas genéticamente, con diferencias fenotípicas limitadas que influían en la patogénesis. Sin embargo, los datos epidemiológicos sugieren que las diferencias en la transmisibilidad y la virulencia entre cepas están relacionadas con sus genotipos<sup>(14-18)</sup>.

*Mycobacterium bovis* es un patógeno intracelular que reside principalmente en los macrófagos. Por lo tanto, se pueden utilizar modelos de macrófagos *in vitro* para determinar la supervivencia intracelular, que a su vez se asocia con la virulencia de las cepas de *M. bovis*. Por ejemplo, en un estudio se encontró que las cepas virulentas sobreviven más que las cepas avirulentas en macrófagos bovinos<sup>(19)</sup>. El modelo *in vitro* también ha sido validado para la evaluación de la patogenicidad o virulencia de micobacterias con genes inactivados o para la identificación de genes asociados con la virulencia<sup>(20)</sup>.

Algunos bovinos manifiestan una resistencia natural a la TBb. El criterio aplicado para clasificar un animal como resistente se basa en la capacidad de sus macrófagos para permitir el crecimiento de la cepa avirulenta de *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin) *in vitro*; cuando este crecimiento es superior al 65 % se considera el animal susceptible y cuando es inferior al 65 % se considera resistente<sup>(21)</sup>. En el mismo estudio se demostró que, en comparación con animales susceptibles, los macrófagos de animales resistentes controlaron mejor el crecimiento intracelular de los patógenos *B. abortus* y *Salmonella dublin*. Los macrófagos de animales resistentes y susceptibles difieren en su capacidad de controlar la multiplicación intracelular de *M. bovis*<sup>(19)</sup>. Por lo tanto, el uso de la evaluación *in vitro* de la supervivencia intracelular bacteriana en macrófagos de un donante resistente pueda proveer información sobre la virulencia bacteriana.

La genotipificación de *M. bovis* para el análisis filogenético se ha realizado mediante diferentes métodos: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); amplificación aleatoria de ADN polimórfico - reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR); espoligotipado; y unidades repetitivas micobacterianas intercaladas - número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR). Entre estos métodos se ha identificado gran diversidad de cepas, con genotipos de baja y alta frecuencia<sup>(22-24)</sup>.

El método aleatorio de RAPD-PCR proporciona resultados comparables a los del RFLP, pero evita el uso de materiales radiactivos peligrosos, es menos costoso y más fácil y rápido de realizar. Por ejemplo, mientras que RFLP puede requerir semanas para obtener resultados, RAPD-PCR se puede completar en <5 a 8 h. En comparación con PCR dirigida, RAPD-PCR no requiere el conocimiento de la secuencia constante para desarrollar cebadores. Los oligómeros monocatenarios de 10 nucleótidos de secuencia arbitraria se utilizan individualmente para realizar PCR<sup>(25)</sup>. Con el advenimiento de la epidemiología molecular se han desarrollado métodos más rápidos y confiables para el diagnóstico de TBb. Estos brindan información sobre la estructura genética que permita establecer las relaciones entre cepas. El método más popular para el genotipado de *M. bovis* es el espigotipado y ha resultado útil en un gran número de estudios con una amplia gama de objetivos y especies animales. En comparación con otros métodos, el

espoligotipado es fácil de realizar, requiere cantidades muy pequeñas de ADN, es robusto y altamente reproducible, y puede realizarse con muestras clínicas. Más aún, el espoligotipado es muy útil en cepas de *M. bovis* con algunas copias del elemento de inserción IS6110, como es el caso en cepas de ganado<sup>(22)</sup>. El MIRU-VNTR es una herramienta molecular basada en la amplificación por PCR de 41 loci diferentes de la secuencia de ADN de *Mycobacterium* que funcionan como marcadores moleculares. Este herramienta permita dar seguimiento rápido, objetivo y de alta resolución en brotes o emergencias epidemiológicas<sup>(23)</sup>.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo sobre la genotipificación de cepas de *M. bovis* de ganado de diferentes regiones de México se identificó la presencia de genotipos (espoligotipo y MIRU-VNTR) de alta y baja frecuencia<sup>(22,23,26)</sup>. Estos hallazgos llevaron a plantear las siguientes preguntas: ¿Son las cepas de baja frecuencia menos virulentas que las de alta frecuencia? Y si es así, ¿es esta la razón de la baja frecuencia de algunos espoligotipos en la población? El objetivo de este estudio fue comparar la supervivencia intracelular de cepas de *M. bovis* que tienen genotipos de alta o baja frecuencia en bovinos mexicanos usando un modelo de macrófagos procedente de ganado con una resistencia natural a esta bacteria.

## Material y métodos

Este proyecto se aprobó por el Comité de Bioética del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con el número de registro 47FCN2016.

### Caracterización molecular de cepas

Se utilizaron cepas de *M. bovis*, previamente caracterizadas genéticamente por espoligotipado y MIRU-VNTR<sup>(19,22)</sup>. Para los propósitos de este estudio, se seleccionaron cuatro cepas con un genotipo de alta frecuencia y cuatro con un genotipo de baja frecuencia de un conjunto de cepas obtenidas de bovinos en diferentes regiones de México (Cuadro 1). Primero se seleccionaron los espoligotipos de alta frecuencia y posteriormente se identificaron sus tipos de MIRU-VNTR más frecuentes.

**Cuadro 1:** Frecuencia de espoligotipo y VNTR-tipo de las cepas de *M. bovis* utilizadas en el estudio

Código SB	VNTR	Estado de origen	ID	Frecuencia	
SB0673	023404625334	Coahuila	777	155	
SB0971	433363325242	Aguascalientes	833	70	Alta
SB0669	002060703320	Estado de México	351	124	frecuencia
SB0140	242352524244	Hidalgo	559	71	
SB1495	403403625133	Coahuila	776	1	
SB1118	452300824234	Estado de México	694	1	Baja
SB0290	403363525142	Querétaro	301	1	frecuencia
SB0131	252252323224	Hidalgo	906	1	

### Preparación del inóculo

Las cepas experimentales de *M. bovis* se replicaron en medio Middlebrook 7H9 (BBL™, Middlebrook 7H9 Broth Base, Becton; Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EE. UU.) con enriquecimiento OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.). Se incubaron las cepas a 37 °C bajo agitación constante durante 12 días. Para el análisis, las bacterias se conservaron en alícuotas de 1 ml en medio RPMI (Medio RPMI 1640, Invitrogen™ Co., Grand Island, NY, EE. UU.), suplementado con 0.1 mM de aminoácidos esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 20 mM de bicarbonato de sodio NaHCO<sub>3</sub> (cRPMI), y 15% de suero bovino fetal (Gibco™ Invitrogen Co., Grand Island, NY, EE. UU.) a -70 °C. Para cada inóculo bacteriano, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante diluciones decuples en serie sembradas en placas de agar Middlebrook 7H10 (Bacto® Mycobacteria 7H11 Agar, Difco Laboratories, Detroit MI, EE.UU.) con enriquecimiento OADC (BBL™ Middlebrook OADC Enrichment, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE.UU.).

### Macrófagos derivados de monocitos bovinos (MDMB)

Con jeringas conteniendo solución ácido-citrato-dextrosa (ACD), se extrajo sangre venosa periférica de la vena yugular de un bovino sano previamente identificado como resistente<sup>(27)</sup>. Los macrófagos se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Las CMSP se aislaron mediante centrifugación en gradiente en una suspensión Histopaque -1077 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.). Los sedimentos celulares se lavaron y suspendieron en CRPMI. Las células se cultivaron en placas de ultrabaja adherencia (Corning® Costar®, EE. UU.) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 2

h, se eliminaron las células no adherentes y los monocitos adherentes se cultivaron en CRPMI más 12% de suero autólogo durante 12 días para permitir su diferenciación en macrófagos<sup>(28,29)</sup>.

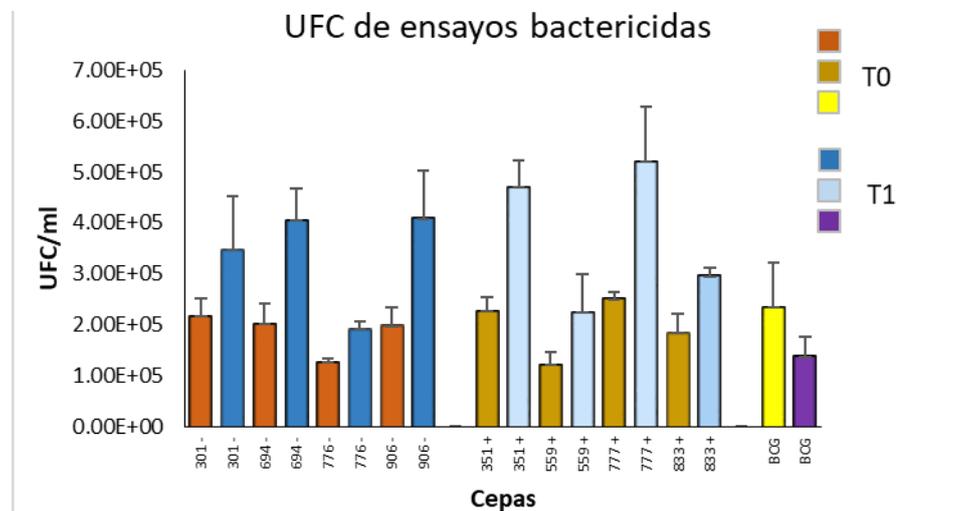
### **Ensayo microbici**

Los ensayos bactericidas se realizaron según un protocolo establecido<sup>(21)</sup>, con algunas modificaciones. Estos ensayos han sido útiles para la clasificación de fenotipos de ganado susceptible o resistente utilizando la cepa avirulenta *M. bovis* BCG y un punto de corte de 65 % de la replicación bacteriana. Se infectaron monocapas de macrófagos en cultivo celular en placas Terasaki con *M. bovis* con una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Posteriormente, se centrifugó a 200 xg durante 10 min y se incubó a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 4 h en atmósfera humidificada para permitir la fagocitosis. A continuación, las células se lavaron cinco veces con CRPMI reciente, más un 12% de suero autólogo para eliminar las bacterias extracelulares, y se incubaron de nuevo a 37 °C. Se consideró este momento del cultivo como tiempo 0 h. Las células se lisaron para su análisis a 0 y 24 h (tiempo 1) después de la infección. La fagocitosis bacteriana se calculó midiendo las diluciones en serie de bacterias intracelulares vivas liberadas de los macrófagos después del tratamiento con Tween 20 al 0.5%. El crecimiento bacteriano se calculó como la relación entre el número total de bacterias intracelulares al final y el número total de bacterias al comienzo del ensayo, expresado como una proporción. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones internas. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba no paramétrica de Friedman y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn con un nivel de significancia de 10 %, y la prueba t de Student para comparar los UFC con un nivel de significancia 5 %.

### **Resultados**

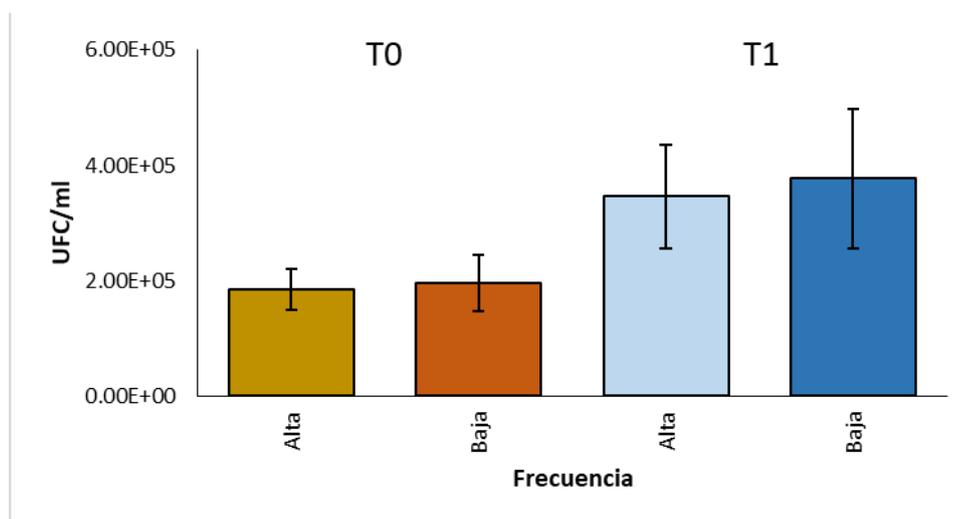
La proporción de fagocitosis fue de alrededor del 63 % para todas las cepas, lo que indica que los macrófagos fagocitaron un número similar de bacterias en cada cepa. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en los ensayos bactericidas que mostraron permisividad de los macrófagos para la replicación de cepas de campo con genotipos de baja frecuencia y mayor UFC/ml en el tiempo de supervivencia (tiempo 1). En la cepa BCG durante el tiempo 1, la cantidad de UFC disminuyó en comparación con el tiempo de fagocitosis (tiempo 0). El mismo escenario se observó con la cepa de genotipo de alta frecuencia en que la cantidad de UFC/ml fue mayor, mientras que en BCG, la cantidad de UFC/ml disminuyó (Figura 1).

**Figura 1:** Unidades formadoras de colonias (UFC) de cepas de *M. bovis* con genotipos de alta (+) y baja (-) frecuencia, cuantificadas a las 0 (T0) y 24 (T1) horas después de la infección de macrófagos de bovinos con un fenotipo resistente

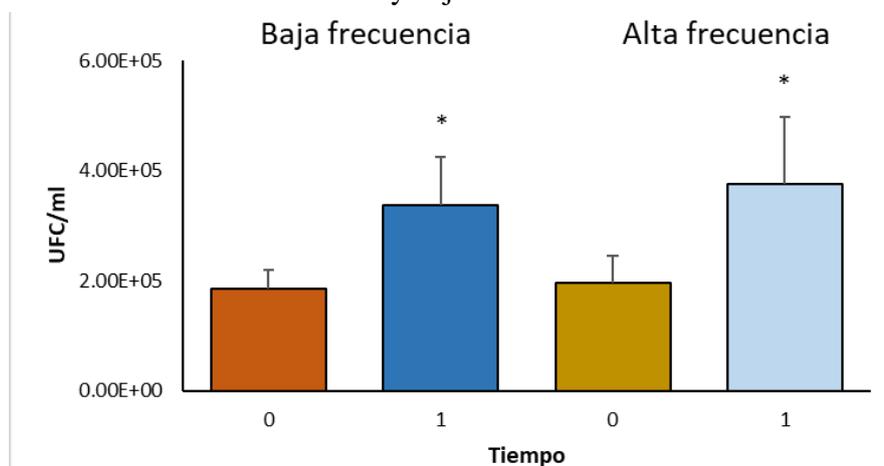


Se realizó una comparación del promedio de UFC por grupo utilizando la prueba t de Student. No se encontraron diferencias ( $P>0.05$ ) entre los grupos de alta y baja frecuencia ni en fagocitosis (T0) y ni en supervivencia (T1) (Figura 2). Dentro de cada grupo se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student pareada para comparar el promedio de UFC entre la fagocitosis y la supervivencia, en lo cual sí hubo diferencias ( $P<0.05$ ) (Figura 3).

**Figura 2:** Comparación de los promedios de UFC de cepas de alta y baja frecuencia en el tiempo 0 y en el tiempo 1



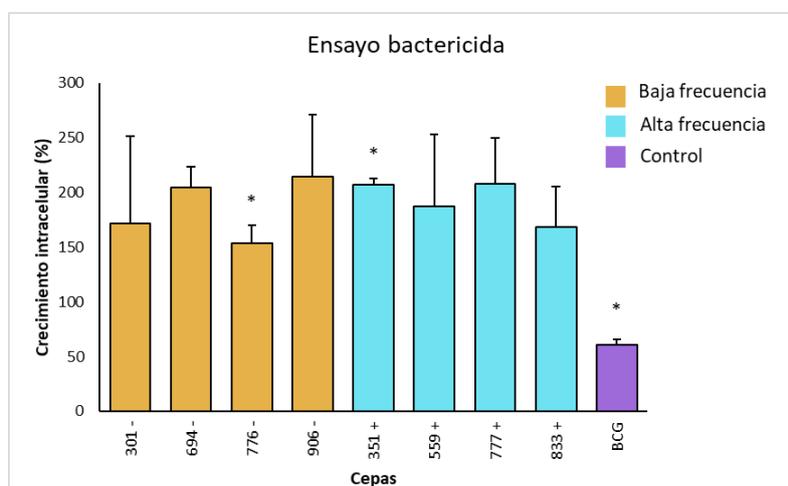
**Figura 3:** Comparación de los promedios de UFC en el tiempo 0 y el tiempo 1 en cepas de alta y baja frecuencia



El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student para datos apareados. Los asteriscos indican diferencia ( $P<0.05$ ) entre los tiempos.

En el ensayo de crecimiento intracelular en cepas del genotipo de baja frecuencia, la cepa 906 fue la que presentó la mayor supervivencia (214 %), mientras que la cepa 776 tuvo la más bajo (153 %). El crecimiento intracelular en la cepa 694 fue de (205 %) y el crecimiento en la 301 fue de (172 %) (Figura 4). En los grupos de alta frecuencia, la cepa 777 tuvo el mayor crecimiento (208 %), mientras que el menor correspondió a la 833 (169 %). El crecimiento en la 351 fue de 207 % y el crecimiento de la 559 fue de (187 %). La cepa control (BCG) mostró un crecimiento del 57 %, lo cual valida el ensayo porque confirma la resistencia del fenotipo bovino resistente.

**Figura 4:** Crecimiento intracelular de cepas de *M. bovis* de baja y alta frecuencia y *M. bovis* avirulento (BCG) en macrófagos de bovinos con fenotipo resistente

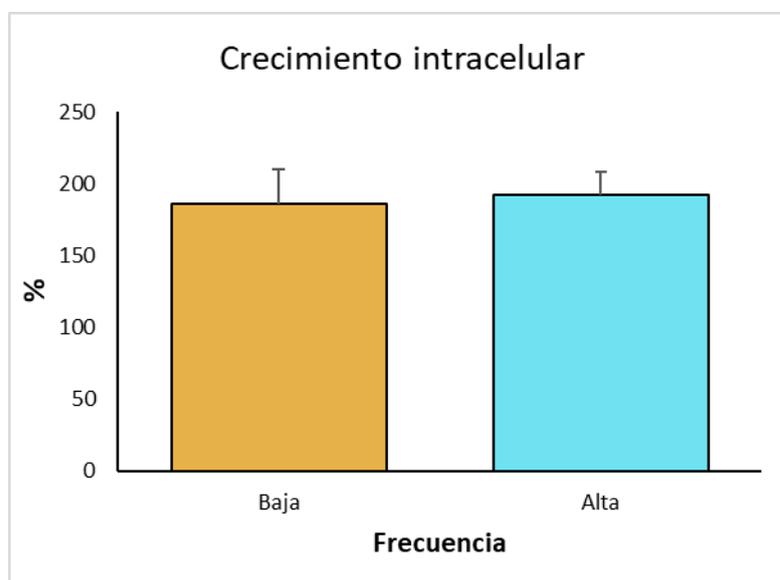


Los asteriscos indican diferencia ( $P<0.1$ ) según una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de

Dunn

En las comparaciones del crecimiento intracelular entre cepas individuales se observó una diferencia ( $P < 0.01$ ) entre la cepa de baja frecuencia 776 y la cepa de alta frecuencia 351. La cepa 776 (SB1495) se colectó de un bovino del estado de Coahuila, mientras que la cepa 351 (SB0669) correspondió a un bovino del Estado de México. Hubo diferencias ( $P < 0.01$ ) entre las cepas de baja frecuencia 776 (SB1495) y 694 (SB1118), y entre la cepa de BCG atenuada y las cepas de campo analizadas ( $P < 0.01$ ) (Figura 4). No hubo diferencia ( $P > 0.05$ ) en la comparación de los promedios de incremento intracelular entre las cepas de alta frecuencia y las de baja frecuencia (Figura 5).

**Figura 5:** Comparación de los promedios de crecimiento intracelular de cepas de alta y baja frecuencia. Análisis estadístico mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon.



## Discusión

Se ha demostrado que el genotipo de las micobacterias es uno de los factores que contribuyen a la gravedad de la enfermedad y que puede desempeñar un papel en la aparición de farmacorresistencia, susceptibilidad, respuesta del huésped y transmisibilidad. Sin embargo, se desconocen los factores genéticos que determinan la asociación de diferentes linajes micobacterianos con diferentes niveles de gravedad de la enfermedad<sup>(30,31)</sup>. La alta frecuencia de ciertos genotipos de cepas puede ser indicativo del movimiento de ganado infectado en ausencia de adecuadas medidas de control sanitario. Por otro lado, la baja frecuencia de algunos genotipos puede deberse a la falta de representatividad en el muestreo; es decir, el número de aislamientos analizados es

más bien una consecuencia de su disponibilidad debido a una baja prevalencia en la región. Este sugiere que la escasa o nula presencia de ciertos genotipos en algunas regiones sea más una consecuencia de la pequeña cantidad de aislamientos aportados y no de una ausencia real<sup>(22)</sup>.

En los resultados del presente estudio, la proporción de fagocitosis no fue diferente entre las cepas evaluadas; sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticas entre las cepas de campo y la cepa BCG atenuada de *M. bovis*. La BCG mostró menor supervivencia (65 %) que las de campo, lo cual confirma que los macrófagos usados en los ensayos provenían de un bovino con fenotipo resistente y que las cepas de campo eran más virulentas que la BCG. Estos resultados coinciden con estudios anteriores<sup>(21)</sup>. Los resultados de un estudio sobre el *Brucella abortus* sugirieron que las diferencias en la adhesión bacteriana a células entre el ganado resistente y el susceptible podría estar relacionada con los componentes de la pared celular en esta bacteria, lo cual tiene mecanismos distintos a *M. bovis* para evadir la respuesta inmune y la eliminación por macrófagos<sup>(28)</sup>. En otro estudio<sup>(19)</sup>, se realizaron ensayos bactericidas utilizando una cepa de campo y encontraron resultados similares a los del presente estudio en cuanto a la diferencia de supervivencia con respecto a la cepa BCG atenuada, con un crecimiento del 165 % en macrófagos de bovinos resistentes. Los macrófagos que se obtuvieron de bovinos con genotipo resistente produjeron una mayor cantidad de óxido nítrico (NO) en comparación con los macrófagos de bovinos susceptibles. En bovinos, el NO juega un papel importante en la eliminación de patógenos intracelulares por macrófagos<sup>(27,29)</sup>.

El *M. bovis* virulento tiene varias formas de evadir los mecanismos bactericidas del sistema inmunológico innato. Uno de los mecanismos más conocidos e importantes es el “estallido respiratorio” para la eliminación de bacterias fagocitadas, aunque *M. bovis* tiene la capacidad de evadirlo<sup>(32)</sup>. Además, *M. bovis* puede evadir la eliminación al interrumpir la maduración de los fagosomas, impidiendo su fusión con los lisosomas, y también parece inhibir la presentación de antígenos al reducir la expresión de moléculas MHC II<sup>(33,34)</sup>.

En los resultados del presente estudio se encontraron diferencias estadísticas entre tres de las ocho cepas de campo, entre los grupos de frecuencias altas y bajas, y dentro del mismo grupo de frecuencia baja. Esto sugiere que las cepas evaluadas difieren en cuanto a sus virulencias, y que la frecuencia del genotipo en el ganado no está relacionada con la virulencia de la cepa, cuando se evalúa con la metodología aplicada en este estudio. Una limitación en el presente estudio fue que el número de cepas evaluadas no alcanzó la

representatividad. En un estudio previo se intentó asociar los espoligotipos con la virulencia en bovinos por medio de relacionar el espoligotipo con el número de lesiones y el grado de lesión en la canal<sup>(30)</sup>. Los resultados mostraron que los espoligotipos SB0273 y SB0520 tenían alta virulencia y baja frecuencia. Otro intento a relacionar la virulencia con diferentes genotipos usó un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones, y encontró que los genotipos de animales salvajes eran más virulentos que los aislados de humanos o ganado<sup>(36)</sup>; sin embargo, se propone que el *M. bovis* es muy virulento en el modelo de ratón<sup>(35,36)</sup>.

En los rebaños de Irlanda del Norte, se han identificado diferencias en el genotipo de patógenos por el tamaño del brote y la proporción de casos con lesiones visibles en la canal. Estos resultados sugieren que los genotipos de *M. bovis*, aunque están estrechamente relacionados, pueden variar en términos de transmisibilidad. Los genotipos demuestran diferencias en el grado en causan lesiones visibles, en sus patrones de respuesta inmune y en sus niveles de virulencia. Sin embargo, los factores genéticos que determinan la asociación de diferentes genotipos de micobacterias con diferentes grados de gravedad de la enfermedad siguen siendo en gran parte desconocidos. En *M. tuberculosis* se ha encontrado que entre sus seis genotipos principales existe una variación en inmunogenicidad, virulencia y patología, y que hay evidencia de una coevolución huésped-patógeno en las regiones donde se establecen estos genotipos<sup>(37)</sup>.

La gran diversidad genética de las cepas del complejo *M. tuberculosis* (CMTB) sustenta un importante escenario natural, donde estas cepas (particularmente *M. bovis*) se han diversificado. Este es un interesante contexto epidemiológico y evolutivo en el que pueden surgir nuevos genotipos que luego se diversifican para adaptarse mejor al huésped bajo una variedad de factores ambientales y antropogénicos<sup>(38)</sup>.

En los países de alta incidencia, la aparición de una cepa exitosa en cuanto a su epidemiología se ha atribuido a la virulencia debido a las características codificadas en el genoma bacteriano; sin embargo, estas características están relacionadas con genes distintos del genotipado<sup>(39)</sup>. Esto se debe a que estos métodos de genotipificación cubren solo una pequeña parte de los aproximadamente 4,000 genes contenidos en los 4.4 Mb del genoma micobacteriano y no están directamente relacionados con la virulencia<sup>(40)</sup>.

## Conclusiones e implicaciones

Los resultados de este estudio contribuyen a la comprensión de la interacción huésped-patógeno. Las bacterias intracelulares intentan sobrevivir al ambiente hostil presentado por la respuesta inmune donde uno de los efectores principales es el macrófago. Estos resultados ayudan a validar el ensayo microbicida como una herramienta para evaluar, en cierta medida, la virulencia de patógenos bacterianos de vida intracelular, además de sugerir que los genotipos de las bacterias no están directamente relacionados con la virulencia.

### Agradecimientos

La investigación de lo cual forma parte este artículo fue financiada por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) (Proyecto AG-200918).

### Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

### Literatura citada:

1. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J Lond Engl* 2002;163(2):115–127.
2. Gibson AL, Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A, Inwald J, *et al.* Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2004;42(1):431–434.
3. Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *J Clin Microbiol* 2006;44(11):4218–4221.
4. Romero B, Aranaz A, de Juan L, Alvarez J, Bezos J, Mateos A, *et al.* Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3405–3408.
5. Palmer MV, Waters WR, Thacker TC. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol* 2007;44(6):863–874.

6. García-Jiménez WL, Salguero FJ, Fernández-Llario P, Martínez R, Risco D, Gough J, *et al.* Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;156(1–2):54–63.
7. Corner L, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, *et al.* Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust Vet J* 1990;67(11):389–392.
8. Domingo M, Vidal E, Marco A. Pathology of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 2014;97 Suppl:S20-29.
9. Carrisoza-Urbina J, Morales-Salinas E, Bedolla-Alva MA, Hernández-Pando R, Gutiérrez-Pabello JA. Atypical granuloma formation in *Mycobacterium bovis*-infected calves. *PloS One* 2019;14(7):e0218547.
10. Bennett RM, Cooke RJ. Costs to farmers of a tuberculosis breakdown. *Vet Rec* 2006;158:429–432.
11. Boland F, Kelly GE, Good M, More SJ. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland *Prev Vet Med* 2010;93(2–3):153–161.
12. Milián-Suazo F. Tuberculosis bovina en México: las bases. Primera ed. Ajuchitlan, Qro.: INIFAP. 2013.
13. González-Ruiz S, Sosa-Gallegos SL, Rodríguez-Hernández E, Flores-Villalva S, Román-Ponce SI, Bárcenas-Reyes I, *et al.* Genetic diversity of *Mycobacterium bovis* in Jalisco, Mexico: Tracing back sources of infection. *J Vet Med Anim Health* 2018;10(5):114–122.
14. Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, *et al.* An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1998;338(10):633–639.
15. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García I, Cabrera P, *et al.* Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(7):1165–1170.
16. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, *et al.* A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133(1):30–37.
17. Milián-Suazo F, Garcia-Casanova L, Robbe-Austerman S, Canto-Alarcón GJ, Bárcenas-Reyes I, Stuber T, *et al.* Molecular relationship between strains of *M. bovis* from Mexico and those from countries with free trade of cattle with Mexico. *PloS One* 2016;11(5):e0155207.

18. Zumárraga MJ, Arriaga C, Barandiaran S, Cobos-Marín L, de Waard J, Estrada-García I, *et al.* Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries. *Res Vet Sci* 2013;94(1):9–21.
19. Gutiérrez-Pabello JA, Adams LG. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares. *Vet México* 2003;34(3):277–281.
20. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 2013;4(1):3–66.
21. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;50(1–2):55–65.
22. Milián Suazo F, García Casanova L, Romero Torres C, Cantó Alarcón GJ, Gutiérrez RJA, *et al.* Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* del ganado en México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2012;3(4):459–471.
23. Nava Vargas A, Milián Suazo F, Cantó Alarcón GJ, Rubio Venegas Y, Guerrero Solorio R, Rodríguez Hernández E, *etal.* Genetic diversity based on MIRU-VNTR profile of isolates of *Mycobacterium bovis* from Mexican cattle. *Prev Vet Med* 2016;131:75–78.
24. Perea Razo CA, Rodríguez Hernández E, Ponce SIR, Milián Suazo F, Robbe-Austerman S, Stuber T, *et al.* Molecular epidemiology of cattle tuberculosis in Mexico through whole-genome sequencing and spoligotyping. *PLoS ONE* 2018;13(8).
25. Milián-Suazo F, Salman MD, Black WC, Triantis JM, Ramírez CP, Payeur JB, *et al.* Molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Mexico. *Am J Vet Res* 2000;61(1):90–95.
26. Gutiérrez Reyes JA, García Casanova L, Romero Torres C, Sosa Gallegos SL, Cantó Alarcón GJ, Mercado Pezzat M, *etal.* Population structure of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Mexico. *Prev Vet Med* 2012;106(1):1–8.
27. Esquivel-Solís H, Vallecillo AJ, Benítez-Guzmán A, Adams LG, López-Vidal Y, Gutiérrez-Pabello JA. Nitric oxide not apoptosis mediates differential killing of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *PloS One* 2013;8(5):e63464.
28. Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;34(3–4):291–305.

29. Castillo-Velázquez U, Aranday-Cortés E, Gutiérrez-Pabello JA. Alternative activation modifies macrophage resistance to *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 2011;151(1–2):51–59.
30. Garbaccio S, Macias A, Shimizu E, Paolicchi F, Pezzone N, Magnano G, *et al.* Association between spoligotype-VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Virulence* 2014;5(2):297–302.
31. Coker OO, Chaiprasert A, Ngamphiw C, Tongshima S, Regmi SM, Clark TG, *et al.* Genetic signatures of *Mycobacterium tuberculosis* Nonthaburi genotype revealed by whole genome analysis of isolates from tuberculous meningitis patients in Thailand. *Peer J* 2016;4:e1905.
32. Davis AS, Vergne I, Master SS, Kyei GB, Chua J, Deretic V. Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *PLoS Pathog* 2007;3(12):e186.
33. Chávez-Galán L, Ángel M del CAD, Ovalle IS, Lascurain R. Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Gac Médica México*. 2009;145(4):323–330.
34. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 2012;217(3):363–74.
35. Medina E, Ryan L, LaCourse R, North RJ. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. *Tuberc Edinb Scotl* 2006;86(1):20–27.
36. Aguilar LD, Zumárraga MJ, Jiménez OR, Gioffré AK, Bernardelli A, Orozco EH, *et al.* *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2009;157(1):139–147.
37. Wright DM, Allen AR, Mallon TR, McDowell SWJ, Bishop SC, Glass EJ, *et al.* Field-isolated genotypes of *Mycobacterium bovis* vary in virulence and influence case pathology but do not affect outbreak size. *PloS One* 2013;8(9):e74503.
38. de la Fuente J, Díez-Delgado I, Contreras M, Vicente J, Cabezas-Cruz A, Tobes R, *et al.* Comparative genomics of field isolates of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* provides evidence for possible correlates with bacterial viability and virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9(11):e0004232.
39. Lee RS, Radomski N, Proulx JF, Levade I, Shapiro BJ, McIntosh F, *et al.* Population genomics of *Mycobacterium tuberculosis* in the Inuit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(44):13609–13614.

40. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393(6685):537–544.