

Tesis defendida por
Ana Paola Gutiérrez Ordoñez
y aprobada por el siguiente Comité

Alexei Fedórovish Licea Navarro
Director del Comité

Dra. Ana María Escofet Giansone
Miembro del Comité

Dra. Ana Denise Re Araujo
Miembro del Comité

Dra. Rosa María Bermudez Hurtado
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador
del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Abril, 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA



Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida

Caracterización Biológica del veneno de *Conus californicus*
sobre *Mycobacterium bovis*.

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias
Presenta:

Ana Paola Gutiérrez Ordoñez

Ensenada, Baja California, México
2014

Resumen de la tesis de Ana Paola Gutiérrez Ordoñez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en biotecnología.

Caracterización biológica del veneno de *Conus californicus* sobre *Mycobacterium bovis*

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro

En México y otros países en vías de desarrollo no se ha logrado erradicar la tuberculosis bovina, causante de problemas de salud pública y enormes pérdidas económicas. La situación se dificulta al no existir un tratamiento efectivo para el ganado infectado. De acuerdo con estudios realizados en CICESE se demostró que algunos extractos crudos del veneno de *Conus californicus* y de anémona tienen actividad en *Mycobacterium tuberculosis*.

El objetivo general de esta tesis fue contribuir a la caracterización del veneno de *Conus californicus* como inhibidor del crecimiento de *Mycobacterium bovis*. Para esto se trabajó en dos líneas: ensayos con fracciones y subfracciones del veneno total de *C. californicus* y ensayos con péptidos sintéticos. En los ensayos con fracciones y subfracciones se trabajó entre 1 y 3 cepas, encontrándose más de 10 subfracciones con actividad inhibitoria, y una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre 50 µg/ml y 1.5 µg/ml con efecto entre 1 a 3 de la cepas. En los ensayos con péptidos sintéticos de *Conus californicus* se trabajó con 6 péptidos individuales que se probaron en 10 cepas de *M. bovis*. Se encontró una cepa sensible a todos los péptidos, fue sensible a los péptidos CCJ1, CCJ2, CCJ3, CCJ4 y CCJ5, y dos cepas fueron sensibles al péptido CCJ3. El efecto de la concentración de los péptidos se probó solamente en una cepa y no mostró diferencia entre las dos concentraciones probadas. Se encontró actividad inhibitoria del péptido sintético de anémona *Stichodactyla helianthus* en 3 cepas de *M. bovis*, donde en 2 cepas mostró alta actividad y en una, actividad moderada. Hasta el momento no se han encontrado registros sobre extractos de organismos marinos con actividad inhibitoria sobre *M. bovis*. Los resultados obtenidos en esta investigación son alentadores, se sugiere continuar profundizando el estudio de la actividad de las subfracciones sobre un mayor número de cepas para determinar su uso como parte de una terapia contra tuberculosis bovina.

Palabras clave: ***Conus californicus*, *Mycobacterium bovis*, *Stichodactyla helianthus*, tuberculosis bovina.**

Abstract of the thesis presented by Ana Paola Gutiérrez Ordoñez as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Science of Life with orientation in Marine Biotechnology.

Biological characterization of the venom of *Conus californicus* on *Mycobacterium bovis*.

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro

Abstract

In México and other developing countries they have not been able to eradicate bovine tuberculosis which causes public health problems and huge economic losses. This becomes a major issue when there is not an effective treatment for the infected cattle. Recent studies at "CICESE" have demonstrated that crude (raw) extracts venom of *Conus californicus* and anemone have activity on *Mycobacterium tuberculosis*.

The general objective of this thesis was to contribute to the characterization of the *C. californicus* venom as a growth inhibitor of *Mycobacterium bovis*. We worked along two lines: assays with fractions and sub fractions of the whole venom of *C. californicus* and assays with synthetic peptides. In the assays with fractions and sub fractions worked with between 1 and 3 strains, finding more than 10 sub-fractions with inhibitory activity, and a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 50 mg/ml and 1.5 mg/ml with effect from 1 to 3 strains. In assays with synthetic peptides of *C. californicus* worked with 6 individual peptides that were tested in 10 strains of *M. bovis*. One strain was found sensitive to all peptides, one strain was sensitive to CCJ1, CCJ2, CCJ3, CCJ4 peptides and CCJ5, and two strains were sensitive to CCJ3 peptide. The effect of peptide concentration was tested in one strain, and showed no difference between the two concentrations tested. Inhibitory activity of the synthetic peptide from anemone *Stichodactyla helianthus* was found in 3 strains of *M. bovis*, where in 2 strains showed high activity and moderate activity. So far there have been no reports that have been found extracts from marine organisms with inhibitory activity against *M. bovis*. The results obtained in the study are encouraging, it is suggested to continue deepen in the study of the activity of sub fractions on a larger number of strains and determine its use as part of a therapy against bovine tuberculosis.

Keywords: ***Conus californicus*, *Mycobacterium bovis*, *Stichodactyla helianthus*, bovine tuberculosis.**

A mi familia

Agradecimientos

Contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen Ingles.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	iv
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	2
2.1 El género <i>Mycobacterium</i>	2
2.2 <i>Mycobacterium bovis</i>	5
2.3 Situación Actual.....	6
2.4 <i>Mycobacterium bovis</i> en humano.....	11
2.5 Pruebas y tratamiento.....	12
2.6 Canales iónicos de micobacterias.....	14
2.7 Péptidos antibacterianos.....	15
2.8 Caracol marino del género <i>Conus</i>	15
2.9 <i>Conus californicus</i>	17
Capítulo 3. Justificación.....	19
Capítulo 4. Hipótesis.....	20
Capítulo 5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivo General.....	21
5.2 Objetivos Particulares.....	21
Capítulo 6. Materiales y métodos.....	22
6.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de fracciones y sub-fracciones del veneno total de <i>Conus californicus</i>	22
6.1.1 Colecta de organismos y extracción del veneno.....	22
6.1.2 Purificación del veneno de <i>C. californicus</i>	22
6.1.2.1 Repurificación de fracciones individuales.....	23
6.1.3 Aislamiento y cultivo de <i>Mycobacterium bovis</i>	23
6.1.4 Ensayo de viabilidad celular.....	25
6.1.4.1 Preparación del Inóculo.....	25
6.1.4.2 Preparación de la microplaca.....	25
6.1.4.3 Revelado de la microplaca.....	26
6.1.4.4 Interpretación de los resultados.....	27
6.1.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	27
6.1.5.1 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo.....	27
6.1.5.2 Preparación de la microplaca.....	28
6.1.5.3 Revelado de la microplaca.....	29
6.1.5.4 Interpretación de los resultados.....	29
6.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos.....	30
6.2.1 Ensayo de viabilidad celular MTT con péptidos sintéticos.....	30

Contenido

	Página
6.2.2 Ensayo de viabilidad celular de Azul Alamar con péptidos sintéticos.	30
6.2.3 Ensayo de viabilidad celular con péptidos sintéticos de <i>Conus californicus</i> en 9 cepas de <i>M. bovis</i> .	30
Capítulo 7. Resultados	32
7.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de fracciones y subfracciones del veneno total de <i>Conus californicus</i> .	32
7.1.1 Colecta de organismos y extracción del veneno.	32
7.1.2 Purificación del veneno de <i>Conus californicus</i> .	32
7.1.2.1 Repurificación de la fracción F8	33
7.1.2.2 Re-purificación de las fracciones 10,11 y 12	34
7.1.3 Ensayo de viabilidad celular con fracciones del veneno de <i>Conus californicus</i> .	35
7.1.3.1 Ensayo de viabilidad celular con subfracciones de la fracción F8.	36
7.1.3.2 Determinación de la CMI de subfracciones de la corrida CCAP1.2 sobre la cepa 6 de <i>M. bovis</i> .	37
7.1.3.3 Determinación de la CMI de subfracciones de la corrida CCAP1.3 sobre la cepa 4 de <i>M. bovis</i> .	38
7.1.3.4 Determinación de la CMI de subfracciones de la corrida CCAP1.6 sobre la cepa 2 de <i>M. bovis</i> .	39
7.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos.	40
7.2.1 Ensayo de viabilidad celular MTT con péptidos sintéticos.	40
7.2.2 Ensayo de viabilidad celular de Azul Alamar con péptidos sintéticos.	41
7.2.3 Ensayo de viabilidad celular con péptidos sintéticos de <i>Conus californicus</i> en 9 cepas de <i>M. bovis</i> .	42
Capítulo 8. Discusión	43
8.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de fracciones y subfracciones del veneno total de <i>Conus californicus</i> .	43
8.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos.	44
Conclusiones	46
Referencias bibliográficas.	47
Anexos	55

Lista de figuras

Figura		Página
1	Envoltura celular de la micobacteria.....	3
2	Tuberculosis Bovina en México, datos tomados de SAGARPA, Senasica.....	7
3	Clasificación USDA.....	9
4	Tuberculosis Bovina en Baja California.....	10
5	Aparato venenoso de <i>Conus</i> . Olivera 2006.....	16
6	Fotografías de un órgano infectado por <i>Mycobacterium bovis</i>	24
7	Esquema de un ensayo de viabilidad celular.....	26
8	Control de esterilidad (CE) y de crecimiento (CC) para los ensayos revelados con los reactivos MTT y AA.....	27
9	Esquema de un ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	29
10	Esquema de distribución de los péptidos sintéticos de <i>C. californicus</i> y las 9 cepas de <i>M.bovis</i> en el ensayo de AA.	31
11	Perfil cromatográfico del extracto total de veneno de <i>Conus californicus</i> , corrida CCAP1.....	32
12	Perfil cromatográfico del extracto total de veneno de <i>Conus californicus</i> , corrida CC20, Bernaldez 2009.....	33
13	Perfil cromatográfico del la fracción F8, que corresponde a los minutos 35 -40.7 de la purificación de veneno total de <i>C. californicus</i> , corrida CCAP1. F8.....	33
14	Perfil cromatográfico del la fracción F10-12, que corresponde a los minutos 46.7-65 de la purificación de veneno total de <i>C. californicus</i> , corrida CCAP1. 2.....	34
15	Perfil cromatográfico del la fracción F10-12, que corresponde a los minutos 46.7-65 de la purificación de veneno total de <i>C. californicus</i> , corrida CCAP1. 3.....	34
16	Perfil cromatográfico del la fracción F10-12, que corresponde a los minutos 46.7-65 de la purificación de veneno total de <i>C. californicus</i> , corrida CCAP1. 6.....	35

Lista de figuras

Figura		Página
17	Fotografía del ensayo de MTT donde se evaluaron 12 fracciones de veneno total de <i>C. californicus</i> , en la concentración de 200µg/ml, sobre una cepa de <i>M. bovis</i>	35
18	Fotografía del ensayo de viabilidad celular con AA de 3 subfracciones de la corrida CCAP1. F8 sobre <i>M. bovis</i>	36
19	Fotografías del ensayo de CMI de las 17 subfracciones de la corrida CCAP1. 2 sobre la cepa 6 de <i>M. bovis</i>	37
20	Fotografías del ensayo de CMI de las 11 subfracciones de la corrida CCAP1. 3 sobre la cepa 4 de <i>M. bovis</i>	38
21	Fotografías del ensayo de CMI de las 18 subfracciones de la corrida CCAP1. 6 sobre la cepa 2 de <i>M. bovis</i>	39
22	Subfracciones y picos con actividad en más de una cepa de <i>M. bovis</i>	40
23	Fotografía del ensayo de viabilidad celular MTT con péptidos sintéticos sobre la cepa 5 de <i>M. bovis</i>	40
24	Fotografía del ensayo de viabilidad celular AA con péptidos sintéticos sobre una cepa desconocida de <i>M. bovis</i>	41
25	Fotografía del ensayo de viabilidad celular AA con péptidos sintéticos de <i>Conus californicus</i> en 9 cepas de <i>M. bovis</i>	42

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Acciones del gobierno contra la tuberculosis bovina de México.....	6
2	Estrategias de purificación de fracciones Individuales...	23
3	Características de las cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> ...	24

Capítulo 1

Introducción

El complejo de *Mycobacterium tuberculosis* consta de varias especies, dentro de ellas, *Mycobacterium bovis* es la causante de la Tuberculosis bovina (TBB). Esta enfermedad es considerada una zoonosis, por lo que es de gran importancia para la salud pública. Las medidas aplicadas por el gobierno para erradicar la tuberculosis bovina no han sido efectivas, a esta razón se le atribuye la falta de cambios significativos durante la última década. Solo en algunos estados de la República Mexicana se ha podido erradicar esta enfermedad. Baja California es uno de los estados en los que no se ha erradicado por completo, solo una región de uno de sus municipios entra en la segunda categoría para exportación a EUA. Esto afecta a la industria ganadera, ya que causa enormes pérdidas económicas al año. Por otra parte, como no existe actualmente ningún tratamiento farmacológico para esta enfermedad, el ganado infectado debería de ser sacrificado. Se puede decir que la única prevención posible es la vacuna BCG, además de no ser recomendada su aplicación en México, cuenta con una eficacia del 59.4% (López *et al.*, 2010).

Se sabe que las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos agentes antibacterianos por el hecho de poseer una pared celular compleja y altamente hidrofóbica, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos (Jarlier y Nikaido, 1994). Sin embargo, recientemente se han descrito péptidos con acción antibacteriana en la secreción externa de diferentes organismos. Las armas químicas de estos organismos con actividad antibacteriana son consideradas como parte de un mecanismo de defensa innato que tienen en común la función de interrumpir la permeabilidad selectiva de la membrana bacteriana. Estos péptidos han sido encontrados en una gran variedad de organismos, como la piel de las ranas, las pupas de mariposas, veneno de arañas, escorpiones, anémonas y caracoles marinos (Munro, 2005). Anteriormente se ha reportado que el caracol marino *Conus californicus* presenta actividad biológica en *Mycobacterium tuberculosis* (Munro, 2005; Bernáldez, 2013). Con base en lo anterior, surge el interés de realizar el siguiente estudio sobre las toxinas de *Conus californicus* y observar su capacidad de inhibir el crecimiento de *Mycobacterium bovis*.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 El género *Mycobacterium*

Las micobacterias pertenecen al orden de los actinomicetales (bacteria con forma de hongos) y son considerados formas de transición entre las eubacterias. Éste género comprende más de 120 especies, entre bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y de los animales (Milián *et al.*, 2013). Todas las especies de este género tienen una pared celular rica en ácidos micólicos, lo que les confiere una resistencia especial a la decoloración ácida en la tinción Ziehl-Nielsen, esto permite reconocerlos como bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) (Gorocica *et al.*, 2005).

Las micobacterias dedican una gran parte de la capacidad de codificación de su genoma para la biosíntesis de ácidos grasos. Por ejemplo, en este caso 225 genes están involucrados en el metabolismo de lípidos en contraste con los 50 genes de *E. coli*, a pesar de que las dos bacterias tienen un tamaño similar de genoma.

Las micobacterias usan estos genes para sintetizar una fascinante diversidad de lípidos, muchos de los cuáles son únicos (Draper, 1998). Se estima que un porcentaje entre 20 a 40 del peso seco de las micobacterias corresponde a lípidos o glucolípidos, y del 30 al 40 % de ellos son moléculas de ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa (Draper, 1998; Landeros 2000).

Los lípidos son usados por las micobacterias para producir una envoltura celular única, que establece una eficiente barrera impermeable de manera que la mayoría de agentes antimicrobianos son incapaces de atravesar la pared celular. Por esta razón, los antibióticos hidrofílicos y nutrientes de estas características no se pueden difundir a través de la capa (Gorocica *et al.*, 2005). Además de jugar un rol crucial en la alta resistencia intrínseca a los fármacos, también son necesarias estas características de la envoltura celular para la supervivencia extracelular e intracelular de la micobacteria en condiciones adversas (Draper, 1998; Gorocica *et al.*, 2005).

Esta envoltura celular, es una estructura compleja, constituida por membrana interna, pared celular y membrana externa (Brennan, 1989). Sus funciones son proporcionar soporte, protección y posee mecanismos que permiten el intercambio de sustancias con el ambiente, por lo que puede vivir dentro del hospedador y replicarse en los macrófagos (Dinadayala, 2008; Milián *et al.*, 2013). La envoltura celular de la micobacteria se muestra en la figura 1.

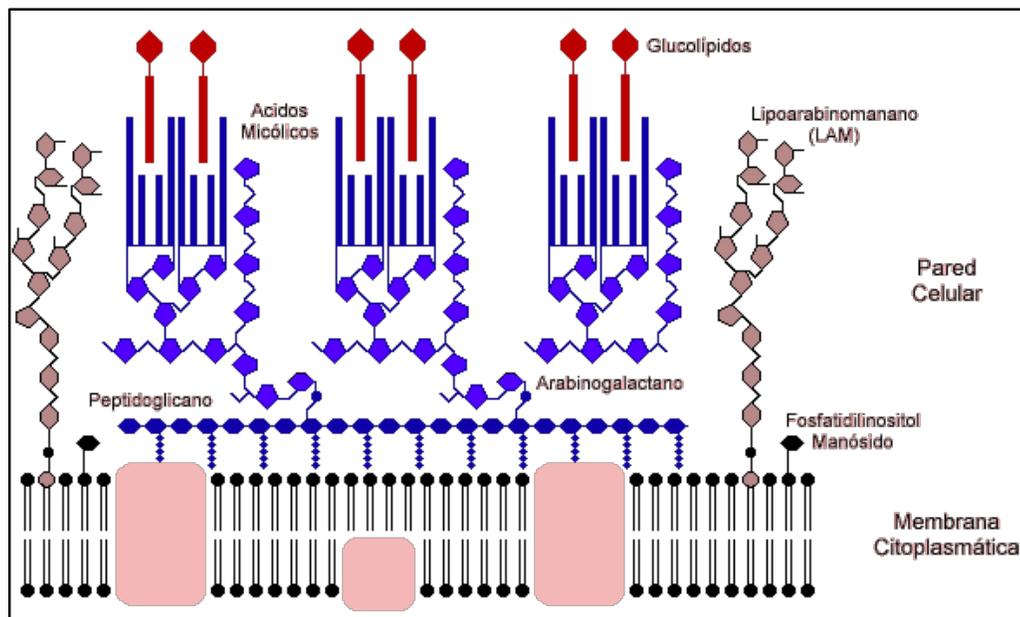


Figura 1. Envoltura celular de la micobacteria. Este dibujo ejemplifica la envoltura celular del género *Mycobacterium* y sus diversos componentes, los cuales le confieren sus propiedades características al género. Modificado de Milián, 2013.

La membrana interna tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glucosilados, dando lugar a moléculas como el lipoarabinomanano (LAM), que juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad (Gorocica *et al.*, 2005).

La pared celular está constituida por un complejo macromolecular formado por peptidoglucano (PG), arabinogalactano (ARB) y ácidos micólicos (AM), su estructura le permite la inserción de diversos compuestos, entre ellos lipomanano y LAM. (Crick *et al.*, 2001; Gorocica *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2009; Brennan *et al.*, 2001; Milián *et al.*, 2013). También contiene lipoproteínas y lipoglicoproteínas de superficie, algunas se han asociado a la virulencia del bacilo, sin embargo, hay muchas otras que aún tienen una función desconocida (Wolfe *et al.*, 2010). El PG tiene como función principal mantener la forma y el tamaño celular, a este se encuentran unidos covalentemente los AM. La unión se da por medio de el ARB, el cual es un polisacárido compuesto de subunidades de arabinosa y galactosa (Brennan y Nikaido, 1995; Kaur *et al.*, 2009; Milián *et al.*, 2013) Los AM son ácidos grasos complejos, y en el caso de las micobacterias, tienen de 70 a 90 carbonos que forman una rama larga, llamada meromicolato y una rama más corta $-\alpha$. Los AM son el principal componente de la envoltura (hasta el 60% del peso seco de la pared) a los que se les atribuye su carácter hidrofóbico. Por otra parte, se sabe que causan agregación bacteriana, contribuyen al crecimiento lento y son un importante factor de virulencia. Muchos de los componentes de la pared celular, del género *Mycobacterium* son antigénicos, como los polisacáridos, proteínas y lípidos, Algunos de ellos son específicos de especie, mientras que otros son compartidos por varias especies del mismo género (Steck *et al.*, 1978; Niederweis *et al.*, 2010; Milián *et al.*, 2013).

La última capa de la envoltura celular es la membrana externa, la cual se considera como parte de la pared celular y sirve de protección contra múltiples factores. Está formada principalmente por fosfatidil-inositol manosidasa, lipomanano, LAM y glucolípidos. En conjunto con algunas proteínas, los glucolípidos son los responsables de las características antigénicas de la bacteria (Steck *et al.*, 1978; Brennan, 1989; Milián *et al.*, 2013; Niederweis *et al.*, 2008).

Todos estos compuestos que conforman la envoltura celular de la micobacteria, contribuyen de una forma u otra a la fisiología característica y a la capacidad que poseen las especies del género *Mycobacterium* de producir una enfermedad (Brennan *et al.*, 2001; Gorocica *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2009).

2.2 *Mycobacterium bovis*

Dentro del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* posee el mayor número de hospederos, pudiéndose encontrar en caprinos, ovinos, cerdos, equinos, perros, gatos, zorros, rumiantes silvestres, búfalos, llamas, alpacas, cerdos silvestres, comadrejas, coyote, lobos, camellos, suricatos, leones, tigres, primates no humanos y el hombre. Sin embargo, principalmente se encuentra en ganado bovino (Thoen *et al.*, 2006; Rivera y Giménez, 2010).

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico, en ocasiones puede tener un curso agudo y progresivo (OIE, 2012), es causada por *Mycobacterium bovis* y se caracteriza por la formación de granulomas nodulares, conocidos como tubérculos de material purulento-caseoso de color amarillo que pueden variar en cantidad y tamaño. Estas lesiones se pueden localizar en cualquier órgano, predominando el pulmón y ganglios linfáticos (López *et al.*, 2006). Como en cualquier enfermedad crónica en ganado, la pérdida progresiva de peso y la reducción en la producción de leche o carne son constantes, pero inespecíficas.

Esta enfermedad es considerada una zoonosis por ser transmisible al hombre pues se puede contraer al ingerir productos lácteos contaminados y no pasteurizados o por contacto con animales infectados (Senasica 2009). También se ha demostrado que el 30% de las vacas tuberculosas expulsan partículas con *M. bovis* a través del tracto respiratorio y todas las *micobacterias* expulsadas pueden ser inhaladas por otros animales, como también, pueden ser ingeridas por otras vacas si se encuentran en sus alimentos (Clavijo *et al.*, 2004). Es conocido que la vía de ingreso de *M. bovis* y la localización de la lesión están íntimamente relacionadas en esta enfermedad (Rivera y Gimenez, 2010).

En América Latina de los 370 millones de cabezas de ganado ubicados en la región, aproximadamente 70% viven en regiones donde la prevalencia es mayor del 1% (De Kantor y Ritacco, 2006; de Kantor *et al.*, 2008).

Según de Kantor y Ritacco (2006), los países de América Latina pueden ser clasificados en tres categorías con base a la prevalencia del ganado reactor a la tuberculina. I) los de menos de 0.1 % o libres, II) los que están entre 0.1 y 1 % y III) los

de más del 1% o de prevalencia desconocida. El primer grupo incluye a : Antigua, Bahamas, Barbados, Bermuda, Islas Vírgenes, Dominica, Granada, Guadalupe, Montserrat, Antillas, Holandesas, Andillas, Holandesas, Santa Lucía, Las Granadinas, Trinidad y Tobago, Jamaica, Cuba, Panamá, Honduras, Belice, Colombia, Uruguay y Venezuela. En el segundo grupo se encuentran: México, Paraguay, República Dominicana, Nicaragua, Costa Rica y el Salvador. Finalmente en el tercer grupo está Taití, Guatemala, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Perú y la Guyana (OIE, 2004).

La respuesta que ha tenido el gobierno en México ante esta enfermedad, se presenta a continuación en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Acciones del gobierno contra la tuberculosis bovina en México. Datos tomados de SENASICA Esta tabla resume las actividades que ha realizado el gobierno para tratar de controlar la tuberculosis bovina en México.

Antes de 1992	La Campaña contra esta enfermedad en México, estaba enfocada principalmente en la realización de pruebas de tuberculina para obtener hatos libres y para exportar becerros a los EUA.
1992	Los estados fronterizos fueron los primeros en iniciar un esquema de pruebas en todos los hatos, detectando la enfermedad, aplicando cuarentenas y sacrificando los reactores.
1993	Se crea un Comité Binacional México- Estados Unidos, para la erradicación de Tuberculosis bovina.
1994	Se publica de forma emergente, la primera Norma Oficial Mexicana, contra la Tuberculosis bovina.
1996	Se publica la Norma Oficial Mexicana que regula la Campaña contra la Tuberculosis bovina, la cual es modificada en 1998 y es la que actualmente continúa vigente.
1996	La Campaña es financiada con recursos económicos tripartitas, procedentes del Gobierno Federal, Estatal y de los Productores.

2.3 Situación Actual

El inventario nacional bovino en México del 2011 fue de casi 33 millones de cabezas, de las que alrededor del 92 % es dedicada a la producción de carne y doble propósito y el 8 % a la producción de leche (SIAP, 2012).

Las estadísticas proporcionadas por SAGARPA, en cuanto a las zonas sin erradicarse la tuberculosis bovina, no habían cambiado del 2006 al 2012. En donde se manejaba la prevalencia menor a 2% para zonas en erradicación y la prevalencia mayor a 2% o desconocido en zonas en control.

Desde 2013 estas estadísticas se han estado actualizado, en la figura 2 se puede observar la situación en 2012 y la situación en 2013, que continua hasta la fecha. En donde, actualmente las **zonas en erradicación** cuentan con una prevalencia menor al 0.5% y las **zonas en control** con una prevalencia promedio de 2.05%, excepto en cuencas lecheras donde es de 16.50%.

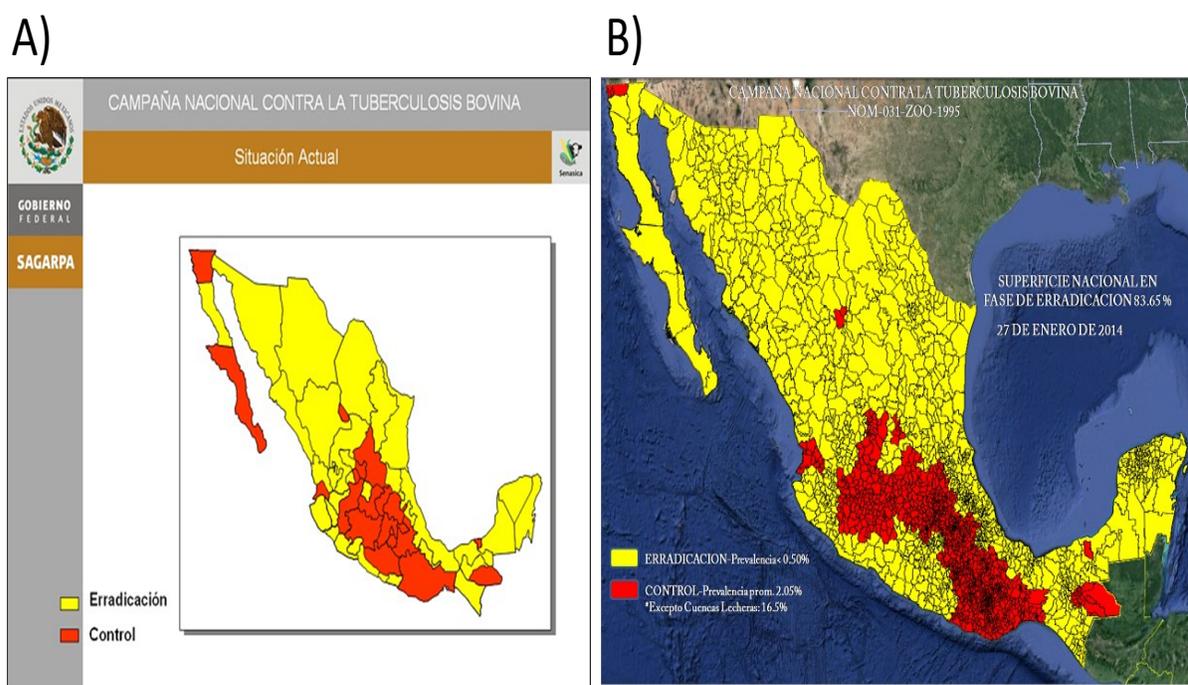


Figura 2. Tuberculosis Bovina en México. En ambas figuras podemos ver la situación en México con respecto a la tuberculosis bovina, los estados que se encuentran en erradicación (amarillo) y los que están en control (rojo). A) Situación desde 2006 hasta 2012. B) Situación desde el 2013. Modificado de SAGARPA, Senasica. Datos actualizados al 27 de enero 2014.

A pesar que en los datos de SAGARPA se muestra una disminución de prevalencia en algunas regiones, es importante destacar el hecho de que no se está tomando en cuenta la alta prevalencia que existe en cuencas lecheras. En donde el porcentaje de reactores en algunos establos puede ser del 0 % (hatos libres) hasta el 50 % (Milián, 2013; comunicación personal de Médicos Veterinarios acreditados), por lo que continua siendo un alto riesgo para la salud pública.

Por otra parte, en la figura 3 se puede observar las regiones que cumplen con los requisitos de exportación de ganado a Estados Unidos, con base en la clasificación que generó el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA como se abrevia en inglés). Esta clasificación cuenta con 4 categorías, que se describen a continuación:

- **Acreditado Modificado Avanzado**, con prevalencia menor al 0.01%, no se requiere de prueba de tuberculina, solamente el norte de Sonora cumple con estos requisitos.
- **Acreditado Modificado**, con prevalencia menor a 0.1 %, se requiere prueba de tuberculina al lote a movilizar, 13 regiones del país entran en esta categoría.
- **Acreditado Preparatoria**, con prevalencia menor a 0.5 %. Se requiere prueba de tuberculina al hato de origen y al lote a movilizar, en el país hay 11 regiones dentro de esta categoría.
- **No Acreditado**, con prevalencia mayor a 0.5 % o desconocida. Movilización para exportación solo a sacrificio inmediato, lo cual se presenta en el resto del país.

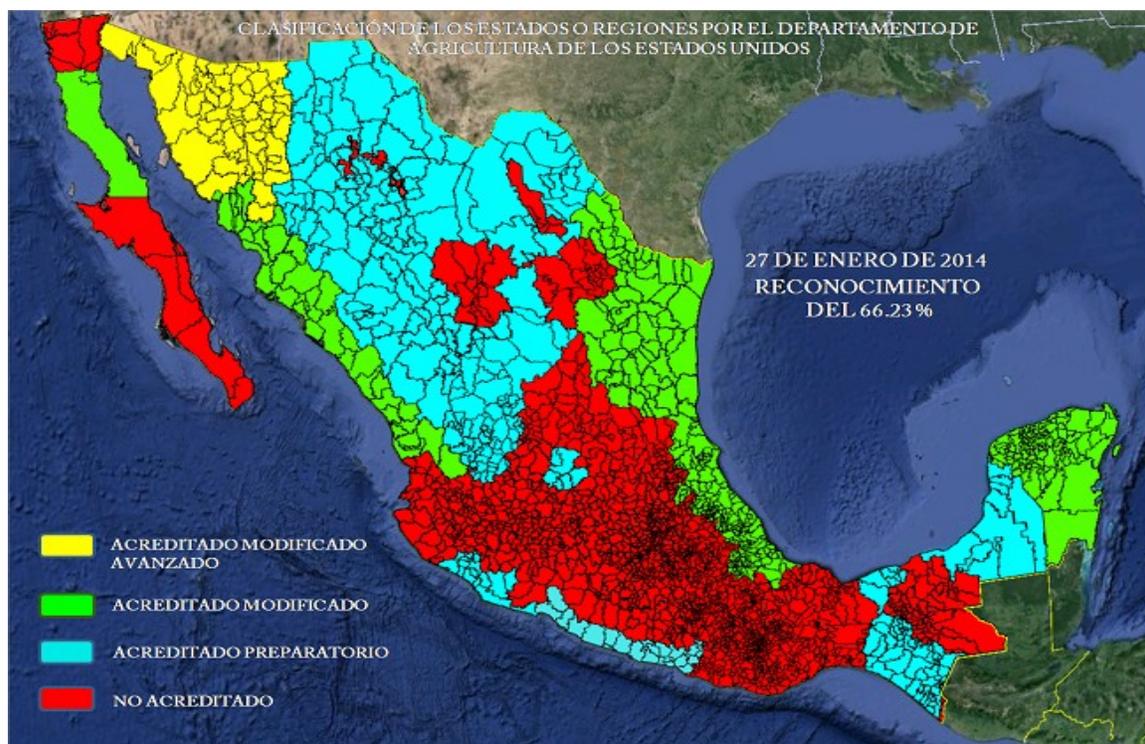


Figura 3. Clasificación USDA. En esta figura se observa dentro de que categoría se encuentra cada región de la Republica Mexicana en cuanto a la clasificación para exportación de ganado según Departamento de Agricultura de los Estado Unidos. Modificado de SAGARPA, Senasica 2014 Datos actualizados al 27 de enero de 2014.

Haciendo una comparación entre las figuras 2 y 3 podemos observar cómo se encuentran los estados o regiones donde según los parámetros de México ya se ha erradicado la tuberculosis bovina, pero en la clasificación de Estados Unidos no están acreditados para exportación. Esto sucede debido a que según los parámetros utilizados en México, si un estado tiene una prevalencia menor al 0.5% se le puede considerar como una zona en erradicación y se maneja como resultado positivo.

En el caso de países desarrollados, sus parámetros son más exigentes y se debe tener una prevalencia menor al 0.01% para poder considerar que se ha erradicado la enfermedad y se pueda exportar el ganado de esta zona sin necesidad de prueba de tuberculina. Por lo consiguiente, sería bueno reconsiderar los parámetros que se manejan actualmente en México, para desarrollar una mayor conciencia del problema y plantear mejores estrategias para poder lograr erradicar la tuberculosis bovina.

Baja California ocupa el séptimo lugar a nivel nacional como productor de carne y el valor de la producción ha crecido considerablemente, ya que en 2010 se ubicaba en 2.8 billones de pesos, mientras que en la actualidad es de aproximadamente 3.9 billones de pesos (SIAP, 2013). Sin embargo, la situación es desfavorable ya que aún no se ha logrado erradicar la tuberculosis bovina. De acuerdo a la clasificación arrojada por la USDA, el estado de Baja California se encuentra dividido en las siguientes 2 regiones:

- La **región A**, se encuentra dentro de la categoría acreditado modificado, y consta solamente de parte del municipio de Ensenada.
- La **región B**, se encuentra dentro de la categoría no acreditado, consta de los municipios de Tijuana, Mexicali, Tecate, Rosarito y parte de Ensenada.

En la figura 4 podemos observar las distancias que hay entre los límites de la región A y la región B, como la ubicación de los hatos infectados.



Figura 4. Tuberculosis Bovina en Baja California. Esta figura representa el estado de Baja California y su división de regiones con respecto a las zonas con hatos infectados de tuberculosis bovina. Modificado de CNOG. Datos actualizados al 18 de marzo de 2013.

Datos de SENASICA en el 2013 mostraban que en Baja California la región A tenía prevalencia del 0.46 % y la zona B de 4.03 %. Lo que nos indica que la región A no debería encontrarse dentro de la categoría de acreditado modificado, debería pertenecer a acreditado preparatorio.

2.4 *Mycobacterium bovis* en humano

Como ya se mencionó anteriormente, son varias especies del complejo *M. tuberculosis* las que pueden infectar al humano, las principales son *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esta última es la segunda causa más común de tuberculosis en las personas (Romero *et al.*, 2005) representando un riesgo serio de salud pública. Se ha demostrado que entre el 3 y 10% de los casos de TB humana puede ser causada por el báculo bovino (Danker *et al.*, 1993; Gutiérrez, *et al.*, 1997; Kubica, 2003; Lo Bue *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 2004; Esteban *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2006; Milián *et al.*, 2010). Esta micobacteria se puede transmitir al hombre por medio de inhalación al encontrarse cerca de ganado infectado, como también sucede de bovino a bovino (Clavijo *et al.*, 2004), o por ingestión o manipulación de productos lácteos no pasteurizados provenientes de animales infectados. La ingestión es la vía de transmisión más común para el humano, por lo que esta bacteria produce en él manifestaciones principalmente extra pulmonares (Pérez *et al.*, 2008; Rodwell *et al.*, 2008). Según la NOM-031-ZOO-1995, de los 7 mil millones de litros de leche que se producen en México, solamente el 50% de la producción se pasteuriza, lo demás se consume o se transforma en derivados lácteos. Se sabe que la prevalencia de tuberculosis bovina es mayor en regiones con alta concentración de ganado lechero (Medeiros *et al.*, 2010) y en el caso de México la prevalencia en ganado lechero es de 16 % aproximadamente (SENASICA, 2014), lo que implica un alto riesgo para la salud pública.

Estudios realizados en San Diego, Estados Unidos en 2003, muestran que más del 90 % de los casos de tuberculosis bovina eran de personas de origen hispano y el 54.3 % de ellos era nacido en México. Al controlar y erradicar la tuberculosis bovina, se eliminará una fuente potencial de infección para el humano, situación que ha sido demostrada en varios países a través de campañas de prevención, control y erradicación de la tuberculosis (LoBue *et al.*, 2003).

La información epidemiológica en México sobre el impacto de la tuberculosis bovina transmitida al hombre es escasa por varias razones. En primera instancia, el diagnóstico a nivel nacional se realiza por baciloscopias, lo que no permiten distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis* y solo en el 1% de los casos se realiza cultivo bacteriológico. Por otro lado, cuando se llega a realizar cultivos, se utiliza principalmente el medio Lowenstein-Jensen en el que *M. bovis* prácticamente no crece debido a que contiene glicerol. Otra de las razones es que debido a su mecanismo de transmisión, la mayor parte de las infecciones por *M. bovis* son extrapulmonares, es decir, que hay otros órganos involucrados en la infección y estas son las más difíciles de detectar y prácticamente no son notificadas (Pérez *et al.*, 2008; Rodwell *et al.*, 2008). Además, el genoma de *M. bovis* tiene más del 99.95% de identidad con *M. tuberculosis*, por lo que en la mayoría de los casos no se realiza la diferenciación entre estas dos cepas y se administra el mismo tratamiento. Una de las razones por lo que sucedía esto era la efectividad de la terapia antituberculosa, ya que ambos bacilos eran susceptibles a los medicamentos utilizados en esas terapias. Esta situación ha cambiado desde que en 1980 surge la Pirazinamina como un medicamento de primera línea, con el propósito de reducir la duración de la terapia antituberculosa a 6 meses, siendo un fármaco al que *M. bovis* es naturalmente resistente. Por esto se entiende la importancia de realizar esta diferenciación, debido a que influenciaría en el impacto del tratamiento de la enfermedad.

Por lo tanto, se sugiere que la tipificación bacteriológica como método de diagnóstico definitivo debería ser implantada en todos los centros de salud en México, así el problema de tuberculosis humana se verá reducido (Acosta *et al.*, 2009).

2.5 Pruebas y tratamiento

En la actualidad, existe una vacuna para tratar de evitar que el ganado contraiga la tuberculosis bovina, llamada BCG, la cual se ha demostrado que cuenta con una eficacia de 59.4 (López *et al.*, 2010). De cualquier manera, no es recomendable aplicar esta vacuna al ganado debido a que la respuesta inmune interfiere con la prueba de diagnóstico de campo, lo cual descarta la posibilidad de un método de prevención hasta el momento.

La prueba intradérmica de la tuberculina es el método más utilizado para la detección en animales que han estado en contacto con *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, cuando se lleva a cabo un control de la tuberculosis bovina con esta prueba, los animales reactivos (positivos a la prueba), por ley se deben de eliminar, pero algunos animales no reactivos que se encuentran en fases terminales de la enfermedad, con lesiones abiertas, permanecen dentro del hato y constituyen un foco potencial de infección para la población susceptible. Uno de los problemas de esta prueba reside en que no detecta animales sin hipersensibilidad tardía de tipo IV (HT) hacia *M. bovis*, denominados anérgicos, ya sea con una infección diseminada o con una infección reciente, debido a que en estos casos la inmunidad celular se encuentra deprimida o en proceso de desarrollo, dando como resultado falsos negativos. (Ritacco, 1991).

En el caso de humanos, como se mencionó anteriormente, en nuestro país no se hace la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, por lo que se les da el mismo tratamiento a ambas. Este tratamiento consiste en: los fármacos que se emplean en la pauta corta de 6 meses isoniacida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) y estreptomina (S), los cuales son considerados de primera línea en función de su eficacia y tolerabilidad. Los fármacos de segunda línea se utilizan para casos de tuberculosis resistente a los de primera línea y son: las fluorquinolonas (FQ), capreomicina (Cm), protionamida (Pt), etionamida (Et), kanamicina (Km) y rifabutin, estos fármacos tienen actividad bactericida. Otros medicamentos de segunda línea son: ácido paraaminosalicílico (PAS), cicloserina (Cs), clofazimina (Cf), y macrólidos, estos medicamentos tienen acción bacteriostática (Toledo *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2002). Estos fármacos actúan afectando la viabilidad de la bacteria de diferentes maneras como: la inhibición de enzimas importantes en su reproducción y crecimiento, interviniendo en la biosíntesis, ensamblaje, traducción proteica y transcripción. Por ejemplo, la isoniacida bloquea la síntesis de ácidos micólicos por lo que la pared de la micobacteria se desintegra, la rifampicina inhibe la transcripción de genes, el etambutol inhibe la síntesis de arabinolactano y lipoarabinomano de la pared celular, la estreptomina inhibe la síntesis de proteínas y las fluorquinolonas inhiben la síntesis de ADN (Diaz *et al.*, 2002). Este mismo tratamiento podría ser aplicado en ganado, sin embargo, implica una gran inversión económica, aparte de ser un tratamiento

demasiado largo como para aplicarlo a cada vaca infectada del ganado y podría incrementar el riesgo de desarrollar cepas resistentes.

2.6 Canales iónicos de micobacterias

Como se explicó, la envoltura celular de la micobacteria es muy compleja y sus componentes característicos dificultan el paso a través de ella para la mayoría de los fármacos. Sin embargo, al igual que cualquier otra célula, ésta tiene canales a través de los cuales existe el intercambio iónico, esencial para su supervivencia. Los canales iónicos son proteínas que se insertan en las membranas biológicas con un poro en su centro que controla, a manera de una “puerta específica”, el paso (a favor del gradiente de concentración) de iones entre el interior y el exterior de la célula. Este mecanismo interviene en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como la contracción muscular o la comunicación de señales entre las células nerviosas (García *et al.*, 2003). Las porinas bacterianas son canales llenos de agua que median la difusión de pequeñas moléculas de nutrientes hidrofóbicos a través de la membrana externa. Esta función ha sido descrita para bacterias Gram negativas y para micobacterias. La porina OmpA es una proteína transmembranal, cuya función y homología en secuencia se ha encontrado también en Micobacterias, a la cual se le ha denominado OmpATb. Se sabe que esta porina se requiere para la virulencia (Niederweis *et al.*, 2010). Por medio de experimentos con bicapas de lípidos se observó que la pared celular de *M. tuberculosis*, además de OmpAtb, contiene al menos 2 porinas diferentes: una selectiva de cationes de subunidades de 15 kDa sensible al calor y un canal compuesto por subunidades de 60 kDa, con largos periodos en estado abierto similar a los encontrados en micobacterias de crecimiento rápido (Kartmann *et al.*, 1999).

Otro de los canales presentes en Micobacterias es el canal mecano sensible de alta conductibilidad (MscL), este canal en procariontes juega un papel crucial en la exocitosis, así como en la respuesta al estrés osmótico. El canal puede ser abierto por tensión en la bicapa (Finney *et al.*, 2002). El canal mecano sensible juega un papel importante a nivel fisiológico en las células de diversos orígenes filogenéticos (Le Dain *et al.*, 1998). Se ha identificado un homólogo de MsCl en la bacteria patógena *M. tuberculosis* (TB-MsCl), el cual contiene 151 aminoácidos y exhibe un total de 37% de identidad de secuencia al *E. coli* MsCl (Chag *et al.*, 1998).

2.7 Péptidos antibacterianos.

Desde hace algunas décadas atrás, se han estudiado numerosos péptidos con propiedades antibacterianas, que han sido identificadas en la secreción externa de diferentes organismos. En diversas investigaciones se ha demostrado que algunos de los compuestos activos más importantes de muchos venenos son péptidos (Garateix, 2010). Dependiendo de su tamaño, estabilidad e interacción con los blancos moleculares, los péptidos pueden actuar rápido, con potencia y con especificidad, lo cual es altamente deseable para los compuestos de uso terapéutico (Steck, 1978; Garateix y Rodríguez, 2010). Estos péptidos han sido encontrados en una gran variedad de organismos, como la piel de las ranas, en las pupas de mariposas, veneno de arañas, escorpiones, anémonas y caracoles marinos (Munro, 2005).

En el caso de las anemonas marinas, a partir de estas, se han logrado obtener una gran diversidad de toxinas peptídicas capaces de actuar con especificidad y potencia en diferentes tipos de canales iónicos y producir una amplia variedad de efectos farmacológicos (Garateix y Rodríguez, 2010). Dentro de las cuales se encuentran toxinas bloqueadoras de canales de K^+ (Castañeda *et al.*, 1995; Garateix *et al.*, 2000), toxinas con efecto sobre canales de Na^+ (Salceda *et al.*, 2002; 2007) y otras neurotoxinas capaces de ejercer efectos farmacológicos disímiles (Garateix *et al.*, 1992; 1996) así como inhibidores de proteasas (Antuch *et al.*, 1993; Delfin *et al.*, 1994). También se han encontrado moléculas formadoras de poros (Lanio *et al.*, 2001) y fosfolipasas (Garateix *et al.*, 1990; Garateix y Rodríguez, 2010).

Con base en lo anterior, los péptidos han sido de gran interés médico, constituyendo posibles fármacos contra bacterias con resistencia a los fármacos existentes hasta el momento, como podría llegar a ser el caso de la tuberculosis bovina (Garaitex, 2005).

2.8 Caracol marino del género *Conus*.

Existe una gran cantidad de especies de caracoles *Conus* y aun hay mucho que descubrir sobre cada una de las más de 700 especies que se han encontrado. Los organismos de la familia Conidae se caracterizan por poseer un aparato venenoso, son predadores principalmente nocturnos y utilizan sus venenos para diferentes propósitos, desde capturar a su presa hasta su propia defensa (Olivera, 1997). El sistema venenoso del caracol *Conus* consiste en un ducto donde el veneno es sintetizado y

almacenado, una válvula de veneno que dispara veneno al ducto y un diente radular parecido a un arpón que sirve como una aguja hipodérmica para inyectar el veneno. Estos arpones se encuentran dentro de la probóscide que es como una trompa que se alarga y de la cual sale el arpón para inyectar el veneno (Olivera, 2006).

El aparato venenoso del caracol marino *Conus* se muestra en la figura 5.

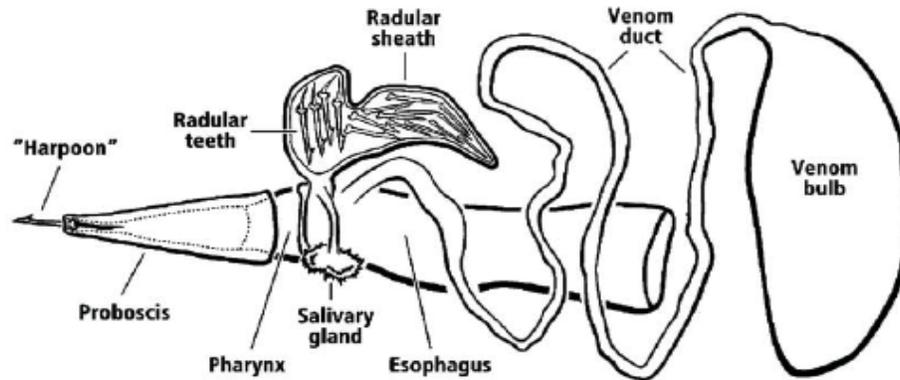


Figura 5. Aparato venenoso de *Conus*. Este dibujo esquematiza el aparato venenoso del caracol marino *Conus* donde se pueden observar sus distintos componentes. Modificado de Olivera, 2006.

Se sabe que entre 100 a 200 componentes diferentes del veneno se encuentran en cada especie de *Conus*, lo cual nos deja un estimado de más de 70,000 diferentes componentes activos farmacológicamente (Olivera, 2006). Estos componentes han sido denominados conotoxinas, las cuales actúan en gran diversidad de canales iónicos o receptores neuronales (Olivera, 1997). Algunos ejemplos son los grupos de las alfa conotoxinas que tienen como sitio blanco los receptores colinérgicos, el grupo de mu conotoxinas que tienen como blanco los canales de sodio del músculo esquelético y otro grupo son las omega conotoxinas que se unen a los canales de calcio neuronales. Otras conotoxinas también se combinan con éstos u otros receptores. Una característica importante de estos compuestos es su capacidad de combinarse con un subtipo específico de receptor (Garateix, 2005).

2.9 *Conus californicus*

El caracol marino *Conus californicus* es una especie de climas fríos, se distribuyen a lo largo de la zona este del pacífico, desde San Francisco, California hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur. A pesar de ser una especie pequeña, en comparación con otras especies de mayor tamaño, es bastante agresiva hacia sus presas. Se ha observado anteriormente la manera en la que varios especímenes de *C. Californicus* en pueden atacar en conjunto a gusanos poliquetos de gran tamaño (Olivera, 1999). Sus hábitos alimenticios son una de las características que hacen que esta especie sea atípica al resto del género *Conus*. Tienen una dieta muy variada, debido a que son piscívoros, moluscívoros o vermívoros, lo que sugiere una gran habilidad de adaptación de acuerdo a la disponibilidad de sus presas. Además, cuentan con una gran variedad de estrategias de alimentación (Garaite, 2005).

Al igual que los demás *Conus*, esta especie tiene un aparato venenoso especializado, con un diente rádula desprendible poco común con el que inyecta el veneno paralizante a su presa. La anatomía general del aparato venenoso es muy semejante a la de algunos miembros del género. El cuarto proximal (posterior) del conducto venenoso está compuesto de un epitelio complejo que podría estar especializado para el transporte activo más que para la secreción. La porción distal del conducto está compuesta de un epitelio de tipo diferente, sugestivo de secreción holócrina y las células muestran gránulos intracelulares prominentes de por lo menos dos tipos. Unos gránulos similares se encuentran contenidos en el lumen del conducto. La conexión que existe entre el lumen del conducto y la faringe es un canal estrecho y aplanado cuyo espesor llega a medir 10µm y está delineado por un tipo celular único de función desconocida. Material granular similar al que se encuentra en el conducto venenoso también se encuentra en el lumen de los dientes radulares que se encuentran en el saco. Estos dientes radulares no solo se cargan en la faringe como en el resto del género *Conus*, sino también se ha encontrado que ya están cargados con péptidos tóxicos cuando se encuentran en el saco radular (Marshall *et al.*, 2002).

En 2005, en el laboratorio de Inmunología y Biotoxinas de CICESE se realizaron estudios donde se demostró que extractos crudos de las toxinas de *Conus californicus* al igual que de anémona, presentan actividad antifúngica (Munro, 2005; Bernáldez, 2013). En el mismo laboratorio, en 2009 se realizaron ensayos para determinar si el veneno total de *Conus californicus* podía inhibir el crecimiento de *Mycobacterium bovis* y se obtuvieron resultados positivos. Por esta razón se desea continuar con este trabajo para lograr obtener uno o más compuestos del veneno total con la capacidad de inhibir el crecimiento de la micobacteria.

Capítulo 3

Justificación

Mycobacterium bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina, en América Latina, aproximadamente 70% del ganado vive en regiones con prevalencia mayor al 1% (De Kantor y Ritacco, 2006; de Kantor *et al.*, 2008). En México no se ha logrado erradicar, la prevalencia para ganado lechero es de 16% aproximadamente y solo el 50% de la producción de leche se pausteriza, por lo que implica un alto riesgo para la salud pública. Por otra parte, debido a que no existe un tratamiento para el ganado infectado, este se debe sacrificar, lo que representa pérdidas económicas para los ganaderos.

Se sabe que las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos agentes antibacterianos ya que cuentan con una pared celular sumamente hidrofóbica, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos (Jarlier y Nikaido, 1994). Sin embargo, se han encontrado numerosos péptidos con propiedades antibacterianas, en la secreción externa de diferentes organismos (Garateix, 2005; Garateix y Rodriguez, 2010). En el veneno del caracol *Conus*, se encuentran entre 100 a 200 componentes diferentes por especie, cada componente con posible acción farmacológica (Olivera, 2006).

Anteriormente se ha reportado que el veneno de *Conus californicus* presenta actividad biológica en *Mycobacterium tuberculosis* (Munro, 2005; Bernáldez, 2013). Por esta razón, surge el interés en analizar los componentes del veneno de *Conus californicus* y la anemona marina. Así, se pretende encontrar nuevas soluciones para esta problemática, que afecta a varios países.

Capítulo 4

Hipótesis

El crecimiento de *Mycobacterium bovis* puede ser inhibido por una o más toxinas del veneno de *Conus californicus*.

Capítulo 5

Objetivos

5.1 Objetivo General

Contribuir a la caracterización del veneno de *Conus californicus* como inhibidor del crecimiento de *Mycobacterium bovis*.

5.2 Objetivos Particulares

5.2.1. Evaluar la actividad inhibitoria de las fracciones y subfracciones del veneno total de *C. californicus*.

5.2.2. Evaluar la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos.

Capítulo 6.

Materiales y métodos

6.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de fracciones y sub-fracciones del veneno total de *Conus californicus*.

6.1.1 Colecta de organismos y extracción del veneno.

Los organismos se colectaron en la zona intermareal en el Km 58 de la carretera Tijuana-Ensenada, Baja California, México, durante el mes de junio del 2007. La fecha de colecta se realizó con base en la predicción de mareas proporcionada por el calendario del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

El veneno de cada espécimen se obtuvo mediante la extracción del aparato venenoso, del cual se separa el ducto venenoso, donde se sintetiza y se almacena el veneno. Los ductos se homogenizaron con solución C (acetonitrilo 40% y TFA 0.01%), se centrifugaron 5 minutos a 10'000 x g a 4°C, se repitió dos veces, recuperándose el sobrenadante. Se congeló a -70°C, se liofilizó (liofilizadora Lyph – Lock6, Labconco) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.1.2 Purificación del veneno de *C. californicus*.

La purificación del veneno se realizó por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC-RP), usando un cromatógrafo Agilent 110 (Agilent Technologies) y una columna Vydac C18 Protein & Peptides (Grace – Vydac 218TP54 x 250mm, 300 A), esta fue equilibrada con solución A (TFA 0.12 %) durante 30 minutos. Posteriormente se inyectó la muestra en un volumen de 200 µL, la elución fue a temperatura ambiente a flujo constante de 1ml/min, con gradiente lineal de 0 a 60 % de solución B (acetonitrilo 99.9 % y TFA 0.1 %) durante 60 minutos. Con 7 min de lavado al 100% de solución B, 5 min al inicio y 2 min al final, esto con el fin de equilibrar la columna.

La detección de los componentes se realiza por absorbancia en la radiación de UV a una longitud de onda de 230nm. Las fracciones fueron colectadas cada 5 minutos, después se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se liofilizaron y se guardaron a 4°C hasta su uso.

6.1.2.1 Repurificación de fracciones individuales.

En la tabla 2 se presenta la estrategia de repurificación utilizada para las fracciones individuales que tuvieron actividad.

Tabla 2. Estrategía de repurificación para fracciones individuales.

Fracción Individual	Gradiente (Sol. B)	Duración (minutos)	Inyección (μg)
8	21 % - 52 %	31	3.5
10 - 12	29 % - 71 %	42	3.62 / 3.5

6.1.3 Aislamiento y cultivo de *Mycobacterium bovis*.

El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento de las cepas fue Stonebrinck. Algunos cultivos fueron aislados de órganos infectados de vacas, proporcionados por el Rastro Municipal de Ensenada, Baja California.

Los órganos infectados se trabajaron dentro de una campana de bioseguridad tipo II, en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, UABC, Mexicali, Baja California. Se realizaron varios cortes del tejido hasta localizar los tubérculos caseosos, se muestran en la figura 6. Se tomó un pedazo pequeño del tubérculo con tejido adherido, se licuó en 10ml de fenol rojo 0.4% y la mezcla se transfirió a un tubo de ensayo con 7 ml de NaOH 0.5N. El color rojo de la mezcla indica pH mayor a 8. Antes de 10 minutos se le agregó HCl 6N hasta que la mezcla se tornó color amarillo, lo que indica pH menor a 6.8. Posteriormente se ajustó el pH a 7 agregando NaOH 1N hasta que la mezcla se tornó color rosa que indica un pH entre 6.8 y 8, que es ideal para micobacterias. Después se centrifugó a $1650 \times g$ por 20min, se recuperó el precipitado, y se tomó una azada con un palillo con algodón para sembrarlo en tubos con medio sólido. Los cultivos se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 semanas aproximadamente, se verificó cada semana hasta observar crecimiento.



Figura 6. Fotografías de un órgano infectado por *Mycobacterium bovis*. A la izquierda se muestra un órgano con tubérculos caseosos, ocasionados por una infección por *M.bovis*. En la derecha se puede observar los tubérculos al ser cortados.

La mayoría de las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el laboratorio de tuberculosis de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. Las características y nombre de cada cepa se muestran en el tabla 3.

Tabla 3. Características de las cepas de *M. bovis*.

# CEPA	I.D. LAB. TB	Tejido	Estado
1	593		Aguascalientes
2	1915	Mediastinos	Aguascalientes
3	643	Traqueobronqueal, pulmón	Jalisco
4	452	Retrofaringeo	Edo. México
5	314	Traqueobronqueal	Jalisco
6	1906	Traqueobronqueal	Aguascalientes
7	625	Mediastino hepático	Jalisco
8	335	Traqueobronqueal	Edo. México
9	82	Retrofaringeo	Torreón Coahuila

6.1.4 Ensayo de viabilidad celular

Este método se utilizó para evaluar la capacidad de inhibición de fracciones y subfracciones del veneno de *C. californicus*.

6.1.4.1 Preparación del Inóculo.

En una campana de bioseguridad tipo II, se tomaron algunas colonias de una cepa de *M. bovis* y se transfirieron a un tubo Falcón con perlas de vidrio y 500 μ L de agua. Después se le agregó 1500 μ L de agua y se homogenizó 2 veces en vortex. Se esperó algunos minutos para que se forme un sedimento. Se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se pasó a un tubo con 10 ml de agua estéril agregándose la cantidad de sobrenadante necesario para alcanzar la misma turbidez que el tubo #1 de la escala de Mc. Farland. Habiendo obtenido la turbidez necesaria se hizo una dilución **1:20** (ej. Se agregan 500 μ L del inóculo con turbidez necesaria a un tubo con 9.5 ml del medio 7H9 sin OADC).

6.1.4.2 Preparación de la microplaca.

Se utilizó una microplaca de 96 pocillos con tapadera, a todos los pozos de su periferia se les agregó 200 μ L de agua esterilizada, para evitar desecación de su contenido. En la figura 7 se muestra el esquema de distribución de la microplaca, donde a los pozos de trabajo se les agregó 100 μ L del medio de cultivo 7H9 (adicionado con OADC), después se les agregó 100 μ L de la fracción a evaluar, cada una se trabajó por duplicado. Al final se les agregó 100 μ L del Inoculo preparado, la penúltima columna se designó para los controles, un control de esterilidad y 5 controles de crecimiento. El control de esterilidad consiste en 200 μ L de medio 7H9 solamente y los controles de crecimiento consisten en 100 μ L de medio 7H9 más 100 μ L del inóculo.

Finalmente, la placa se tapa, se asegura con cinta adhesiva y se guarda en una bolsa de plástico, asegurándose que esté bien cerrada para luego incubarse durante 1 semana a 37 °C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Agua 200µl											
B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	CE	
C		1 D	2D	3D	4D	5D	6D	7D	8D	9D	CC7	
D		10	11	12							CC9	
E		10D	11D	12D							CC11	
F											CC13	
G											CC15	
H												

Figura 7. Esquema de un ensayo de viabilidad celular. Este dibujo ejemplifica la distribución de la microplaca en el ensayo de viabilidad. D: duplicado. CE: control de esterilidad, 200µl de medio. CC: control de crecimiento, 100µl de medio y 100µl de inóculo.

6.1.4.3 Revelado de la microplaca.

Después de la semana de incubación, se reveló el pozo de control de esterilidad y el primer pozo de control de crecimiento (CC7), agregándoles a cada uno 20 µL del reactivo revelador, MTT o Alamar azul según sea el caso, y se esperó 4 horas. En caso de ver crecimiento (cambio de coloración, ver figura 8) en el pozo de control de crecimiento se le agregó a cada pozo 20 µL del reactivo para revelar y se esperó 3 horas más para observar los resultados y tomar una fotografía de la placa.

En el caso contrario, el cambio de coloración se tapó nuevamente la placa y se colocó toda la noche a incubar para observar algún cambio al día siguiente. Si se observó cambios de color, se reveló el resto de la placa pero de no ser así, se incubó la placa 2 días más para revelarse el segundo control de crecimiento (CC9), así hasta observar el cambio de color en uno de los controles de crecimiento.

En caso de observarse el cambio de coloración en el control de esterilidad, los resultados del ensayo se invalidan (el ensayo se debe repetir), debido a que indica que existe contaminación en el medio de cultivo utilizado.

6.1.4.4 Interpretación de los resultados

La lectura de los pozos, se realiza de forma visual. El cambio de coloración varía dependiendo del reactivo que se utilizó en cada ensayo, se debe hacer referencia a los controles para interpretar los resultados. En el caso de utilizar el reactivo Alamar Azul el control **CC** debe tener un color rosa intenso, lo que nos indica crecimiento de las bacterias y el CE debe permanecer azul. En cambio si se utilizó el reactivo de MTT el color del CC debe ser café oscuro o morado oscuro cuando hay crecimiento de bacterias y para el CE el color debe ser amarillo o ámbar, lo que indica que se inhibió el crecimiento de las bacterias.

En la figura 8 se observan los controles para cada reactivo.

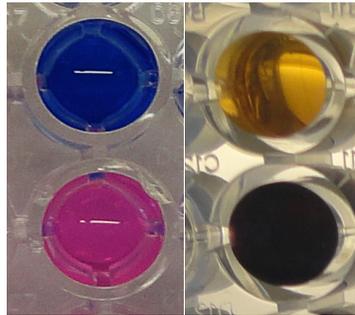


Figura 8. Control de esterilidad (CE) y de crecimiento (CC) para los ensayos revelados con los reactivos MTT y AA. En la fila superior de la fotografía se muestran los CE, color azul para el reactivo AA y amarillo para el reactivo MTT, y en la fila inferior se muestran los CC rosa y café o morado oscuro para los reactivos AA y MTT respectivamente.

6.1.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Este ensayo se utilizó para evaluar la actividad de inhibición de las subfracciones de las corridas CCAP1.2, CCAP1.3 y CCAP1.6, así como para conocer su CMI sobre las cepas 6, 4 y 2. En la tabla 3 se muestran las características de cada cepa.

6.1.5.1 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo.

Se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo de *M. bovis* joven (2 a 5 semanas) crecido en medio 7H9 y 10% de OADC y se transfirió a un tubo. Se ajustó esta suspensión al tubo No. 1 de la escala de Mc. Farland con medio 7H9 y se rotuló como suspensión A. Se realizó una dilución 1:10 de la suspensión A con el medio 7H9 y se rotuló como suspensión B.

6.1.5.2 Preparación de la microplaca.

En la figura 9 se muestra la distribución de la placa para cultivo de 96 pozos, donde se agregaron 200 μL de agua destilada a los pozos de la periferia de la placa, y al resto de los pozos, según los que sean necesarios, se les agregó 100 μL de medio 7H9 con OADC (a cada subfracción se le asignaron 5 pozos de la misma columna). Se adicionaron 100 μL de la subfracción a evaluar al primer pozo de la columna de trabajo. Una vez que se depositaron las disoluciones de trabajo, se realizaron las diluciones correspondientes seriadas, se homogenizaron perfectamente la disolución del primer pozo y posteriormente se toman 100 μL del mismo y se transfirieron al pozo inferior de la misma columna. Este último paso se repitió sucesivamente, teniendo cuidado, hasta completar la disolución seriada requerida. Al 5to pozo de esta columna se desecharon los 100 μL restantes. Esto se repitió en cada columna con su disolución de trabajo correspondiente.

Cuando las diluciones seriadas estaban realizadas, se adicionó la **suspensión bacteriana B**, se tomaron 100 μL de la suspensión B y se colocaron en cada pozo con compuestos. Los controles se prepararon en los pozos de la penúltima columna. Fueron dos tipos de controles: **el control de esterilidad (CE)** que se preparó adicionando solo 200 μL de medio 7H9-p y **el control de crecimiento (CC)** que se preparó adicionando 100 μL de la suspensión bacteriana B más 100 μL de medio 7H9-p. Al final se cerró la placa con su tapa y se selló con cinta adhesiva. Se introdujo la placa en una bolsa de plástico, se cerró con una liga y se puso a incubar durante 1 semana a 37°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Agua 200µl										
B		1 200 µg/mL	2 200 µg/mL	3 200 µg/mL							CE	
C		1 100 µg/mL	2 100 µg/mL	3 100 µg/mL							CC7	
D		1 50 µg/mL	2 50 µg/mL	3 50 µg/mL							CC9	
E		1 25 µg/mL	2 25 µg/mL	3 25 µg/mL							CC11	
F		1 12.5 µg/mL	2 12.5 µg/mL	3 12.5 µg/mL							CC13	
G											CC15	
H												

Figura 9. Esquema de un ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Este dibujo ejemplifica la distribución de la microplaca en el ensayo de CMI con Alamar Azul. CE: control de esterilidad, 200µl de medio. CC: control de crecimiento, 100µl de medio y 100µl de inóculo.

6.1.5.3 Revelado de la microplaca

Transcurrido el tiempo de incubación, se reveló el pozo del control de esterilidad y el primer pozo de control de crecimiento (CC7), agregándoles a cada uno 12 µL de la disolución de Tween 80 y 20 µL de la disolución de Alamar Azul (720 µL de Tween y 1200 µL Alamar Azul) mismos que pueden ser mezclados previamente a su adición. Se esperaron 4 horas. Si se apreciaba cambio en la coloración del control de crecimiento se procedió a revelar la placa completa adicionando la disolución de Alamar Azul. En caso contrario, se incubó las placas durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo el control de crecimiento debería estar completamente rosa, mientras que los controles CE permanecían azules. Si se observaron los cambios de color, se reveló el resto de la placa pero de no ser así, se incubó 2 días más para revelarse el segundo control de crecimiento (CC9), así hasta observar el cambio de color en uno de los controles de crecimiento. Los controles se muestran en la figura 8.

6.1.5.4 Interpretación de los resultados

Se tomó como concentración mínima inhibitoria (CMI) a la concentración correspondiente al último pozo que permaneció azul y cuya intensidad sea igual o menor a la obtenida en el control CE.

6.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos.

En el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE, se logró obtener de manera sintética 6 péptidos de *C. californicus* (Cervantes, 2013), los cuales presentan actividad sobre canales receptores nicotínicos. Estos péptidos sintéticos se localizan dentro del rango de picos pertenecientes a la fracción F7 de veneno total, por lo que fue de interés el evaluar su actividad en *M. bovis*. Así mismo, se continuó con la evaluación de la actividad inhibitoria del péptido sintético de la anemona *Stichodactyla helianthus*.

6.2.1 Ensayo de viabilidad celular MTT con péptidos sintéticos.

Los péptidos se evaluaron a la concentración de 50µg/ml, según la metodología descrita en el apartado 6.1.4, sobre la cepa 5 de *M. bovis*. Para observar los resultados se reveló con el reactivo MTT.

6.2.2 Ensayo de viabilidad celular de Azul Alamar con péptidos sintéticos.

Los péptidos se evaluaron en dos concentraciones, 50µg/ml y 12.5µg/ml. sobre una cepa no caracterizada de *M. bovis*. Se siguió la metodología descrita en el apartado 6.1.4; no se trabajó con duplicados y se utilizó el reactivo revelador Azul Alamar.

6.2.3 Ensayo de viabilidad celular con péptidos sintéticos de *Conus californicus* en 9 cepas de *M. bovis*.

Los péptidos se evaluaron a la concentración de 50µg/ml, según la metodología descrita en el apartado 6.1.4, y se revelaron con el reactivo AA.

En la figura 10 se muestra la distribución de los péptidos sintéticos de *C. californicus* y las 9 cepas diferentes de *M. bovis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Cepa 1 CCJ3	Cepa 2 CCJ3	Cepa 3 CCJ3	Cepa 4 CCJ3	Cepa 5 CCJ3	Cepa 6 CCJ3	Cepa 7 CCJ3	Cepa 8 CCJ3	Cepa 9 CCJ3	CC	
C		Cepa 1 CCJ2	Cepa 2 CCJ2	Cepa 3 CCJ2	Cepa 4 CCJ2	Cepa 5 CCJ2	Cepa 6 CCJ2	Cepa 7 CCJ2	Cepa 8 CCJ2	Cepa 9 CCJ2	CC	
D		Cepa 1 CCJ1	Cepa 2 CCJ1	Cepa 3 CCJ1	Cepa 4 CCJ1	Cepa 5 CCJ1	Cepa 6 CCJ1	Cepa 7 CCJ1	Cepa 8 CCJ1	Cepa 9 CCJ1	CC	
E		Cepa 1 CCJ4	Cepa 2 CCJ4	Cepa 3 CCJ4	Cepa 4 CCJ4	Cepa 5 CCJ4	Cepa 6 CCJ4	Cepa 7 CCJ4	Cepa 8 CCJ4	Cepa 9 CCJ4	CC	
F		Cepa 1 CJJ5	Cepa 2 CJJ5	Cepa 3 CJJ5	Cepa 4 CJJ5	Cepa 5 CJJ5	Cepa 6 CJJ5	Cepa 7 CJJ5	Cepa 8 CJJ5	Cepa 9 CJJ5	CC	
G		Cepa 1 CCJ6	Cepa 2 CCJ6	Cepa 3 CCJ6	Cepa 4 CCJ6	Cepa 5 CCJ6	Cepa 6 CCJ6	Cepa 7 CCJ6	Cepa 8 CCJ6	Cepa 9 CCJ6	CE	
H												

Figura 10. Esquema de distribución de los péptidos sintéticos de *C. californicus* y las 9 cepas de *M. bovis* en el ensayo de AA. En cada columna se muestra una cepa diferente de *M. bovis*, distribuidas de izquierda a derecha del 1 al 9. En las diez filas se muestran los péptidos sintéticos, que de arriba a abajo son: CCJ3, CCJ2, CCJ1, CCJ4, CCJ5 y CCJ6.

Capítulo 7.

Resultados

En general, los resultados apoyan la hipótesis de que en el veneno de *C. californicus* existe una o más toxinas capaces de inhibir el crecimiento de *M. bovis*. Además, amplían la hipótesis inicial ya que muestran resultados alentadores en los ensayos con péptidos sintéticos.

7.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de fracciones y subfracciones del veneno total de *Conus californicus*.

7.1.1 Colecta de organismos y extracción del veneno.

De los 800 ejemplares colectados se obtuvo un total de 400mg. De este total, una parte se destinó a todos los ensayos de esta tesis, y el resto quedó en el banco de venenos del laboratorio de inmunología molecular y Biotoxinas.

7.1.2 Purificación del veneno de *Conus californicus*.

El cromatograma de la corrida CCAP1, obtenido al purificar la muestra de veneno total de *C. californicus*, se muestra en la figura 11. Se muestran las 12 fracciones colectadas.

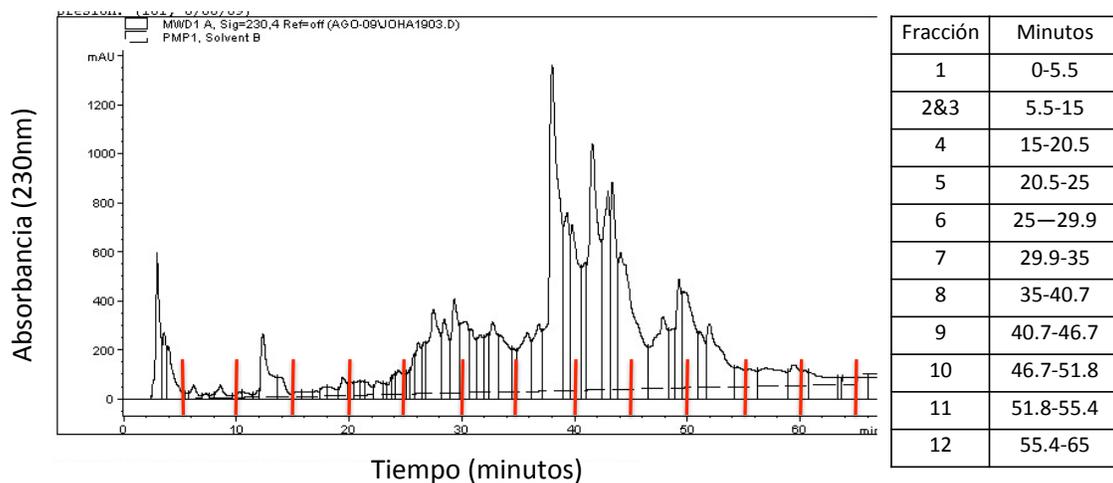


Figura 11. Perfil cromatográfico del extracto total de veneno de *Conus californicus*, corrida CCAP1. La tabla a la derecha muestra los nombres que se dieron a cada fracción, y su tiempo de retención.

En la figura 12 se muestra el perfil cromatográfico de la corrida CC20 (Bernaldez, 2009), del cual se utilizaron las fracciones 2-3 (5.5 -15 min) y 5 (20.5- 25). Estas fracciones se juntaron con las fracciones 2, 3 y 5 de la corrida CCAP1.2, con el fin de ajustar el volumen suficiente para ser evaluadas en el ensayo de viabilidad celular.

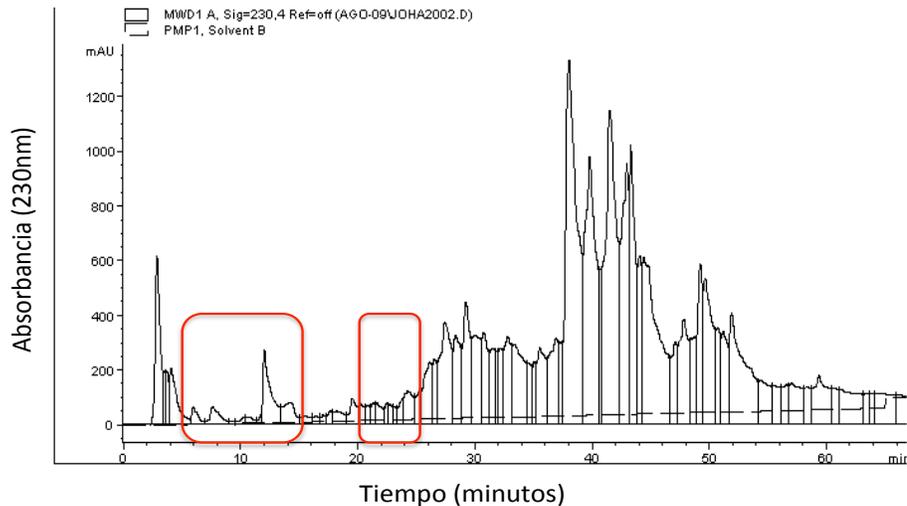


Figura 12. Perfil cromatográfico del extracto total de veneno de *Conus californicus*, corrida CC20, Bernaldez 2009. En rectángulos rojos se puede observar el rango de picos correspondientes a las fracciones 2-3 (5.5 -15 min) y 5 (20.5- 25).

7.1.2.1 Repurificación de la fracción F8

El cromatograma de la corrida CCAP1. F8, obtenido al re purificar la fracción F8, se muestra en la figura 13. Se obtuvieron 5 subfracciones.

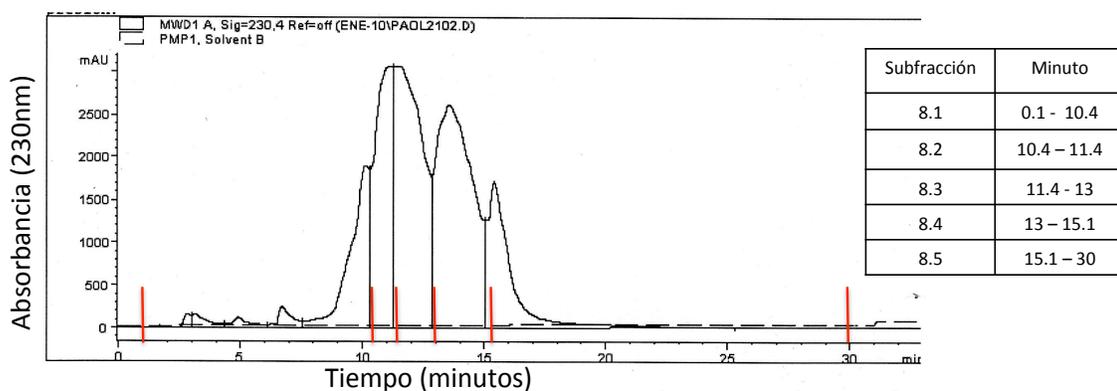


Figura 13. Perfil cromatográfico de la fracción F8, que corresponde a los minutos 35 - 40.7 de la purificación de veneno total de *C. californicus*, corrida CCAP1. F8. La tabla a la derecha muestra los nombres que se dieron a cada subfracción, y su tiempo de elución.

7.1.2.2 Re-purificación de las fracciones 10,11 y 12

Los cromatogramas de las corridas CCAP1.2, CCAP1.3 y CCAP1.6, obtenidos al re-purificar la fracción F10-12, se muestran en las figuras 14, 15 y 16 respectivamente.

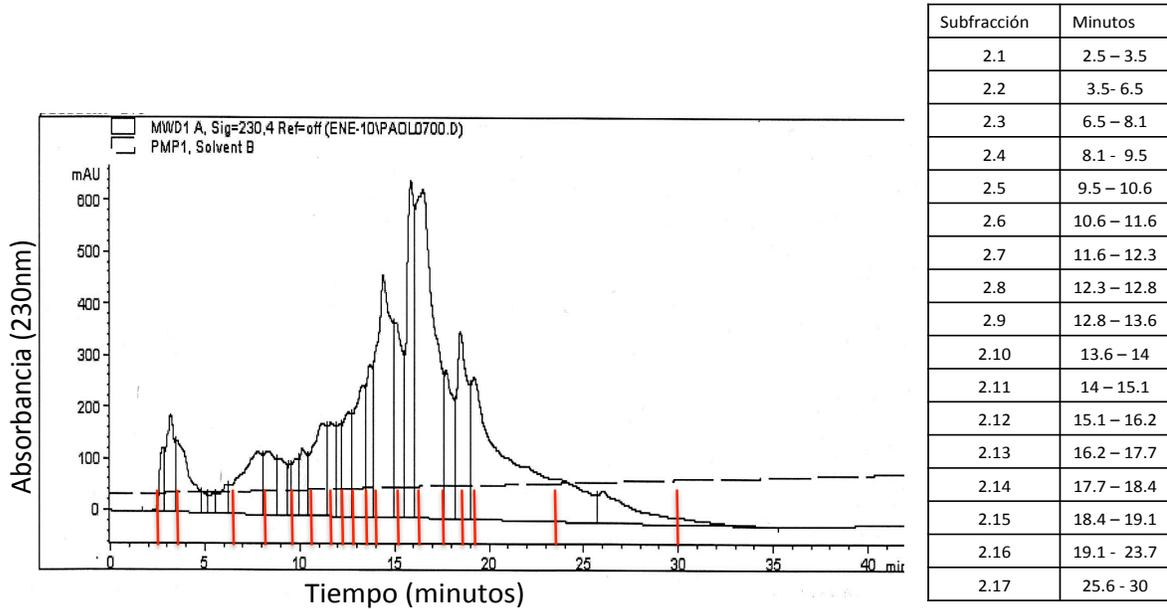


Figura 14. Perfil cromatográfico del la fracción F10-12, que corresponde a los minutos 46.7-65 de la purificación de veneno total de *C. californicus*, corrida CCAP1. 2. La tabla a la derecha muestra los nombres que se dieron a cada subfracción, y su tiempo de elución.

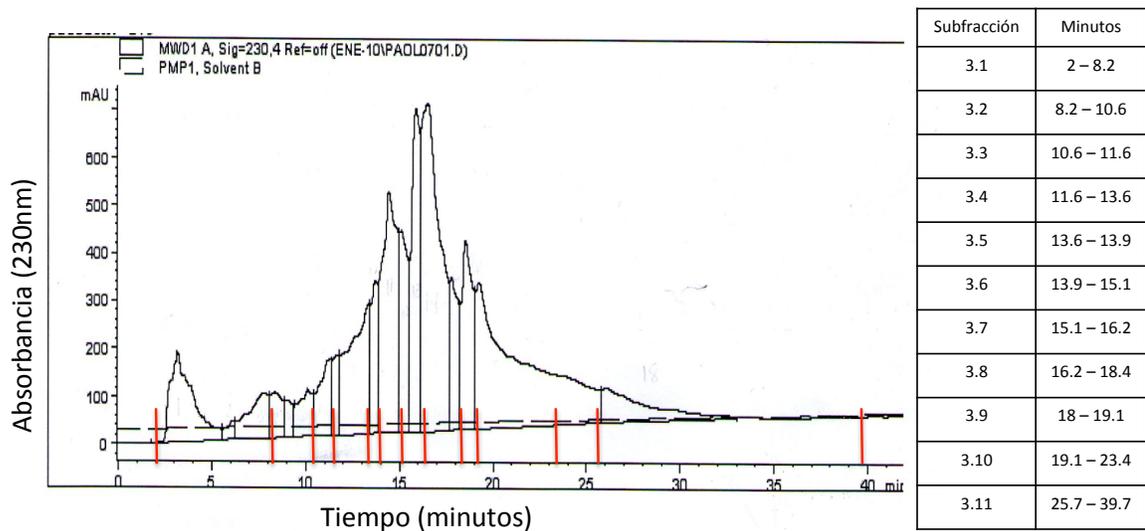


Figura 15. Perfil cromatográfico del la fracción F10-12, que corresponde a los minutos 46.7-65 de la purificación de veneno total de *C. californicus*, corrida CCAP1. 3. La tabla a la derecha muestra los nombres que se dieron a cada subfracción, y su tiempo de elución.

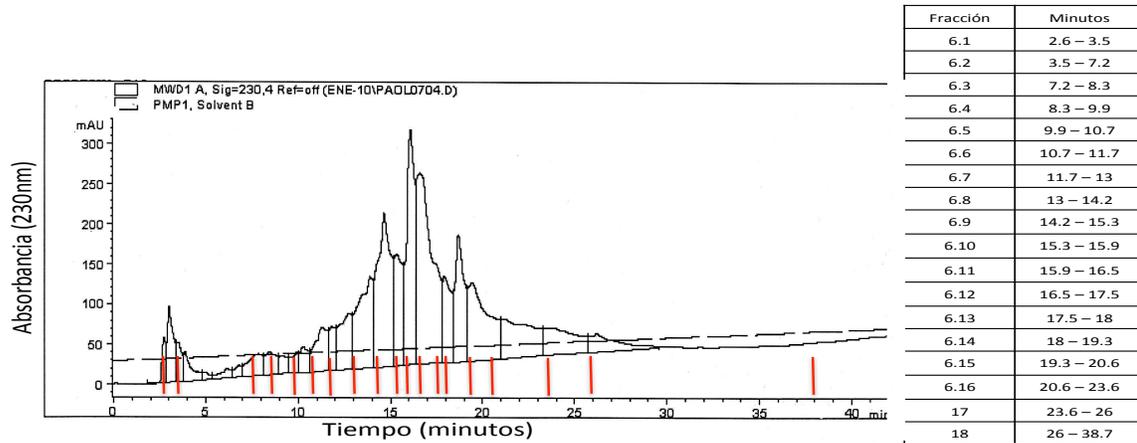


Figura 16. Perfil cromatográfico del la fracción F10-12, que corresponde a los minutos 46.7-65 de la purificación de veneno total de *C. californicus*, corrida CCAP1. 6. La tabla a la derecha muestra los nombres que se dieron a cada subfracción, y su tiempo de elución.

7.1.3 Ensayo de viabilidad celular con fracciones del veneno de *Conus californicus*.

En la figura 17 se muestran los resultados del ensayo de viabilidad donde se evaluaron las fracciones de veneno total de *C. californicus* y el péptido sintético de anémona *S. helianthus*.

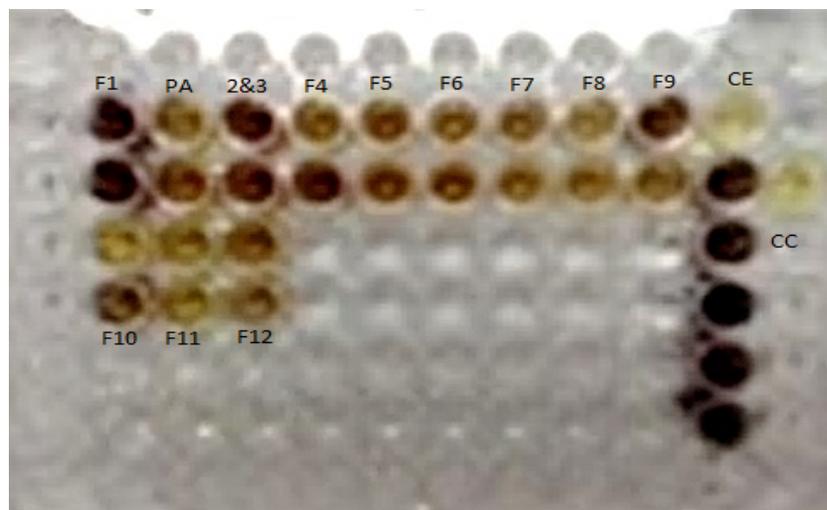


Figura 17. Fotografía del ensayo de MTT donde se evaluaron 12 fracciones de veneno total de *C. californicus*, en la concentración de 200µg/ml, sobre una cepa de *M. bovis*. Donde: PA es el péptido sintético de la anémona *S. helianthus* a 50 µg/ml, CC es control de crecimiento (del día 7 al día 15), CE es control de esterilidad. La cepa que se utilizó en este ensayo es desconocida.

Se observó que las fracciones F7 (29.9-35), F8 (35-40.7), F10 (46.7-51.8), F11 (51.8-55.4), F12 (55.4-65) y en el péptido sintético de la anémona *S. helianthus* (PA) tienen actividad de inhibición del crecimiento de *M. bovis*.

7.1.3.1 Ensayo de viabilidad celular con subfracciones de la fracción F8.

En la figura 18 se pueden observar los resultados. Las subfracciones 8.4 y 8.5 no se pudieron evaluar por falta de cantidad.

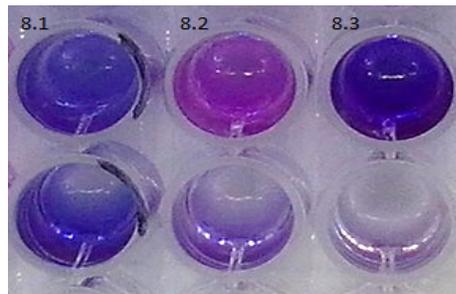


Figura 18. Fotografía del ensayo de viabilidad celular con AA de 3 subfracciones de la corrida CCAP1. F8 sobre *M. bovis*. En la parte superior de la fotografía se muestra la distribución de las subfracciones por columna, cada subfracción se probó por duplicado a una concentración de 200µg/ml. La cepa utilizada es desconocida. No se muestran los controles*

En las subfracciones 8.1 (0.1 – 10.4) y 8.3 (11.4-13) se observa un color azul, lo que nos indica que tienen actividad de inhibición. Sin embargo, el duplicado de la subfracción 8.3 se observa de un color morado claro, por lo que se determinó con actividad de inhibición moderada.

7.1.3.2 Determinación de la CMI de subfracciones de la corrida CCAP1.2 sobre la cepa 6 de *M. bovis*.

Los resultados obtenidos del ensayo de CMI con las subfracciones de la corrida CCAP1.2 se muestran en la figura 19.

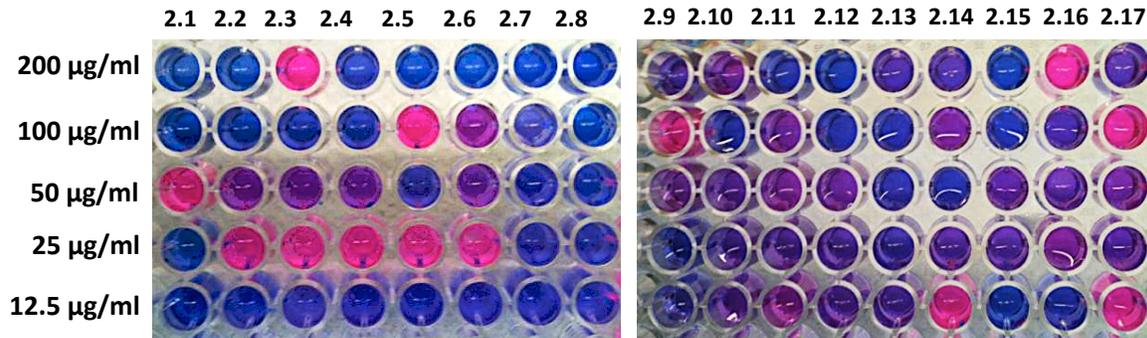


Figura 19. Fotografías del ensayo de CMI de las 17 subfracciones de la corrida CCAP1. 2 sobre la cepa 6 de *M. bovis*. A) Fotografía de la placa 1, donde se localizan de la subfracción 2.1 a la 2.8. B) Fotografía de la placa 2, donde se localizan de la subfracción 2.9 a la 2.17. En la parte superior de cada fotografía se muestra la distribución de las subfracciones por columna y en la izquierda se muestran las concentraciones en cada fila de la microplaca. No se muestran los controles*

***Nota:** Los controles de esterilidad y crecimiento no se muestran en algunas fotografías, debido a que se utilizaron controles en común para varios ensayos. Los controles se encuentran en la figura 8.

Se observó actividad de inhibición en 15 de las 17 subfracciones, de las cuales las subfracciones 2.1, 2.2, 2.4, 2.5, 2.6, 2.9, 2.17 tuvieron CMI de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 25 µg/ml, 25 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente. En el caso de las subfracciones 2.7, 2.8, 2.10, 2.12, 2.13, 2.15 su CMI es menor de 12.5 µg/ml.

7.1.3.3 Determinación de la CMI de subfracciones de la corrida CCAP1.3 sobre la cepa 4 de *M. bovis*.

En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de CMI con las subfracciones de la corrida CCAP1.3.

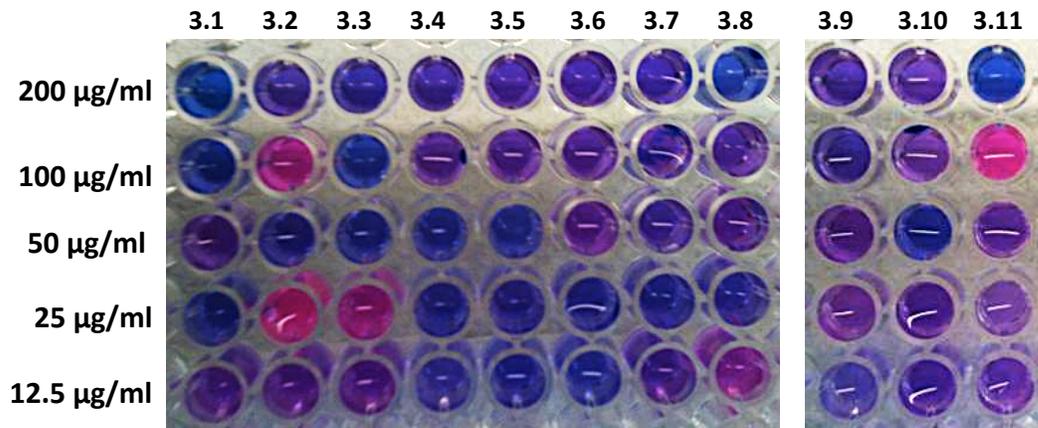


Figura 20. Fotografías del ensayo de CMI de las 11 subfracciones de la corrida CCAP1. 3 sobre la cepa 4 de *M. bovis*. A) Fotografía de la placa 1, donde se localizan de la subfraccion 3.1 a la 3.8. B) Fotografía de la placa 2, donde se localizan de la subfraccion 3.9 a la 3.11 . En la parte superior de cada fotografía se muestra la distribución de las subfracciones por columna y en la izquierda se muestran las concentraciones en cada fila de la microplaca. No se muestran los controles*

Se observó actividad en todas las subfracciones. La CMI de las subfracciones 3.2, 3.3, 3.8 y 3.11 fue de 200 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente. En el caso de las subfracciones 3.1(2 – 8.2 min), 3.4 (11.6 – 13.6 min.), 3.5 (13.6 – 13.9 min.), 3.6(13.9 – 15.1) , 3.7 (15.1 – 16.2 min.), 3.9 (18 – 19.1 min) y 3.10 (19.1 – 23.4) su CMI fue menor de 12.5 µg/ml.

7.1.3.4 Determinación de la CMI de subfracciones de la corrida CCAP1.6 sobre la cepa 2 de *M. bovis*.

Los resultados del ensayo de CMI con subfracciones de la corrida CCAP1.6 se muestran en la figura 21.

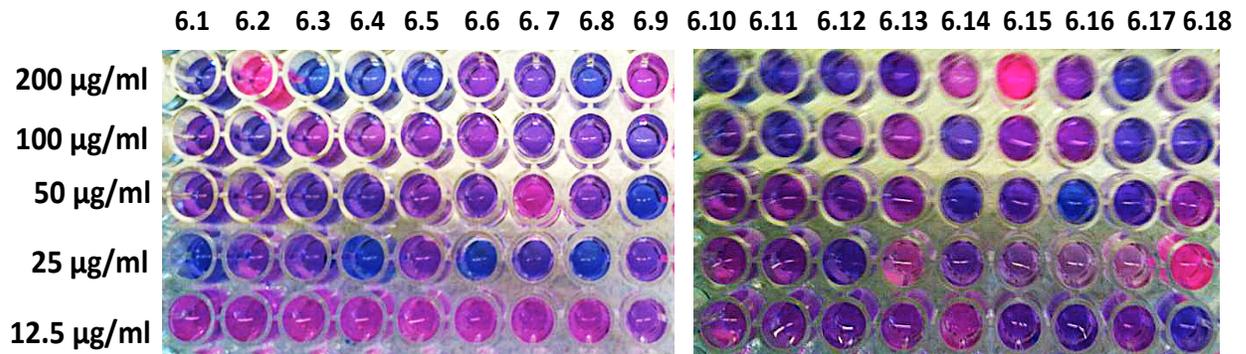


Figura 21. Fotografías del ensayo de CMI de las 18 subfracciones de la corrida CCAP1. 6 sobre la cepa 2 de *M. bovis*. A) Fotografía de la placa 1, donde se localizan de la subfracción 6.1 a la 6.9 B) Fotografía de la placa 2, donde se localizan de la subfracción 6.10 a la 6.18. En la parte superior de cada fotografía se muestra la distribución de las subfracciones por columna y en la izquierda se muestran las concentraciones en cada fila de la microplaca. No se muestran los controles*

Se observó actividad de inhibición en 15 subfracciones de 18 evaluadas, de las cuales las subfracciones 6.1, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.13, 6.16, 6.17 y 6.18 tienen CMI de 25 µg /ml, 100 µg /ml, 25 µg /ml, 50 µg /ml, 50 µg /ml, 50 µg /ml y 50 µg /ml respectivamente. En el caso de las subfracciones 6.9, 6.10, 6.11 y 6.12 su CMI es menor de 12.5 µg /ml.

En la figura 22 se muestra un cromatograma donde se localizaron las subfracciones, de las corridas CCAP1.2, CCAP1.3 y CCAP1.6, con actividad en más de una cepa de *M. bovis*.

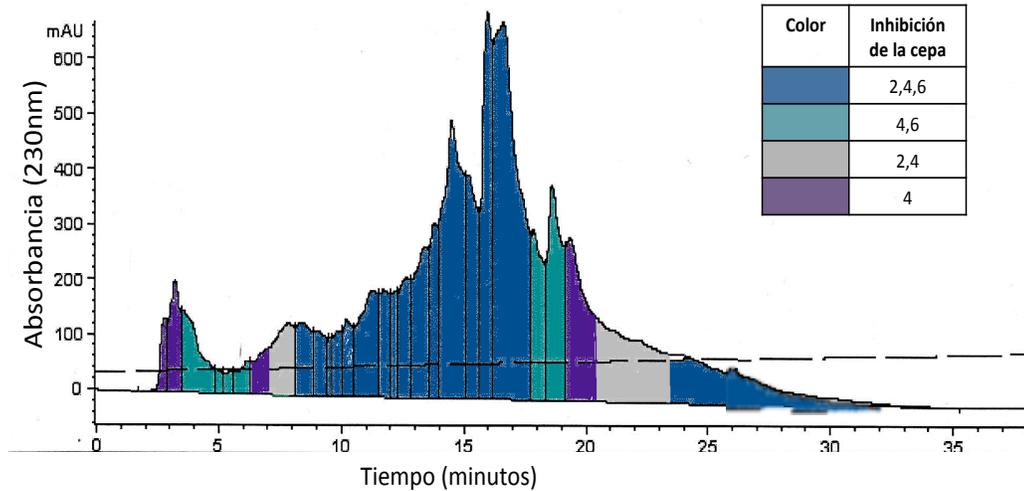


Figura 22. Subfracciones y picos con actividad en más de una cepa de *M. bovis*. A la derecha esta una tabla donde se muestra el color que representa las cepas sensibles a las subfracciones, de la fracción F 10- 12 de veneno total, de *C. californicus*.

7.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos.

7.2.1 Ensayo de viabilidad celular MTT con péptidos sintéticos.

Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 23.

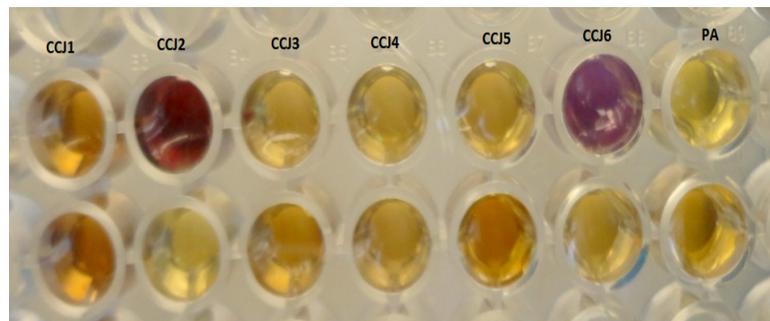


Figura 23. Fotografía del ensayo de viabilidad celular MTT con péptidos sintéticos sobre la cepa 5 de *M. bovis*. La concentración de cada péptido es de 50µg/ml. La última columna pertenece al péptido sintético de anémona *S. helianthus*, y las columnas restantes son de los péptidos sintéticos de *C. californicus*.

Se observa que los péptidos CCJ3, CCJ4 (*C. californicus*) y PA (*S. helianthus*) mostraron actividad por duplicado, misma que se distingue por color amarillo en ambas. En cambio, los duplicados de los péptidos CCJ2 y CCJ6 mostraron un color oscuro, indicando crecimiento, lo cual posiblemente se deba a una contaminación. Por lo anterior, se decidió que este resultado representa el 50% de actividad.

7.2.2 Ensayo de viabilidad celular de Azul Alamar con péptidos sintéticos.

Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 24.

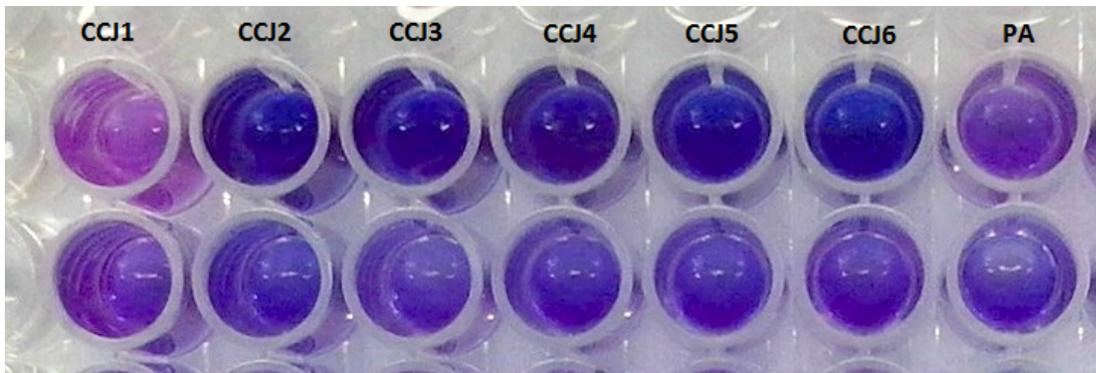


Figura 24. Fotografía del ensayo de viabilidad celular AA con péptidos sintéticos sobre una cepa desconocida de *M. bovis*. La concentración en la fila superior es de 50µg/ml y en la fila inferior de 12.5µg/ml. La última columna pertenece al péptido sintético de anémona *S. helianthus* y las columnas restantes son de los péptidos sintéticos de *C. californicus*.

Se observa que los péptidos CCJ2, CCJ3, CCJ4, CCJ5 y CCJ6 mostraron actividad de inhibición por duplicado en ambas concentraciones. En cambio, el péptido CCJ1 no mostró actividad. En el caso del péptidos sintético de anémona *S. helianthus*, se observó actividad moderada en ambas concentraciones.

7.2.3 Ensayo de viabilidad celular con péptidos sintéticos de *Conus californicus* en 9 cepas de *M. bovis*.

Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 25.

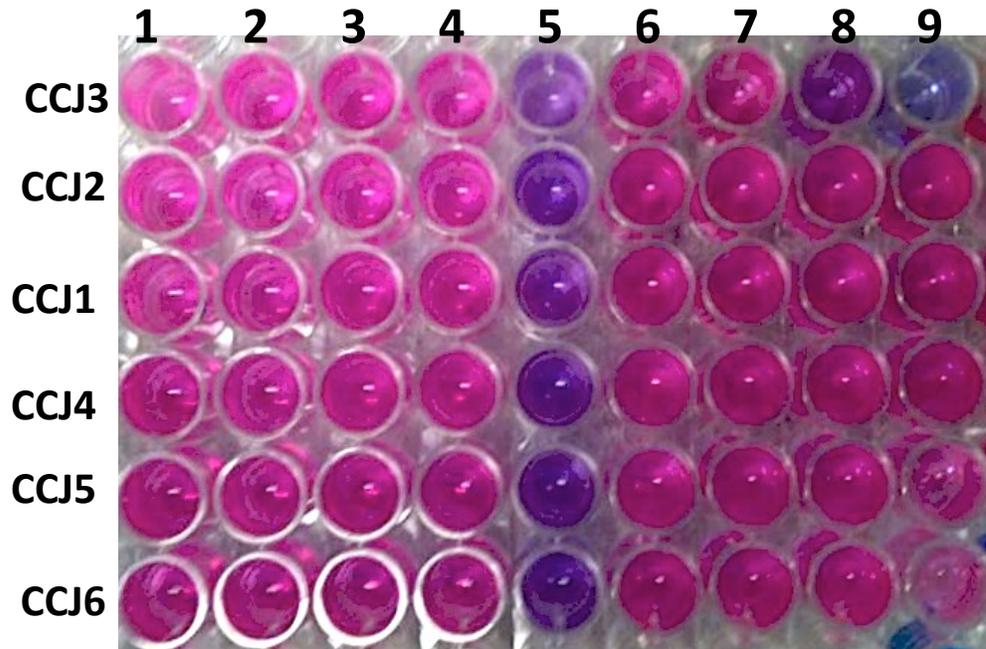


Figura 25. Fotografía del ensayo de viabilidad celular AA con péptidos sintéticos de *Conus californicus* en 9 cepas de *M. bovis*. La concentración de cada péptido es de 50µg/ml. En cada columna se muestra una cepa diferente de *M. bovis*, distribuidas de izquierda a derecha del 1 al 9. En las diez filas se muestran los péptidos sintéticos, que de arriba a abajo son: CCJ3, CCJ2, CCJ1, CCJ4, CCJ5 y CCJ6.

Se observa que la cepa 5 fue la única sensible a todos los péptidos sintéticos de *C. californicus*, que las cepas 8 y 9 mostraron sensibilidad al péptido CCJ3, y que el péptido CCJ3 fue el que tuvo actividad sobre el mayor número de cepas.

Capítulo 8

Discusión

En general, puede decirse que los procedimientos seguidos con fracciones y subfracciones fueron adecuados, ya que permitieron obtener resultados que apoyan la hipótesis de que el crecimiento de *Mycobacterium bovis* puede ser inhibido por una o más toxinas del veneno de *Conus californicus*. En adición a esto, los resultados obtenidos con péptidos sintéticos ilustraron el modo en que una investigación puede crecer en líneas no previstas originalmente aprovechando circunstancias y conexiones que se fueron dando en el transcurso del trabajo.

8.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de fracciones y subfracciones del veneno total de *Conus californicus*.

La actividad inhibitoria encontrada en las fracciones 7 y 8 de veneno total, podría estar relacionada a la actividad anteriormente descrita de estas fracciones sobre *M. tuberculosis* (Bernaldez, 2013). Se sabe que las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* tienen una homología del 99,5% en su genoma, y poseen una secuencia idéntica de la subunidad 16s del ARNr (Böddinghaus *et al.*, 1990; Fröthingham *et al.*, 1994; Sreevatsan *et al.*, 1997). Sin embargo, difieren ampliamente en la preferencia de sus hospederos, fenotipos y patogenicidad (Brosch *et al.*, 2002; Garnier, *et al.* 2003) por lo que no necesariamente el hecho de tener actividad sobre *M. tuberculosis* significa que tendrá actividad sobre *M. bovis*.

En trabajos anteriores (Juarez, 2005), se encontró actividad de fosfolipasa en las fracciones 10, 11 y 12, de veneno total de *C. californicus*, mismas en las que se encontró actividad sobre *M. bovis* en esta tesis. Por lo que es posible suponer que la actividad de fosfolipasa sea la que dañe la membrana de *M. bovis*.

El hecho de haber encontrado actividad en todas las subfracciones de la fracción 10-12 de veneno de *C. californicus*, y determinar su CMI, no implica que se tenga conocimiento de qué componente en específico es el causante de dicha actividad. Debido a que existen alrededor de 200 componentes diferentes en el veneno de cada especie de *Conus* (Olivera, 2006), podrían ser uno o más los compuestos involucrados en la actividad de inhibición. Inclusive se han descrito péptidos con actividad sinérgica o antagónica en el veneno de *Conus*, pudiendo afectar la actividad uno del otro (Teralu y Olivera, 2004). Por todo lo anterior, sería necesario hacer la re purificación de las subfracciones con mayor actividad en más de una cepa, para determinar cuantos componentes están involucrados y evaluar cada uno para conocer su CMI, así como conocer si es bactericida o bacteriostático.

8.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de péptido sintéticos

En varios estudios se ha demostrado que existe una alta diversidad genética de cepas de *M. bovis* en las poblaciones bovinas (Steck *et al.*, 1978; Brennan, 1989; Draper, 1998 Gorocica *et al.*, 2005), lo que respalda los resultados obtenidos en esta tesis, donde se observó variación en la sensibilidad entre cepas, como fue el caso de la cepa 5 sensible a todos los péptidos sintéticos.

Por otra parte, se sabe que la diversidad genética de las cepas no solamente ocurre entre diferentes regiones de México sino también dentro de un mismo rebaño, por lo que el brote de la tuberculosis bovina en un rebaño puede ser casada por múltiples cepas de *M. bovis* (Perumaalla *et al.*, 1996). De este modo, se entiende la importancia de estudios epidemiológicos genéticos de *M. bovis*, que resultarían una herramienta de gran utilidad en la búsqueda de un compuesto con actividad sobre esta micobacteria.

El haber encontrado actividad de inhibición en el péptido sintético de anémona sobre cepas diferentes de *M. bovis*, es concordante con trabajos anteriores donde se comprobó actividad antifúngica en extractos crudos de anémona (Munro, 2005), por lo que se sugiere continuar con esta línea de investigación.

Finalmente el hecho de haber encontrado, en la revisión de antecedentes, discrepancias entre los datos mostrados por SAGARPA y SENASICA en cuanto al grado de prevalencia de tuberculosis de ganado en México, sugiere que estos criterios deberían cotejarse cuidadosamente de manera paralela, por las implicancias prácticas que conlleva, porque según el grado se aplican diferentes requisitos más o menos rigurosos antes de movilizar los hatos.

Conclusiones

Los procedimientos seguidos con fracciones y subfracciones fueron adecuados, ya que permitieron obtener resultados que apoyan la hipótesis de que el crecimiento de *Mycobacterium bovis* puede ser inhibido por una o más toxinas del veneno de *Conus californicus*.

El empleo de péptidos sintéticos, en la medida en que estén disponibles, e independientemente de que provengan de entidades diferentes al género *Conus*, puede ser un recurso metodológico a tener en cuenta en futuros estudios. La variación que se mostró en la sensibilidad entre cepas refuerza la idea de que estudios epidemiológicos genéticos de *M. bovis*, resultarían una herramienta de gran utilidad en la búsqueda de un compuesto con actividad sobre esta micobacteria. Los datos sobre el grado de prevalencia de la tuberculosis en el ganado bovino de diferentes regiones de México, ofrecidos por parte de diferentes agencias de gobierno, deberían ser consistentes entre sí, debido a las implicancias prácticas que esto conlleva.

Referencias bibliográficas

Acosta R., Estrada C. y Milian F. 2009. Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión. Téc. Pecu. Méx. 47(4): 389-412.

Álvarez N., Borreo R., Padron M., Martínez I., Acosta M., García M., Echemendía M., Montoso E., Mohd N., Sarmiento M. y Acosta, A. 2009. Obtención y caracterización parcial de un extracto lipídico de la membrana externa de *Mycobacterium Smegmatis*. Vaccimonitor. 18 (1): 15-19.

Antuch, W., Berndt, K., Chavez, M., Delfin, J., and K. Wuthrich. 1993. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Eur. J. Biochem. 212 (3): 675-684.

Bernáldez J. 2013. Aislamiento y caracterización de toxinas de caracoles marinos del género *Conus* con actividad en *Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de Doctorado, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Recuperado de: <http://www.biblioteca.cicese.mx>

Böddinghaus B., Rogall T., Flohr T., Blocker H., Bottger E. 1990. Detection and identification of Mycobacteria by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. 28 (8): 1751-1759.

Brennan PJ. 1989. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev. Infect. Dis. 11 (2): 420-430.

Brennan P. y Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacteria. Rev. Biochem. 64: 29-63.
Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Brennan+P.+y++Nikaido+H.+1995.+The+envelope+of+mycobacteria.+Rev.+Biochem.+64%3A+29-63>.

Brosch R., Gordon S., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons M., Pym S., Samper S., Van Soolingen, D., Cole, S. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium- tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. 99(6): 3684–9.

Castañeda O., Sotolongo V., Amor A., Stockin R., Anderson A, Harvey A, Engstrom A, Wernstedt C and Karlsson E. 1995. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Toxicon. 33 (5): 603-613.

Cervantes K. L. 2013. Aislamiento y caracterización del péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género *Conus*. (Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California). Recuperado de www.biblioteca.uabc.mx

Chag G., Spencer R., Lee A., Barclay M., and Reest D. 1998. Structure of the Mscl Homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A Gated Mechanosensitive ion Channel. *Science*. 282 (5397): 2220-6.

Clavijo A., Alfaro C., Corso M., y Rolo M. 2004. Todo lo que usted debe saber sobre la tuberculosis bovina. *Rev. CENIAP. Número especial*. Recuperado de: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/clavijo_a/arti/clavijo_a.htm

CNOG (Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas). Recuperado el 18 de marzo del 2013 de: www.cnog.com.mx

Coll P. 2003. Farmacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21 (6): 299-208.

Crick D., Mahapatra S., Brennan P. 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiol.* 11 (9): 107-118.

De Kantor I.N., Alvarez E. 1991. Current status of bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean. Buenos Aires: Pan American Zoonoses Center. Special Publication. 10.

De Kantor I.N., Ambroggi M., Poggi S., Morcillo N., Da Silva A., Osorio M., Garzon C., Llerena C., Ribon W., Garcia V. 2008. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*. 88 (4): 358-365.

De Kantor I., and Ritacco V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and the Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* 112 (2): 111-118.

De Kantor I., and Ritacco V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 40 (1) : 5-14.

De Kantor I., LoBue P., Thoen C. 2010. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *Int. J. Tuberc. Lung dis.* 14 (11): 1369- 1373

Delfin J., Gonzalez Y., Diaz J., and Chavez M. 1994. Proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*: purification, characterization and immobilization. *Arch. Med. Res.* 25 (2): 199-204.

Diaz F., Banda V., Jaramillo L., Arriga C., González D y Estrada C. 2002. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *UNAM. Vet. Mex.* 34 (1): 13-26.

Draper P. 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.* 15 (3): 1253- 1261.

Escobar E., Flores L., y Rivera C. 2008. Peptidos antibacterianos de los venenos de *Hadruidoidea mauryi* y *Centruroides margaritatus*. *Rev. Peru. Biol.* 15(1): 139-142.

- Esteban J., Robles P., Soledad J., Fernández L. 2005. Pleuroneumony infections caused by *Mycobacterium-bovis*: a reemerging disease. Clin. Microbiol. Infect. 11 (10): 840-843.
- Estrada C., Mancilla R., Arriaga C., Pérez R., y Diaz F. 2001. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. Vet. Mex. 32 (3): 207-211.
- Finney A., Kung C., Yoshimura K., and Meng-Chiang M. 2002. Gating the bacterial Mechanosensitive channel MscL in vivo. PNAS. 99 (8): 5643-5648.
- Fröthingham R., Hillis H.O., Wilson K.H. 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 32 (7):1639-1643.
- Garateix A. 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. BUAP. Elementos: Ciencia y cultura. 1 (58): 37-39.
- Garateix A., Salceda E., Soto E., y Garcia T. 2003. Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nervioso. Avicennia. 16: 6-12. Recuperado de : <http://www.fisio.buap.mx/laboratorios/sensorial/pdf/2003%20Garateix%20-%20Avicennia%206-12%20Compuestos%20marinos.pdf>
- Garateixa A., Castellanos M., Hernández J., Mása R., Menéndez R., Romerob L., Chávez M. 1992. Effects of a high molecular weight toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* on cholinergic responses. Comparative pharmacology. 103 (2): 403-409.
- Garateixa A., Garciab M., Menéndez R., Masa R., and Chavezb M. 1990. Effects of a high molecular weight polypeptidic toxin from *Physalia physalis* (Portuguese man-of-war) on cholinergic responses. Comparative pharmacology. 95 (1): 63-69.
- Garateix A., Vega R, Salceda E, Cebada J, Aneiros A and Soto E. 2000. BgK anemone toxine inhibits outward K currents in snail neurons. Brain research. 864 (2): 312-314.
- Garateix A, Flores A, García-Andrade J., Palmero A., Aneiros A., Vega R., and Soto E. 1996. Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculifera*. Toxicon. 34 (4): 443-450
- Garateix A., y Rodriguez A. 2010. Las anémonas marinas como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas. Revista electrónica de la Agencia del Medio Ambiente. 10 (19): 1683-8904.
- García R., Lado R., TúnezV., Pérez M., y Cabarcos A. 2003. Tratamiento actual de la tuberculosis. An. Med. Interna (Madrid). 2 (20) : 91-100.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes

R., Keating L., Wheeler P., Parkhill J., Barrell B., Cole S. T., Gordon S. V., and Hewinson R. 2003. The complete genome sequence Of *Mycobacterium-bovis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 100 (13): 7877-7882.

Gibson A., Hewinson G., Goodchild T., Watt B., Story A., Inwald J., and Drobniowski F. 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium-bovis* in humans in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 42 (1): 431-434.

Gibson A., Hewinson G., Goodchild T., Watt B., Story A., Inwald J., and Drobniowski F. 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 42 (1): 431-43

Giménez J., y Rivera S. año 2010. La tuberculosis bovina en Venezuela: patógenesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. REDVET. 11(9). Recuperado de: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090910/091007.pdf>

Gorocica P., Jiménez M., Garfias Y., Sada I., y Lascurain R. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev. Inst. Enf. Resp. Mex. 18 (2): 142-153.

Gutiérrez M., Saper S., Jimenez M.S., VanEmbden J., Garcia M., Martin C. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium-bovis* strains. J. Clin. Microbiol. 35(12): 3328- 3330.

Juarez, Karla. 2005. Caracterización electrofisiológica del veneno del caracol marino *Conus californicus* en canales iónicos de potasio. (Tesis de maestría, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Recuperado de: <http://www.biblioteca.cicese.mx>

Kartmann B., Niederweis M., and Stengler S. 1999. Porins in the cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriology. 181 (20): 6543-6546.

Kaur D., Guerin M., Skovierová H., Brennan P., and Jackson M. 2009. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium-tuberculosis*. Adv. Appl. Microbio. 69: 23-78. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3066434/>

Kubica T., Rüsç S., and Niemann S. 2003. *Mycobacterium bovis* susp. *Caprae*. Causes One Third of Human *M.-bovis*. Associated Tuberculosis Cases. Reported in Germany between 1999 and 2001. J. Clin. Microbiol. 35 (12): 3328.

Landeros B. 2000. Desarrollo de un ensayo de diagnóstico para la detección de *M. tuberculosis* utilizando Nested-PCR. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California). Recuperado de : www.biblioteca.uabc.mx

Lanio M., Moreira V., Álvarez C., Tejuca M., Gómez T., Pazos F., Besada V., Martínez D., Huerta V., Padrón G., and M. Chávez. 2001. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. Toxicon. 39 (2): 187-194.

- Le Dain A., Saint N., Kloda A., Ghanzi A., and Martinac B. 1998. Mechanosensitive ion channels of the archaeon *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.* 273 (20): 12116-12119.
- LoBue P., Betacourt W., Peter C., and Moser K. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium- bovis* disease in San Diego County in 1994- 2000. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 7 (2): 180–185.
- López L. , Díaz F., VallecilloA., Esquivel H., y Gutiérrez J. 2006. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre su virulencia hacia herramientas para su control. *Rev. ALAM.* 48 (2): 173-178
- López C., Rentería T., Williams J., Licea A., Valle A., y Medina G. 2010. Field Evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science, Elsevier.* 88 (1): 44-49.
- Marshall J., Sweedler J., Bingham J., Rubakhin S., Kelley W., and Gilly W. 2002. Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus*. *Biol. Bull.* 203 (1): 27–41.
- McIntosh J., and Jones R. 2001. Cone venom-from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon.* 39 (10): 1447-1451.
- Medeiros M., Dos santos L., Dray C., Eustáquio E., and Walter F. 2010. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 41 (3): 531-541.
- Milián F., Pérez G., Arriaga D., y Escartín C. M. 2010. Molecular epidemiology of human cases of TB by *Mycobacterium- bovis* in México. *Prev. Vet. Medicine.* 97 (1): 37–44.
- Milián F., Rubio Y., Cantó G., Olvera A., Pizano O., Pérez L., Estrada C., García L., González J., y Valdez G. (2013). La tuberculosis bovina en México: bases. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.
- Munro D. 2005. Análisis del efecto de toxinas *Anthopleura elegantissima*, *Conus californicus* y *Auronoctonus phaiodactylus* en *Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California). Recuperado de: <http://www.biblioteca.cicese.mx>
- Niederweis M. 2008. Nutrient acquisition by mycobacteria. *Microbiology.* 154 (3): 679–692.
- Niederweis M., Danilchanka O., Huff J., Hoffmann C., and Engelhardt H. 2010. Trends *Microbiol.* 18 (3): 109-116.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. 1995. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. México.

OIE (World Organization for Animal Health). Recuperado el 12 de abril del 2004 en : www.oie.int/eng/maladies/en_alpha.htm; www.oie.int/eng/info/en_infoan.htm

OIE (World Organization for Animal Health). Recuperado el 20 julio del 2012 en : www.oie.int/eng/maladies/en_alpha.htm; www.oie.int/eng/info/en_infoan.htm

Olivera B. 1996. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drugs design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell.* 8 (11): 2101–2109.

Olivera B. 1997. Conus Venom Peptides, Receptor and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50Million Years of Neuropharmacology Essay. *Molecular Biology of the Cell.* 8 (11): 2101–2109.

Olivera B., and Norton R. 2006. Conotoxins down under. *Toxicon.* 48 (7): 780–798.

Pérez L., Millán F., Arriaga C., Romero C., y Escartín M. 2008. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud pública Méx.* 50 (4): 286-291 .

Perumaalla V., Adamas L., and Payeur J. 1996. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Texas and Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 34 (9): 2066-2071.

Ritacco V., López B., De Cantor, Barrera I., Errico F., and Nadera. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Vet. Sci.* 50 (3): 365-367.

Rodwell T., Moore M., Moser K., Brodine S., and Strathdee S. 2008. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. 14 (6). Recuperado de: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/6/07-1485.htm>

Romero A., Arriaga C., Estrada C., Guevara J., García J., y Torres R. 2005. Confirmación de la excreción de *Mycobacterium Bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero. *Vet. Mex.* 37 (1): 137-143.

SAGARPA (Secretaría Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, pesca y Alimentación). Recuperado el 27 de enero del 2014: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=801>

SAGARPA (Secretaría Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, pesca y Alimentación). Recuperado el 11 julio del 2013: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=801>

SAGARPA (Secretaría Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, pesca y Alimentación). Recuperado el 23 de febrero del 2012: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=801>

SAGARPA (Secretaría Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, pesca y Alimentación). Recuperado el 15 de agosto del 2006: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=801>

Salceda E., Garateix A., and Soto E. 2002. The sea anemone toxins BgII and BgIII prolongs the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303 (3): 1067-74.

Salceda E., Pérez-Castells J., López-Méndez B., Garateix A., Salazar H., López O., Aneiros A., Standker L., Béress L., Forssmann W.G., Soto E., Jimenez-Barbero J., Giménez-Gallego G. 2007. CgNa, a type I toxin from the giant Caribbean sea anemone *Condylactis gigantea* shows structural similarities to both type I and type II toxins, as well as distinctive structural and functional properties. *Biochem. J.* 406 (1): 67-76.

SENASICA (Servicio nacional de Sanidad, inocuidad y calidad Agroalimentaria). Tuberculosis bovina, situación actual 2009. Recuperado el 10 julio del 2009 en : <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>

SENASICA (Servicio nacional de Sanidad, inocuidad y calidad Agroalimentaria) Tuberculosis bovina, situación actual 2013. Recuperado en 27 julio del 2013 en : <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>

SENASICA (Servicio nacional de Sanidad, inocuidad y calidad Agroalimentaria) Tuberculosis bovina, situación actual 2014. Recuperado en 15 enero del 2014 en : <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera). Recuperado el 20 de enero del 2013 en : http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/bovino.pdf

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera). Recuperado el 3 de agosto del 2012 en : http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/bovino.pdf.

Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K., Connell N., Kreiswirth N., Whittam T., and Musser J. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (18): 9869–9874.

Steck P., Schwartz M., Rosendhal G., and Gray R. 1978. Mycolic acids: a reinvestigation. *Biol. Chem.* 253 (16): 5625- 5709.

Terlau H., and Becker S. 2008. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (1): 1–9.

Thoen C., Lobue P., and De Kantor I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.* 112 (2): 339-345.

Toledo P., Milian F., Santillán M., y Ramírez I. 1999. Aislamiento e Identificación de *Mycobacterium Bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con pacientes con problemas de respiración crónicos. *Vet. Mex.*30 (3): 227-229.

Wolfe L., Mahaffey, S., Kruh, N., Dobos, K. 2010. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Proteome. Res. 9 (11): 5816-5826.

Anexos

Anexo 1. Preparación del medio líquido para *M. bovis*.

Se pesa 4.7g de medio deshidratado Middlebrook 7H9 sin glicerol y se disuelve en 900ml de agua destilada estéril, se transfiere a matraces Erlenmeyer y se esteriliza a 121 °C, a una presión de 1.3 bars durante 15 minutos. Cuando el medio este frío se adiciona el OADC hasta lograr una concentración final del 10 %. Finalmente se realiza el control de esterilidad incubando el medio a 37°C durante 72h, el medio debe permanecer estéril sino es el caso se debe desechar y preparar nuevo. El medio se conserva a 4°C hasta su utilización.

Anexo 2 . Preparación del estándar de Mc. Farland #1

A. Disolución de ácido sulfúrico 1%

Depositar aproximadamente 90mL de agua desionizada en un matraz volumétrico de 100 ml, con una pipeta volumétrica de 1mL agregar 1.0 mL de H₂SO₄ concentrado. Aforar a 100ml con agua desionizada y mezclar. Almacenar en una botella de vidrio con tapón de rosca hasta por un año.

B. Disolución de cloruro de bario 1.175 %

Pesar 1.175g de cloruro de bario dihidratado y depositarlo en un matraz volumétrico de 100ml. Añadir aproximadamente 50ml de agua desionizada y mezclar bien para disolver. Aforar a 100ml Con agua desionizada y mezclar. Almacenar en una botella de vidrio con tapón de rosca hasta por un año.

Para preparar los tubos a las concentraciones deseadas seguir las indicaciones de la tabla.

Concentración de los estándares de la escala de Mc. Farland.

Estándar de Mc. Farland.	Ba Cl ₂ 1.175% (ml)	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Número aproximado de bacterias (x10 ⁶)/ml
0.5	0.5	99.5	
1	1	99	300
2	2	98	600
3	3	97	900
4	4	96	1200
5	5	95	1500
6	6	94	1800
7	7	93	2100
8	8	92	2400
9	9	91	2700
10	10	90	3000

Registrar la densidad óptica a 625nm de los estándares para control.

