

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



DETERMINACIÓN DEL PERFIL INMUNE (Th1 y Th2) MEDIANTE ANÁLISIS DE CITOCINAS EN CALOSTRO BOVINO DE RANCHOS LECHEROS DEL ESTADO DE JALISCO CON ALTA PREVALENCIA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*

TRABAJO DE TITULACION EN MODALIDAD DE

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO SÁNCHEZ SOTO



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. JOSÉ EDUARDO SÁNCHEZ SOTO
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción TESIS con el título: "DETERMINACIÓN DEL PERFIL INMUNE (Th1 y Th2) MEDIANTE ANÁLISIS DE CITOCINAS EN CALOSTRO BOVINO DE RANCHOS LECHEROS DEL ESTADO DE JALISCO CON ALTA PREVALENCIA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a: Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez y como asesor a: Dra. Lucila Méndez Moran.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo. Recoger

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 28 de marzo de 2015


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION




DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

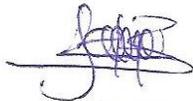
Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción Tesis con el título: "DETERMINACIÓN DEL PERFIL INMUNE (Th1 y Th2) MEDIANTE ANÁLISIS DE CITOCINAS EN CALOSTRO BOVINO DE RANCHOS LECHEROS DEL ESTADO DE JALISCO. CON ALTA PREVALENCIA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*" que realizó el pasante José Eduardo Sánchez Soto con número de código 303808238 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

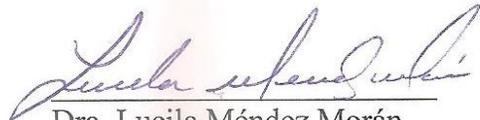
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Guadalajara, Jalisco., 24 de abril del 2015



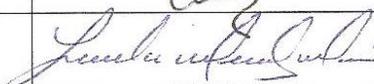
Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez
 Director/a del trabajo



Dra. Lucila Méndez Morán
 Asesora

COMITE DE
 TITULACION



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		28 Abril 2015
Dra. Galina Petrovna Zaitseva		12/05/2015
Dr. Edgardo Flores Torales		28 Abril/2015
Dra. Lucila Méndez Morán		28 abril. 2015



Para que pueda surgir lo posible es preciso

Intentar una y otra vez lo imposible.

Hermann Hesses

El presente trabajo se realizó en el laboratorio denominado “ala norte” del edificio de biotecnología correspondiente al departamento de Biotecnología Médica Farmacéutica de CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.; este es un centro público de investigación perteneciente a la red de centros de desarrollo de innovación tecnológica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). El trabajo experimental fue realizado bajo la dirección de la Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez con el apoyo económico del **FOMIX-JALISCO clave: 2009-05-123895** del proyecto: “Evaluación de la inmunidad pasiva materna contra la tuberculosis bovina (*M. Bovis*) en el calostro de vacas de hatos lecheros del estado de Jalisco”



AGRADECIMIENTOS

A dios, por ser mi fuerza espiritual para retomar el camino en tantas ocasiones y superar grandes obstáculos, retos y miedos no solo en mi carrera sino a lo largo de mi vida personal y académica, por permitirme contar en esos momentos con el apoyo incondicional de mi familia y amigos.

A mi padre que gracias a su esfuerzo, cariño y apoyo me impulso a terminar un ciclo más en mi formación, así como a mis dos hermanas que siempre estuvieron dandome esas palabras motivantes y consejos que nunca estuvieron de más para afrontar los problemas que se me cruzaron en este camino.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco a la unidad de Biotecnología Medica Farmacéutica donde se llevó a cabo el presente trabajo haciendo uso de sus instalaciones y equipos.

A la Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, su disponibilidad de tiempo y asesoría por permanecer al tanto de que realizara adecuadamente los trabajos experimentales y ayudarme a resolver las dudas que surgieran en el proceso, por su paciencia, consejos y apoyo así como por la invaluable amistad que me brindo fuera y dentro del laboratorio y las facilidades otorgadas para llevar a cabo el proyecto.

A la Dra. Lucila Méndez Moran por tenerme tanta paciencia desde que tome su clase y tenerla como tutora de la carrera; por su amistad y aprecio que ha demostrado al estar tan dispuesta a brindarme su ayuda al recorrido de todo este largo y laborioso proceso de mi formación así como su apoyo y consejos en aspectos escolares y personales.

A mis tíos Abel, Eva e Irene; a mis primos: Evelyn, Heber, Bruce, Mayra, Ivon y Cristina; a mis amigos: Albertina, Marco, Elizabeth, Ángela, Mireya, Paola, Alejandra, Laura, Hugo, Alfredo, Fernando, Rosa, Guadalupe, Stefany, Karen, Víctor y Michel por permitirme ser parte de sus vidas y compartir conmigo triunfos y fracasos. Su amistad, apoyo y cariño fue vital para poder cumplir esta meta.

Y por último, pero no menos importante, a la Universidad de Guadalajara que me formo académicamente dándome las herramientas, valores y conocimientos necesarios para valorar y enorgullecerme de mi carrera biología que me ha dado tantas satisfacciones y aprendizajes en todos los aspectos además agradezco a todos y cada uno de mis profesores y compañeros que me ayudaron y acompañaron a lo largo de la carrera así también agradezco al Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez, a la Dra. Galina Petrovna Zaitseva y al Dr. Edgardo Flores Torales por su tiempo y dedicación en la revisión de mi trabajo, por sus enseñanzas durante mi carrera y por su apoyo al concluirla.

DEDICATORIAS

A mis padres Virginia Soto Rentería † que aunque ya no esté con nosotros fue parte fundamental para mi formación ya que el tiempo que estuvo me enseñó que siempre hay que ser perseverante por lo que uno quiere y nunca darse por derrotado todo se puede mientras uno se lo proponga conseguirlo y a José Reyes Sánchez Rodríguez este logro es de ustedes y para ustedes por su apoyo incondicional que ha sido, es y será lo más motivante e indispensable para continuar y por todos los sacrificios que han hecho para darme una profesión; gracias por el inmenso amor que me han tenido desde el momento en que me permitieron llegar a este mundo y convertirme en lo que hoy soy; es la primera de muchas metas y espero que dios nos dé tiempo suficiente para compartirla. Los quiero y amo.

A mis hermanas Sandra y Jaqueline por contar con su apoyo y amor ha sido y será indispensable para seguir cosechando éxitos, espero que nos mantengamos siempre unidos y que con el paso de los años ustedes también se sientan orgullosas de mí como yo de ustedes y me permitan estar a su lado apoyándolas para que puedan cumplir todas sus metas; nunca se conformen cuando sepan que aún pueden dar más, así como a mis sobrinos: Lesly, Milton, Irvin y a mi cuñado que de forma directa o indirecta también fueron de gran apoyo. ¡Los quiero y amo!

A mis tíos Abel, Eva, Gerardo, Estela e Irene por estar siempre al pendiente de mi bienestar por alentarme a seguir con mis estudios y hacerme sentir en casa. Gracias por su paciencia, cuidados, apoyo y amor.

A mis primos Evelyn, Heber, Bruce, Cristina, Mayra e Ivon que nunca me dejaron solo y me han demostrado su cariño, su preocupación, su interés y sobre todo su apoyo incondicional. Ustedes son el ejemplo de que todos los momentos difíciles pasan y que no hay enfermedad o situación que no se pueden superar con fortaleza y fe.

Y a mis amigos Albertina, Elizabeth, Marco, Ángela, Alfredo, Mireya, Hugo y Stefany por su gran apoyo y que siempre están presentes tanto en las buenas como en las malas para apoyarme, cuidarme, contagiarme de su alegría y darme todo su aprecio, cariño y sincera amistad además de compartir la mayor parte de los días conviviendo buenos y apreciables momentos convirtiéndose en mi segunda familia.

CONTENIDO

	Pagina
ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	VIII

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Producción lechera en contexto internacional, nacional y estatal.	2
2.2 Sistemas de producción de leche y becerras.....	4
2.3 Calostro bovino.....	5
2.3.1 Composición del calostro.	5
2.3.2 Calostro y componentes con actividad biológica.....	7
2.3.3 Calostro y componentes inmunes.....	10
2.3.4 Modulación del sistema inmune maternal bovino durante el embarazo.....	11
2.4 Glándula mamaria bovina y células	12
2.4.1 Células PMN e infección en glándula mamaria.....	14
2.4.2 Glándula mamaria, células y componentes inmunes.....	15
2.4.3 Distribución de células y componentes inmunes en la glándula mamaria.....	17
2.5 Inmunidad pasiva.....	18
2.5.1 Importancia de la ingesta de calostro por becerros.....	20
2.5.2 Desarrollo del sistema inmune intestinal (becerro) y calostro.....	20
2.5.3 Absorción intestinal de componentes inmunes.....	21
2.5.4 El calostro como defensa contra patógenos.....	23
2.5.5 Transmisión de enfermedades por calostro.....	23
2.6 Tuberculosis bovina.....	24
2.6.1 Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.6.2 <i>Mycobacterium bovis</i>	25
2.6.3 Métodos de diagnóstico de <i>M. bovis</i>	26
2.6.4 Situación epidemiológica, prevalencia y programas de erradicación de TBb en México y Jalisco.....	28
2.6.5 Vías de infección de TBb.....	30
2.6.6 Infección de TBb por vía digestiva.....	32
2.6.7 Calostro como posible fuente de transmisión de la TBb.....	32
2.7 Linfocitos T.....	33
2.7.1 Linfocitos T en respuesta a TBb.....	34
2.7.2 Citocinas	35
2.7.3 Citocinas en calostro.....	40

3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
4.	JUSTIFICACIÓN.....	43
5.	HIPÓTESIS.....	45
6.	OBJETIVOS.....	46
6.1	Objetivo general.....	46
6.2	Objetivos específicos.....	46
7.	MATERIALES Y METODOS.....	47
7.1	Estrategia experimental.....	47
7.2	Grupos de estudio.....	48
7.3	Muestras de suero de calostro.....	49
7.4	Determinación de citocinas por ELISA.....	49
7.4.1	Estandarización y determinación de IL-4.....	49
7.4.2	Determinación de IFN- γ	50
7.4.3	Determinación de IL-6.....	51
7.4.4	Determinación de TNF- α	52
7.5	Análisis de perfiles proteicos de suero de calostro.....	54
7.5.1	Cuantificación de proteínas para geles de poliacrilamida.....	54
7.5.2	Gel de Poliacrilamida.....	54
7.5.3	Concentración de proteínas de suero de calostro.....	55
7.5.4	Precipitación con acetona.....	56
7.5.5	Western Blot.....	56
7.6	Análisis estadístico.....	57
8.	RESULTADOS.....	58
8.1	Resumen de resultados.....	70
9.	DISCUSIÓN.....	71
10.	CONCLUSION.....	76
11.	EXPECTATIVAS.....	76
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	77

❖ ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de leche en los principales países del mundo, toneladas, 2011.	2
Figura 2. Distribución de la actividad ganadera en el estado de Jalisco.	3
Figura 3. Etapas de becerras-vaca; periodos de producción.....	4
Figura 4 Composición y estructura de la glándula mamaria.	14
Figura 5. Sistema circulatorio de sangre periférica hacia glándula mamaria.	17
Figura 6. Absorción intestinal de componentes inmunes con respecto al tiempo. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 7. Resumen de pruebas y métodos de diagnóstico e identificación para <i>M. bovis</i>	27
Figura 8. Tuberculinización de bovino ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 9. México dividido por zonas de control y erradicación por su prevalencia a tuberculosis bovina.....	29
Figura 10. Situación actual de prevalencia a Tuberculosis bovina del estado de Jalisco.	30
Figura 11. Vías de infección de la tuberculosis bovina.	31
Figura 12. Infección de <i>Mycobacterium bovis</i> en bovino.....	34
Figura 13. Características funcionales de citocinas ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 14. Estrategia experimental de la evaluación de citocinas	47
Figura 15. Niveles de IL-4 [pg/ml] en sueros de calostro de los grupos:	62
Figura 16. Niveles de interferón gamma [pg/mL] en suero de calostro.	63
Figura 17. Niveles de interleucina 6 [pg/ml] en suero de calostro.....	64
Figura 18. Niveles de Factor de Necrosis Tumoral alfa [pg/ml] en suero de calostro	65
Figura 19. Niveles de citocinas [pg/ml] en sueros de calostro del grupo de estudio rectoras PPD (+) agrupadas por número de partos	66
Figura 20. Niveles de citosinas [pg/ml] en sueros de calostro del grupo de estudio No Reactoras PPD (-) agrupadas por el número de partos.....	67
Figura 21. Gel de poliacrilamida 12 %	68

Figura 22. a) Gel de poliacrilamida de proteínas concentradas con unidad de filtración de un grupo de muestras altas en IL-4	69
Figura 23. Resumen del predominio del perfil inmune por los niveles de IL-4 e IFN- γ	72
Figura 24. Resumen de citocinas proinflamatorias.....	74

❖ ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Producción de leche en México por principales entidades federativas.....	3
Cuadro 2. Composición del calostro bovino después de: 1, 2 y 3 días después del parto; comparación con leche madura.	6
Cuadro 3. Principales componentes del calostro y la leche bovina por litro.....	7
Cuadro 4. Proporciones celulares en glándula mamaria.	14
Cuadro 5. Citocinas y funciones en glándula mamaria sana.	15
Cuadro 6. Tipo de placentación por especie y transferencia (Roa et al, 2012).	19
Cuadro 7. Criterios de inclusión y exclusión de muestras y grupos de estudio.....	48
Cuadro 8. Curva estándar de interleucina-4.....	50
Cuadro 9. Curva estándar de interferón gamma.	51
Cuadro 10. Curva estándar de interleucina-6.....	52
Cuadro 11. Curva estándar de factor de necrosis tumoral alfa.....	53
Cuadro 12. Curva de BSA.....	54
Cuadro 13. Gel separador de poliacrilamida al 12%.....	54
Cuadro 14. Gel concentrador de poliacrilamida.....	55
Cuadro 15. Grupos de estudio	58
Cuadro 16. Resumen de niveles de citocinas de vacas reactoras, [pg/mL] de todas las muestras del grupo de estudio.....	59
Cuadro 17. Resumen de niveles de citocinas de vacas NO reactoras, [pg/mL] de todas las muestras del grupo de estudio.	60
Cuadro 18. Resumen de niveles de citocinas de vacas Hato Libre [pg/mL] de todas las muestras del grupo de estudio.....	61

❖ ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µL	Micro litros
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAAR	Bacilo acido alcohol resistente
BCG	Bacillus de Calmette y Guerin, vacuna contra la tuberculosis
BSA	Albumina de suero bovino
CO ₂	Dióxido de carbono
CPA	Células presentadoras de antígenos
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
CS	Células somáticas
DO	Densidad óptica
DM	Materia seca
DR	Espaciadores de secuencia repetida
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Hormonas de crecimiento epidérmico
ELISA	Prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas
ELISPOT	Ensayo de puntos por inmunoabsorbancia unida a enzimas
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
FAOSTAT	División de estadística de la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
Fc	Receptor de superficie de membrana de algunas células para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas
G	Gravedad específica
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GH	Hormona de crecimiento

HL	Hato libre
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
IFN	Interferón
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina tipo A
IGF-I	Factor de crecimiento insulina tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento insulina tipo II
IgG1	Inmunoglobulina tipo G subclase I
IgG2	Inmunoglobulina tipo g subclase II
IgM	Inmunoglobulina tipo M
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleucinas
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de masa corporal
Kb	Kilo base
kDA	Kilo Dalton
L	Linfocitos
LPS	Lipopolisacaridos
M	Molar
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
mg	Miligramos

min	Minutos
ml	Mililitro
M ψ	Macrofagos
NBT	Cloruro de nitroazul tetrazolio
ng	Nanogramos
NGS	Suero normal de cabra
NK	Natural killer
nm	Nanómetros
NMWL	Límite de peso molecular nominal
NOM	Norma oficial Mexicana
PBS	Buffer fosfatos salinos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Pico gramos
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PPD	Derivado proteico purificado (de tuberculina)
PRP	Péptido rico prolina
PSA	Perfulfato de amonio
R	Rancho
RFLP	Polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de cadena de la polimerasa tiempo real
SAGARPA	Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
SA-HRP	Estreptavidina peroxidasa de rábano picante
SC	Glicosilada polipeptida
ScFOS	Cadena corta fructooligosacaridos
SCN	Sistema nervioso central
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Spp	Especie

TA	Temperatura Ambiente
TB	Tuberculosis
TBb	Tuberculosis bovina
Tc	Células T citotóxicas
TDM	Tetrahalosa dimicalato
TEMED	N,N,N,N-tetramethylenediamine
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Células T herper o colaboradores
TLR	Receptores tipo toll
TMB	3, 3, 5,5 tetramethylbenzidine
TMM	Trihalosa monomicolato
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta
TST	Prueba cutánea de tuberculina
w	Watts de potencia
$\gamma\delta$ -T	Células T gamma delta

❖ RESUMEN

El calostro es la primera secreción producida por la glándula mamaria después del parto, éste contiene componentes con actividad biológica e inmune entre los cuales se encuentran en gran cantidad inmunoglobulinas y citocinas maternas, las cuales son importantes para el desarrollo del sistema inmune del becerro, ya que al nacer depende de la transferencia de estos factores inmunes de la madre por vía digestiva mediante la ingesta de calostro, el cual durante el periodo de lactancia protege a los becerros de patógenos hasta la maduración de su sistema inmune. Aun a pesar que, el paso de componentes inmunes mediante el calostro proporciona ventajas al becerro, es así también a través de la vía digestiva que se pueden transmitir algunas enfermedades por ejemplo la tuberculosis bovina (TBb), misma enfermedad crónica en los animales provocada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, la tuberculosis es una zoonosis de carácter mundial. Las citocinas son pequeñas moléculas que interactúan en diferentes sistemas y procesos, particularmente en la acción de mecanismos que producen la inflamación, regulan la intensidad de la respuesta inmune, estimulando o inhibiendo la proliferación de ciertas estirpes celulares para así éstas, secreten anticuerpos, citocinas y otras moléculas que el calostro bovino contiene. El propósito de este trabajo fue determinar los niveles de algunas de las citocinas presentes en muestras de suero de calostro de ranchos con alta prevalencia a TBb de Jalisco, los grupos de estudio fueron denominados de acuerdo a la reactividad a PPD (Derivado Proteico Purificado) mediante la prueba cutánea de tuberculina (TST), en 3 grupos de estudio, muestras de vacas: 1.- Reactoras a TST, 2.- No Reactoras a TST y 3.- Hatos Libre (HL), determinando los niveles de: interleucina 4 (IL-4), interferón-gamma (IFN- γ), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) utilizando la prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA). Los resultados de los niveles de citocinas en los diferentes grupos de estudio se analizaron estadísticamente y se observó que existe una diferencia significativa en los niveles de IL-6 entre los grupos reactivas y no reactivas a TST con el grupo de HL, así también en los niveles de TNF- α se encontró diferencia entre los tres grupos de estudio.

1. INTRODUCCIÓN

El calostro y la leche proporcionan una dieta completa al becerro recién nacido, el calostro provee los principales factores para la protección inmunológica del becerro. En los rumiantes no hay intercambio de factores inmunes a través del útero, por lo que el calostro y, en menor medida la leche proporcionan protección, a través de un alto contenido de inmunoglobulinas sin las cuales los rumiantes no podrían sobrevivir. Las inmunoglobulinas de calostro, en conjunto con la habilidad intestinal de los rumiantes en las primeras horas de vida, permiten el paso de las grandes moléculas como las inmunoglobulinas por la apertura del espacio intersticial del intestino, proporcionan al becerro una inmunización de tipo pasiva (Robinson et al, 1988). Sin embargo, tanto la concentración de inmunoglobulinas en calostro como la permeabilidad del intestino disminuyen rápida y progresivamente, cerrándose después de las 48 horas después del nacimiento. Por lo tanto, un adecuado suministro de calostro, abundante en inmunoglobulinas es esencial durante este breve periodo de tiempo para así, los becerros obtengan la inmunidad pasiva necesaria para sobrevivir hasta la madurez de su sistema inmune (Blum et al, 2000). Además de las inmunoglobulinas que son muy importantes, existen otros factores inmunes en calostro que tienen un papel importante en la protección y defensa contra organismos patógenos, tales como factores de crecimiento, bactericidas y citocinas (Barrington et al, 1997). El sistema inmune es el responsable de generar una respuesta protectora en los organismos contra cualquier patógeno, para lo que se requiere una interacción compleja de células y moléculas dirigidas a la detección y subsecuentemente la eliminación de patógenos (Davis y Drackley, 1998). Tanto el sistema inmune adaptativo o adquirido como el sistema inmune innato operan en la glándula mamaria del bovino, donde el sistema inmune innato representa la primera línea de defensa inicial protegiendo al cuerpo de infecciones antes de entrar en juego el sistema inmune adaptativo. La respuesta inmune adaptativa mediada por células T y células B depende de la memoria para la respuesta rápida a microorganismos, virus o patógenos a los que ha sido previamente expuesta. En la glándula mamaria del bovino existen mecanismos de defensa del huésped basados en el sistema inmune (Abbas y Lichtman, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Producción lechera en contexto internacional, nacional y estatal

La leche es un objeto de estudio muy importante ya que es un alimento importante para la vida y de consumo humano por sus incomparables aportaciones nutricionales. México ocupa el quinceavo lugar de mayor productor de leche con el 2.4% en volumen de producción a nivel mundial como se muestran en la figura 1.

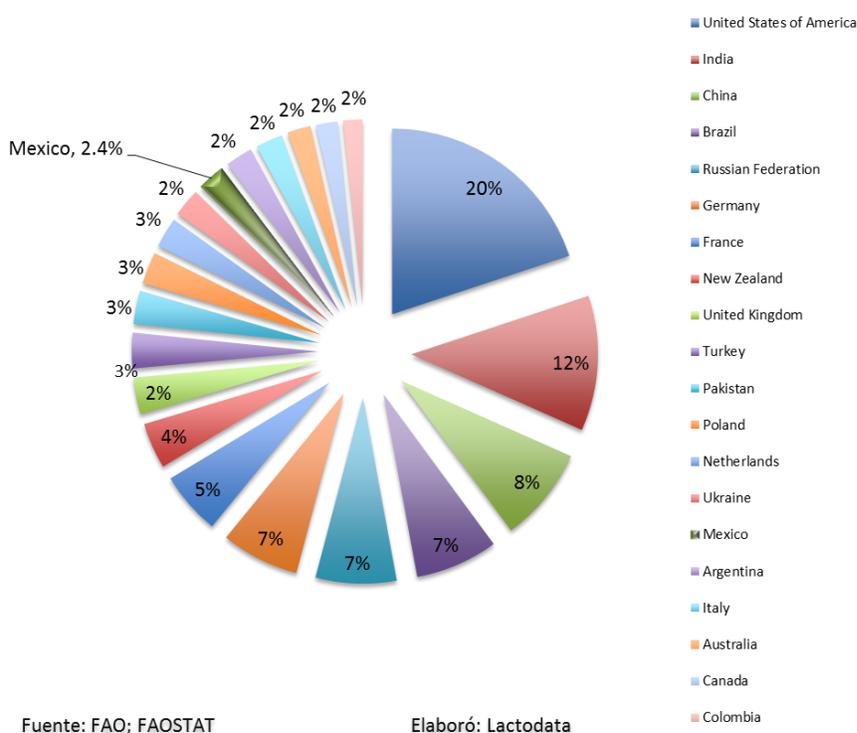


Figura 1. Producción de leche en los principales países del mundo, toneladas, 2011.

El estado de Jalisco representa la mayor cuenca productora de leche a nivel nacional. La raza de ganado Holstein Friesian es la de mayor presencia en las ganaderías con sistemas de producción alta. En el cuadro 1 se muestra la producción de leche por estado.

Cuadro 1. Producción de leche en México por principales entidades federativas.

México: Producción de leche de bovino por principales entidades federativas									
México, 1980 - 2013									
Clave	Entidad	1980	1990	2000	2010	2011p	2012	2103 pronóstico	2010_2012
14	Jalisco	953,276	1,120,400	1,678,175	1,960,999	1,991,577	2,024,969	2,034,036	1,992,515
05	Coahuila de Zaragoza	418,730	325,724	863,752	1,243,058	1,275,065	1,287,917	1,321,212	1,268,680
10	Durango	352,801	343,947	901,137	1,001,137	997,155	1,037,911	989,210	1,012,068
08	Chihuahua	381,783	467,431	735,251	934,928	930,020	979,502	982,485	948,150
11	Guanajuato	402,764	499,390	629,292	775,108	784,770	789,759	744,527	783,212
30	Veracruz delgnacio de la Llave	531,361	549,468	654,832	722,465	723,106	717,290	709,684	720,954
15	México	638,981	304,519	468,953	478,261	482,082	468,733	469,762	476,359
21	Puebla	266,523	260,400	354,869	403,100	404,132	425,770	435,601	411,001
07	Chiapas	300,674	200,469	306,843	385,455	402,583	402,726	402,552	396,921
01	Aguascalientes	127,705	183,106	390,527	369,253	372,252	367,599	368,668	369,701
13	Hidalgo	167,031	273,229	376,837	419,273	398,540	364,018	410,052	393,944
16	Michoacán de Ocampo	326,969	236,618	293,928	331,038	339,389	350,057	336,682	340,161
22	Querétaro Arteaga	213,357	127,750	186,683	192,422	195,147	336,645	331,636	241,405
32	Zacatecas	127,643	101,843	143,312	171,703	172,867	159,309	171,895	167,960
TOTAL NACIONAL		5,209,598	4,994,294	7,984,391	9,388,200	9,468,685	10,946,015	10,942,034	9,934,300

Modificado de SAGARPA 2013.

Las principales regiones del estado de Jalisco dedicadas a la producción de leche son la región de los Altos, la Ciénega de Chapala. Los municipios que destacan con mayor actividad ganadera son Tomatlán, Mezquitic, Talpa, Tepatitlán, Ameca, Villa Purificación, Casimiro Castillo y Cuautitlán de García Barragán (Unión Ganadera Regional de Jalisco, 2012) ver figura 2.



Figura 2. Distribución de la actividad ganadera en el estado de Jalisco (Unión Ganadera Regional de Jalisco 2014).

Jalisco es un estado importante productor de leche, existen muchos ranchos ganaderos para cubrir esta demanda que deben garantizar un producto de alta calidad, sin embargo, debido a los procedimientos para la recolección de leche existen momentos donde los animales están en contacto cercano y es ese momento cuando puede ocurrir la transmisión de diversas enfermedades, tales como tuberculosis bovina a través de secreciones salivales.

2.2 Sistemas de producción de leche y becerras

En los sistemas de producción lechera (ranchos lecheros) el ganado está sometido a un proceso que se divide en un periodo de seca y un periodo de preñez, al dar a luz a la cría (ver figura 3). En el caso de ser becerria la recién nacida, generalmente se deja en el rancho para que llegue a su adultez y posteriormente sea vaca productora de leche. Esta becerria debe de consumir calostro bovino que le provea los componentes para sobrevivir. Debido a que en los ranchos lecheros existe un continuo ciclo de crianza de becerras, es posible que pueda ocurrir transmisión de diversas enfermedades por vía transversal a través de la vía de inmunidad pasiva por ingesta de calostro (UGRJ, 2014).

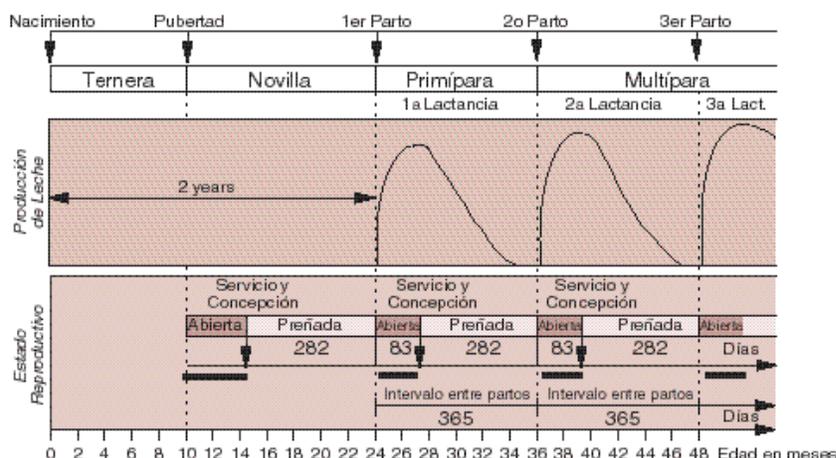


Figura 3. Etapas de becerria-vaca; periodos de producción.

Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera de la Universidad de Wisconsin Madison (Unión Ganadera Regional de Jalisco 2013).

2.3 Calostro bovino

El calostro bovino es la primera secreción producida por la glándula mamaria después del parto antes de la leche, es común en todos los mamíferos y esencial para el desarrollo, contribuyendo al establecimiento del estado inmunitario del recién nacido (Scammell, 2000). El color del calostro bovino es generalmente amarillo ocre, consistencia similar a la miel y una textura grumosa, que difiere de la leche debido a su contenido de componentes y en diferentes concentraciones. El calostro se produce y se encuentra en la ubre durante las primeras 72 horas posteriores al nacimiento, una vez transcurrido ese tiempo a partir del día 4 se conoce como leche en transición para después convertirse en leche madura (APS biogrup, 2012).

En el caso de los bovinos, la vaca no transmite inmunidad al becerro por vía transplacentaria; es decir no hay paso de las principales moléculas de la inmunidad como las inmunoglobulinas (Oliveira et al, 2012). De tal forma que, los becerros nacen sin ninguna inmunidad que los proteja contra infecciones y dependen de la absorción intestinal de anticuerpos a partir del calostro para su sobrevivencia proporcionada por la madre inmediatamente después del parto, siendo este, fuente de inmunidad adquirida inicial mediante la vía pasiva (Agarwal 2011).

Sacerdote y colaboradores en 2013 realizaron la evaluación de los componentes biológicamente activos de calostro mostrando que el calostro contiene significantes y reproducibles cantidades de factores bioactivos, incluyendo citocinas, factores de inmunomodulación, factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

En los sistemas de producción de leche es importante proveerle al becerro recién nacido el calostro necesario para su protección, desarrollo y crecimiento. Donde surge la duda si este calostro además del darle componentes de protección importantes también contiene microorganismos que pueden ser patógenos.

2.3.1 Composición del calostro

El calostro difiere de la leche en composición, propiedades físicas y funciones, ya que contiene una cantidad de nutrientes importantes para el becerro, que le suministran su primer alimento, le ayudan a adaptarse a un nuevo ambiente y lo

protege en los primeros meses de vida contra enfermedades. Además de ser una fuente de nutrientes de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales, el calostro contiene 60 veces más inmunoglobulinas, dos veces más sólidos, 100 veces más vitamina A, 6 veces más proteína y 3 veces más minerales que la leche, las concentraciones de estos componentes varían en dependencia del tiempo transcurrido después del parto, (ver cuadro 2) (Pakkanen et al., 1997; Boudry et al 2008).

Cuadro 2. Composición del calostro bovino después de: 1, 2 y 3 días después del parto; comparación con leche madura.

Descripción	Número de ordeños			Leche
	1	2	3	
Gravedad específica	1.056	1.040	1.035	1.032
Sólidos Totales, %	23.9	17.9	14.1	12.9
Proteína total, %	14.0	8.4	5.1	3.1
Caseína, %	4.8	4.3	3.8	2.5
Inmunoglobulina G, g/L	48.0	25.0	15.0	0.6
Grasa, %	6.7	5.4	3.9	3.7
Lactosa, %	2.7	3.9	4.4	5.0
Vitamina A $\mu\text{g/g}$ de grasa	45	-	-	8
Vitamina D UI/g de grasa	1.3	-	-	0.6
Vitamina E $\mu\text{g/g}$ de grasa	125	-	-	20
Tiamina $\mu\text{g}/100\text{g}$	80	-	-	40
Vitamina B 12 $\mu\text{g}/100\text{g}$	3	-	-	0.5
Minerales Totales, %	1.11	0.95	0.87	0.74
Calcio, %	0.26	-	-	0.13
Fósforo, %	0.24	-	-	0.11
Hierro, %	0.20	-	-	0.04
Cobalto, %	0.5	-	-	0.05

-: Información no disponible

* Adaptado de Gorriil, 1972 y Quigley, 1998 (b)

El calostro también contiene diversas moléculas biológicamente activas importantes para funciones específicas, como inmunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgA, IgM), factores de crecimiento (IGF-I, IGF-II), hormonas del crecimiento (EGF), así también inhibidores del crecimiento bacteriano como lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima, también contiene citocinas las cuales han sido poco estudiadas a la fecha. Algunas de las citocinas reportadas están descritas y remarcadas en el cuadro 3 (Boudry et al, 2008).

Cuadro 3. Principales componentes del calostro y la leche bovina por litro.

Componente	Calostro bovino (por litro)	Leche bovina (por litro)	Referencia
DM	153-245 g	122 g	Blum et al., 2000
Proteína cruda	41-140 g	34 g	Gopal et al., 2000
Lactosa	27-46 g	46 g	Gopal et al., 2000
Grasa bruta	39-44 g	37 g	Gopal et al., 2000
Ceniza bruta	5-20 g	7 g	Gopal et al., 2000
IgG1	50-90 g	0.30-0.40 g	Elfstrand et al., 2002
IgG2	1.5-2 g	0.03-0.08 g	Elfstrand et al., 2002
IgA	3.0-6.5 g	0.04-0.06 g	Elfstrand et al., 2002
IgM	3.8-6 g	0.03-0.06 g	Elfstrand et al., 2002
Lactoferrina	1.5-5 g	0.1-0.3 g	Korhonen, 1977
Lactoperoxidasa	30 mg	20 mg	Korhonen, 1977
Lisozyima	0.14-0.7 mg	0.07-0.6 mg	Korhonen, 1977
IL-1 β	840 μ g	3 μ g	Hagiwara et al., 2000
IL-1ra	5.2 mg	27 μ g	Hagiwara et al., 2000
IL-6	77 μ g	0.15 μ g	Hagiwara et al., 2000
TNF- α	926 μ g	3.3 μ g	Hagiwara et al., 2000
IFN- γ	260 μ g	0.21 μ g	Hagiwara et al., 2000
IGF-1	100-2000 μ g	<25 μ g	Elfstrand et al., 2002
IGF-2	200-600 μ g	<10 μ g	Pakkanen et al., 1997
GH	<1 μ g	<0.03 μ g	Scammell, 2001
EGF	4-8 mg	2 μ g	Scammell, 2001
TGF- β 2	100-300 μ g	1-2 μ g	Elfstrand et al., 2002

DM = materia seca; Ig = inmunoglobulinas; IL = interleucinas; TNF = factor necrosis tumoral; INF = interferón; IGF = *factor de crecimiento insulina*; GH = hormona de crecimiento; EGF = factor de crecimiento epidérmico; TGF = factor de crecimiento transformante (Modificada de Boudry C. et al 2008).

2.3.2 Calostro y componentes con actividad biológica

Dentro de los componentes del calostro existen factores inmunes y factores no inmunes, algunos de estos componentes tienen más de un efecto sobre la regulación general y sobre el sistema inmune (sustancias inmunoregulatoras), mientras que la presencia de algunos otros aún están en estudio y se conoce alguno de sus efectos que ejerce sobre el intestino. Algunas de las moléculas presentes en el calostro se mencionan a continuación y se describe su función principal.

2.3.2.1 Timosina (cadena alfa y beta) Hormona compuesta de dos proteínas base, cadenas que están por separado presentes en calostro bovino, las cadenas actúan sobre el timo independientemente o en conjunto entre sí, otras para estimular la activación, desarrollo y mantenimiento del sistema inmune.

2.3.2.2 Timulina péptido rico en prolina (PRP) Una hormona similar a una proteína pequeña que actúa sobre el timo y otros órganos asociados con el sistema inmune para evitar que se genere una reacción exacerbada del sistema inmune ante una amenaza.

2.3.2.3 Citocinas Pequeñas proteínas producidas por varias células en el cuerpo que inducen las respuestas específicas de células, promoviendo el movimiento de las mismas hacia el sitio de una amenaza.

2.3.2.4 Linfocinas Proteínas de varios tamaños que son producidas por diferentes tipos celulares que promueven la maduración de células funcionales para que puedan liberar sustancias capaces de destruir un microorganismo invasor.

2.3.2.5 Factores de transferencia Pequeñas proteínas se producen una respuesta del cuerpo a la exposición de ciertos organismos, particularmente aquellos que residen en tejidos profundos durante un largo periodo de tiempo (Ejem. *Mycobacterium tuberculosis*). Son específicos para un particular microorganismo. Los factores de transferencia no están limitados en defensa del cuerpo contra una sola infección por estos microorganismos, sino más bien actúan en varias células junto con otros factores, en un intento de mantener los microorganismos bajo control.

2.3.2.6 Lactoferrina Proteína con hierro disponible. Ciertas bacterias aerobias, como *E. coli* requiere hierro para reproducirse y por lo tanto lactoferrina es una sustancia efectiva, cuando se opera en presencia de un anticuerpo específico para impedir el crecimiento de algunos microorganismos en el intestino.

2.3.2.7 Transferrina Proteína transportadora de hierro uniéndose al mismo y pueda actuar impidiendo el crecimiento de ciertas bacterias aerobias, particularmente las del intestino.

2.3.2.8 Lisozima Enzima potente que se une a la pared celular de ciertas bacterias patógenas y proteínas seleccionadas y las degrada generando agujeros en la pared de la bacteria.

2.3.2.9 Lactoperoxidasa Enzima efectivamente moderada que también puede adherirse a la pared de ciertas bacterias, degrada otras proteínas seleccionadas e interfiere con la habilidad de la bacteria para replicarse.

2.3.2.10 Xantina oxidasa Enzima medianamente efectiva que puede adherirse a la pared de ciertas bacterias, degrada proteínas diferentes que los afectados por lactoperoxidasa y también interfiere con la habilidad de replicación de las bacterias.

2.3.2.11 Glóbulos blancos (leucocitos) Principalmente tres tipos de glóbulos blancos funcionales están presentes en calostro incluyendo linfocitos, macrófagos y células polimorfonucleares. Los macrófagos tienen la habilidad de fagocitar microorganismos u otros objetos extraños generando sustancias internas para la destrucción de los microorganismos, función que puede ser potenciada cuando los anticuerpos primero atacan a los microorganismos.

2.3.2.12 Oligosacáridos y glicoconjugados Carbohidratos complejos (azúcares) que se pueden adherir a sitios específicos en el interior de la superficie del tracto gastrointestinal y prevenir la unión de otros microorganismos patógenos (Kleinsmith et al, 2011).

Debido a sus diversos componentes y funciones existen reportes donde el calostro bovino y/o componentes al ser ingeridos por humanos se han propuestos como un

agente/s adyuvante en el tratamiento de algunas enfermedades crónicas como: diabetes, colitis y para la cicatrización de heridas. Estos múltiples efectos son claramente relacionados con la presencia de una gran variedad de factores activos, inmunoglobulinas, micronutrientes, nucleótidos, oligosacáridos, junto con citocinas, factores de crecimiento termolábiles, complemento y factores antibacteriales (Sacerdote et al, 2012).

Dentro de los componentes con actividad biológica contenidos en el calostro, estos son importantes en procesos de protección y maduración del tracto gastrointestinal del becerro mediando la transferencia de defensas de la madre al recién nacido que no es exclusiva debido a las inmunoglobulinas que se encuentran en gran proporción, sino también por otros mediadores inmunes (Stelwagen et al, 2008).

2.3.3 Calostro y componentes inmunes

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Igs) son el principal componente del sistema inmune adquirido presente en calostro y leche. La más abundante clase de inmunoglobulina en leche y calostro bovino es IgG1. En contraste, IgA e IgM están presentes en menor concentración en el calostro bovino (Stelwagen et al, 2008). Las Igs están marcadas por una dualidad de estructura y función que proporcionan un policlonal conjunto de receptores para la célula B, que permiten a la célula producir una gama muy diversa de sitios de unión ligando. Esta diversidad permite a las Igs reconocer una serie casi ilimitada de antígenos propios y no propias, que van desde compuestos fundamentales a la vida como el ADN a moléculas hechas por el hombre, que no podría haber jugado un papel en la evolución del sistema inmune. Las Igs también proporcionan al sistema inmune una actividad en conjunto con moléculas efectoras que pueden activar y fijar el complemento, y pueden unirse a los receptores Fc sobre las superficies de los granulocitos, monocitos, plaquetas y otros componentes de la respuesta inmune. Tanto la activación del complemento y la unión a receptores Fc pueden contribuir a la inducción o mantenimiento de la inflamación (Schroeder et al, 2008).

Se han identificado en calostro y leche una amplia variedad de componentes vinculada a la respuesta inmune innata presencia de neutrófilos, macrófagos,

complemento, oligosacáridos, gangliosidos, especies reactivas de oxígeno, proteínas fase aguda, factores inmunomoduladores (incluyendo diferentes citocinas pro y antiinflamatorias), ribonucleasas y un rango de péptidos y proteínas con actividad directa antimicrobial. Muchos de estos componentes son originalmente producidos por células especializadas en la glándula mamaria. Por ejemplo, los neutrófilos y macrófagos infiltrados de la glándula mamaria no solo matan bacterias directamente a través de fagocitosis, pero son también responsables de la producción de muchas citocinas, especies reactivas de oxígeno y péptidos antimicrobianos. La presencia y concentración de componentes inmunes en leche varía dependiendo de las etapas de lactación. Inmediatamente post-parto presenta altas concentraciones de componentes inmunes que se pueden encontrar en calostro, con inmunoglobulinas que componen un aproximadamente 5 % del contenido de calostro. Posteriormente la concentración de inmunoglobulinas disminuye significativamente, pero aumenta de nuevo durante una lactación tardía. De manera similar el número y proporción de neutrófilos en leche aumenta considerablemente hacia el final de la lactación. El contenido de proteínas inmune innatas en leche también varía con la etapa de lactación. La concentración de componentes inmunes en leche varía considerablemente entre vacas sanas (Stelwagen et al, 2008).

2.3.4 Modulación del sistema inmune maternal bovino durante el embarazo

El embarazo es el único periodo para la madre en el cual el sistema inmune tiene que ser ajustado para apoyar el desarrollo de la cría sin amenazar la vida de la madre. Durante una infección el sistema inmune de los bovinos es capaz de reclutar leucocitos y producir citocinas en respuesta a la presencia de microorganismos. Las células inmunes están presentes en el endometrio bovino incluyendo células T CD4 (Células T helper), T CD8 (Células T citotóxicas), CD5 (células B) y macrófagos durante el ciclo estral y el embarazo. También el endometrio expresa proteínas involucradas en la inmunidad innata, como β -defensinas. La activación, estado y función de células inmunes en endometrio bovino no se entiende completamente. Las células inmunes que están presentes en la interface maternal fetal pueden no

solo promover tolerancia, pueden también estar allí como células de vigilancia para prevenir una ocasional infección uterina a la altura del sistema maternal durante el embarazo. Además hay muchas proteínas que son secretadas por el epitelio luminal que pueden modular las células inmunes. En humanos, quimiocinas y citocinas se expresan por las células del endometrio y el nivel de su expresión parece ser regulado por la hormona cebadora del útero. También en bovinos, el endometrio expresa un amplio rango de factores inmunes, incluyendo interleucina 1 β , IL-6, IL-8 y IL-10 y TNF- α . El embarazo también tiene un impacto en los niveles de circulación de células inmunes. En la vaca en el día 33-34 de embarazo no hay cambios en el número de CD4, CD8 o células $\gamma\delta$ comparado con los animales no embarazados (Oliveira et al, 2012).

2.4 Glándula mamaria bovina y células

Los componentes celulares de las secreciones lácteas están constituidos por células como macrófagos (M ϕ), neutrófilos polimorfonucleares (PMN), linfocitos (L) y, en menor medida, células epiteliales, conocidas como Células Somáticas (CS). Las CS son un componente normal de la secreción láctea, cuyo número y proporción varía dependiendo del estado fisiológico en que se encuentre la glándula, como de ser el caso del grado de infección (Meglia et al, 2001).

En las secreciones lácteas de glándulas no infectadas, las CS se encuentran en un número menor a 1×10^5 células/ml, su composición promedio básicamente está formada por un 12% PMN, 60% de M ϕ y 28% de linfocitos, de los cuales un 20% son linfocitos B y un 47% de linfocitos T. Los polimorfonucleares (PMN) tienden a incrementarse durante el último tercio de la lactancia, tornándose el componente celular predominante durante las primeras cuatro semanas del periodo seco, seguido de M ϕ y linfocitos. El número de CS en esta etapa se incrementa hasta $5 - 6 \times 10^6$ células/ml. En una etapa posterior, cuando la glándula involuciona totalmente, los M ϕ y linfocitos tienden a predominar nuevamente, con una proporción promedio de 44% de M ϕ , 39% linfocitos y 17% PMN. En este caso, los linfocitos B representaron el 28% y los linfocitos T el 47%. Aproximadamente dos semanas antes del parto, las

proporciones celulares cambian nuevamente, hallándose en mayor cantidad los linfocitos, seguidos de M ϕ y PMN. Las células epiteliales se encuentran en una proporción baja, menor al 2% durante gran parte del ciclo productivo del animal. Sin embargo, pueden alcanzar valores de hasta un 15% durante el primer mes de lactación.

Durante una infección bacteriana de la glándula las CS se incrementan considerablemente en un periodo de 12 – 24 horas, siendo los PMN el principal componente de este incremento. La principal función de los PMN es de fagocitosis y destrucción de microorganismos, siendo considerados como la primera barrera de defensa celular de la glándula mamaria contra los patógenos. Con el proceso de la ordeña se remueven los PMN envejecidos, que son reemplazados por células nuevas procedentes de la sangre, proceso denominado migración leucocitaria. En los animales sanos, la producción y destrucción de PMN se encuentra muy bien regulada, manteniendo su número constante en sangre, leche y otros tejidos. Los PMN maduran en la médula ósea y luego son liberados a sangre, donde circulan por aproximadamente 12 horas antes de migrar a los tejidos. En la glándula mamaria son viables por aproximadamente 1 – 2 días, periodo después del cual se tornan senescentes y sufren apoptosis o muerte programada. Así, los PMN son reconocidos y fagocitados por los M ϕ , evitando la liberación de productos tóxicos en la glándula.

Los macrófagos de los tejidos, entre ellos la glándula mamaria, derivan de los monocitos presentes en la sangre, tienen capacidad fagocítica e inician el proceso inflamatorio, debido a que son las células más abundantes en la glándula mamaria sana, a los M ϕ se los considera como las células responsables de la producción de citocinas y de iniciar la respuesta inmunitaria posterior de la invasión bacteriana (Megli et al, 2001).

Los linfocitos son los encargados de construir y regular la respuesta inmunitaria. En el cuadro 4 se detalla la distribución general de componentes celulares en el ambiente de la glándula mamaria bovina sana, además la composición y estructura se muestra en la figura 4.

Cuadro 4. Proporciones celulares en glándula mamaria.

Glándula mamaria sana	
Células somáticas	Por lo general inferior a 1×10^5 células/ml en leche, sin embargo un aumento de células somáticas a 2×10^5 células/ml en leche es considerado un umbral más práctico que distingue para inflamación intramamaria.
Leucocitos	Comprenden un 75 % de células somáticas totales.
Macrófagos	Comprenden de un 35-79 % de los leucocitos totales en la leche, donde constituye el tipo celular predominante.
Linfocitos	Comprenden una proporción de 10-28% de los leucocitos totales de leche. Las proporciones de linfocitos T y B en leche son aproximadamente 40-50% y 20-25%, respectivamente. Las células T alfa beta ($\alpha\beta$) prevalecen y son predominantemente subconjunto CD8 + con características de memoria (que comprende aproximadamente del 50-60% de la población de linfocitos T).
Neutrófilos polymorfonucleares	Comprenden del 3-26 % de leucocitos totales en leche.

Modificada de Ezzat et al, 2014.

2.4.1 Células PMN e infección en glándula mamaria

Como se señaló anteriormente, los PMN llegan a la glándula mamaria rápidamente y en gran cantidad luego de instaurada una infección. La migración de los PMN es un proceso complejo, en el que intervienen familias de moléculas de adhesión (selectinas e integrinas), expresadas secuencialmente tanto en su superficie celular como en las células endoteliales.

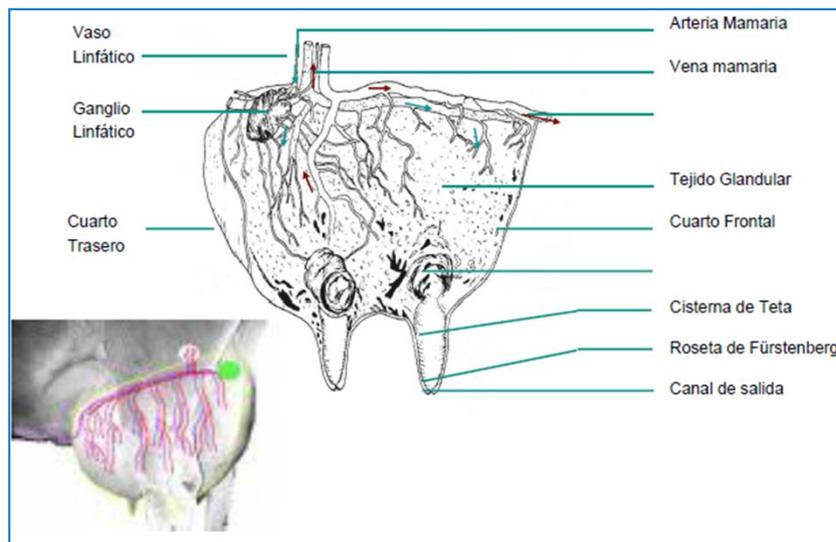


Figura 4. Composición y estructura de la glándula mamaria.

Las selectinas permiten a los PMN ir girando lentamente a lo largo de la superficie de los vasos sanguíneos en busca de señales inflamatorias tales como ciertas citocinas, las cuales, una vez detectadas, activan a las integrinas que, uniéndose a sus contrapartes expresadas en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, detienen completamente al PMN. Como consecuencia, el PMN se halla disponible para migrar a los tejidos, siguiendo un gradiente de concentración químico (quimiotaxis) generado en el sitio de inflamación. Este proceso de migración se inicia en las vénulas postcapilares, también conocidas como vénulas de endotelio alto (HEV). Estas vénulas son un sitio ideal para la extravasación, ya que, ubicadas en un área de reducida fuerza hemodinámica, facilitan el contacto e interacción entre las moléculas de adhesión y los mediadores químicos expresados en los leucocitos y en las células endoteliales (Meglia et al, 2001).

2.4.2 Glándula mamaria, células y componentes inmunes

En un estudio realizado por Leitner y colaboradores en el 2003 demuestra que leche de la glándula mamaria de vacas completamente sanas las células somáticas fueron bajas (50 000 células/ml) y las células epiteliales fueron el tipo predominante (> 55%), menos del 45% eran leucocitos (CD18 +), y tres cuartas partes eran polimorfonucleares y una cuarta parte fueron mononucleares.

Estudios realizados ha detectado la presencia de algunas citocinas en células de la glándula mamaria normal tales como: IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ y TNF- α de manera más detalla en el cuadro 5 se pueden observar las generalidades, atribuciones y funciones de las citocinas presentes en células de glándula mamaria sana.

Cuadro 5. Citocinas y funciones en glándula mamaria sana.

Citocina	Generalidades, atribuciones y funciones.
IL-2	El papel exacto de IL-2 en la ubre bovina no ha sido claramente explorado. Se detecta un aumento en el nivel de IL-2 su actividad transcripcional en la ubre bovina en etapa tardía de lactancia. Disminución de IL-2 nivel pre-parto en comparación con el post-parto. La función celular inmune disminuida y mayor riesgo de mastitis pre-parto podría ser atribuido en parte a la baja actividad de la IL-2.
IL-6	Citocina proinflamatoria encontrada en el desarrollo de signos de shock séptico agudo en mastitis coliforme. Se ha postulado que la IL-6 facilita la transición del proceso inflamatorio de afluencia de neutrófilos a los monocitos. El cambio de neutrófilos a monocitos es esencial para una respuesta inmune adecuada y para disminuir el efecto nocivo de neutrófilos.

IL-8	Citocina quimiotáctica de neutrófilos que se produce por estimulado como: monocitos, linfocitos T, macrófagos, células endoteliales y un número de líneas celulares tumorales. La función biológica de IL-8 en la atracción de neutrófilos a la glándula mamaria bovina infectada fue revelada por el bloqueo de la quimiotaxis de neutrófilos actividad con anticuerpos anti-IL-8 en mastitis.
IL-12	Regula la dicotomía celular (T helper-1 y T helper-2) en linfocitos de células humanas y murinas, facilitando la diferenciación de las células T helper-1, y es un mediador importante que une la innata con el inmunidad específica. IL-12 promueve el aumento significativo de IL-12p40 al final de la lactancia podría atribuirse a su papel vital en la mejora de las respuestas inmunes en el glándula mamaria, particularmente la activación de las células NK a través del aumento de IFN- γ de la síntesis y regulación de cambio de clase de anticuerpo.
IFN-γ	Gran impacto en la movilización de las respuestas inmunes específicas, principalmente la activación de células T y la producción de IL-2. Adicionalmente, la magnitud de la expansión clonal y antígeno específicos las células de memoria son mucho mayor. Además de las otras citocinas inflamatorias, IFN- γ es un mediador importante en la activación de neutrófilos reclutados y la mejora de su fagocitosis.
TNF-α	En glándula mamaria normal, la actividad transcripcional de TNF- α es significativamente elevada al final de la lactancia en comparación con la etapa media de lactancia. Numerosos estudios han detectado un elevado nivel de TNF- α en absoluto en los períodos de lactancia, involución y el parto, excepto un breve periodo antes del parto cuando se cae por debajo de un nivel detectable. Nivel elevado de TNF- α podría mostrar su papel indispensable en el mantenimiento y la regulación de la función inmunológica de las células y factores implicados en los cambios fisiológicos de la glándula mamaria.

Basada de Alluwaimi 2004.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) secretados por las células plasmáticas originados por los linfocitos B, se dividen en cuatro clases las Igs en el bovino: IgG, IgM, IgA e IgE. Además, con tres subclases de IgG: IgG1, IgG2a e IgG2b (Tizard, 2002). IgG es el isotipo de sangre el actor principal de la defensa mediada por anticuerpos, es la clase más pequeña, lo que le permite pasar fácilmente desde la sangre periférica a glándula mamaria. Así, en el bovino IgG1 predomina sobre IgA en las secreciones de la glándula mamaria (Roth y Desmech, 1998). Las Igs son componentes del sistema inmune adquirido y pueden penetrar en la ubre durante el proceso de inflamación (IgG1 e IgG2), pero también son secretadas en células plasmáticas de los tejidos locales de la ubre (IgA e IgM). En la glándula mamaria bovina la migración de los linfocitos forma parte de la inmunidad adquirida, está más relacionada con el sistema inmunitario periférico que con el sistema inmunitario de las mucosas, como sucede en los monogástricos (Sheldrake et al.1988).

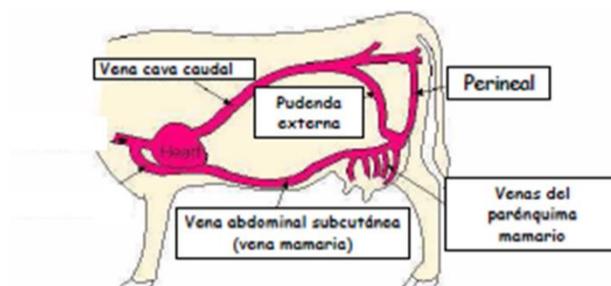


Figura 5. Sistema circulatorio de sangre periférica hacia glándula mamaria.

2.4.3 Distribución de células y componentes inmunes en la glándula mamaria

El periodo cercano al parto en las vacas lecheras es de gran interés desde el punto de vista productivo, debido a la elevada incidencia de enfermedades que se registran durante este tiempo, así también a las numerosas perturbaciones del sistema inmunitario que se producen, además se ha observado cambios en el patrón de tráfico de los leucocitos. El porcentaje de linfocitos T declina en sangre desde un 45 al 20%, con un concomitante incremento en los PMN y monocitos. No obstante, recientemente, se observó que las subpoblaciones de linfocitos en las secreciones mamarias del periodo seco, eran predominantemente T CD4+, a diferencia de los informes previos (Meglia et al.2001). Las citocinas Th1 como la IL-2 y el IFN γ , disminuirán a expensas de un aumento de las Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10), produciendo estos cambios un incremento en la respuesta inmunitaria de base humoral en detrimento de la respuesta mediada por células (Nguyen et al, 2007). Entre las causas que más se destacan como responsables de los cambios en la respuesta inmunitaria durante el periparto, figuran las hormonales y las metabólicas. Entre las primeras, cabe mencionar la disminución en los niveles de progesterona hacia el final de la gestación, el incremento de los estrógenos con un gran pico inmediatamente antes del parto (alcanzando valores hasta diez veces superiores a los registrados durante el estro) y un incremento sostenido de los niveles de corticoesteroides. Mientras que entre las causas metabólicas, se relacionan con las elevadas y agudas necesidades nutritivas que experimentan los animales para sobrellevar el inicio de la lactancia, resultando en un profundo balance energético negativo inmediatamente después del parto. Como consecuencia, se elevan los

niveles de cuerpos cetónicos (β - hidroxibutirato, acetona y aceto acetato) en sangre a raíz de una aguda lipólisis hasta valores no fisiológicos en algunos casos, repercutiendo sobre la respuesta inmunitaria. La hipocalcemia también fue señalada como causante de efectos colaterales sobre la inmunidad mediada por células (Meglia et al, 2001).

La importancia de la presencia de células linfoides presentes en el calostro se ha demostrado ya que migran del tracto digestivo y son transportados a los ganglios linfáticos mesentéricos o placas de Peyer's del becerro. Experimentos muestran que los becerros que reciben células del calostro excretan significativamente menos bacteria *E. coli* enteropatógenas en sus heces en la primera semana después de la infección experimental que los becerros que no reciben células del calostro (Hagiwara et al, 2008).

2.5 Inmunidad pasiva

De manera tradicional se define a la transferencia de inmunidad pasiva como un proceso que se da cuando un individuo recibe anticuerpos de otro y estos se introducen al organismo, los anticuerpos "transferidos" ayudan a prevenir o combatir ciertas enfermedades infecciosas (Philadelphia, 2010). En los mamíferos el crecimiento y la supervivencia del feto durante su desarrollo dependen exclusivamente de la placenta, conformada por tejidos maternos y fetales. El componente fetal está representado por el corion, el cual de acuerdo al tipo de placentación, está asociado con el saco vitelino o con el alantoides. Por su parte el componente materno está dado por la zona más superficial del endometrio uterino. La placenta forma una verdadera interface entre la circulación materna y fetal, facilitando el intercambio gaseoso y metabólico entre la circulación fetal y materna. Además posee la capacidad de secretar hormonas y producir una barrera entre ambos sistemas inmunes facilitando la supervivencia del feto en el útero (Roa et al, 2012).

De manera natural dependiendo de la estructura placentaria se pueden transferir anticuerpos y células del sistema inmune dependiendo de las diferentes especies (Llamas laboratorio y servicios, 2012) y su eficiencia de transferencia a través de la vía placentaria es distinta dependiendo del tipo de placentación, como se muestra en el cuadro 6:

Cuadro 6. Tipo de placentación por especie y transferencia (Roa et al, 2012).

ESPECIE	TIPO DE PLACENTA	CARACTERÍSTICA
Hombre y primates	Hemocorial	La transferencia de inmunoglobulinas (IgG) es casi al 100%.
Perros y gatos	Endoteliocorial	El paso de inmunoglobulinas es entre 5-10% de IgG.
Caballos y cerdos	Epiteliocorial	No hay paso de anticuerpos a través de la placenta.
Rumiantes	Sindesmocorial	No hay paso de anticuerpos a través de la placenta.

Una de las ventajas de la inmunización pasiva es un método útil para proporcionar resistencia ante ciertas enfermedades de una forma rápida, sin tener que esperar a que se monte una respuesta inmunitaria activa. Un ejemplo de inmunidad pasiva es la transferencia de anticuerpos de la madre al feto, lo que hace posible que los recién nacidos puedan combatir las infecciones antes de que adquieran la capacidad de sintetizar sus propios anticuerpos. La inmunidad pasiva frente a toxinas bacterianas mediante la administración de anticuerpos procedentes de animales inmunizados en un tratamiento puede salvar la vida ante infecciones potencialmente mortales como el tétanos (Abbas et al., 2007).

Famulener en 1912 mostro que cabras inmunizadas antes del parto podría transferir esta inmunidad a través calostro, la cual fue evaluada determinando los anticuerpos en los sueros en la descendencia, estos experimentos establecieron el concepto de la inmunización pasiva a través la transferencia de anticuerpos derivados de la leche que van desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo. Debido a que el calostro contiene una mayor concentración de anticuerpos que la leche madura, la

importancia del calostro en la protección contra las infecciones bacterianas fue demostrado por primera vez por Smith y Poco en 1948 quienes realizaron experimentos en becerros privados de calostro, en los cuales se observó que se incrementaron las bacterias intestinales capaces de invadir y multiplicarse en diversos órganos, concluyeron que las responsables eran las aglutininas específicas (sustancias que causan la aglutinación de las células) en la sangre, derivadas de la leche de la madre.

2.5.1 Importancia de la ingesta de calostro por becerros

Las funciones del suministro del calostro en becerro son diversas, entre las más importantes se encuentran:

1.- Proporcionan energía a los animales neonatos para evitar la hipotermia, debido a su alto contenido en grasas; 2.- Ejercen un efecto laxante en el neonato que lo ayuda a eliminar el meconio a través de los primeros excrementos. 3.- Proporcionan hormonas y factores de crecimiento como IGF-I, IGF-II, epidermal growth factor; EGF; 4.- Proveen protección ante las infecciones debido al contenido de inmunoglobulinas y factores antimicrobianos en el becerro durante los primeros días de vida.

2.5.2 Desarrollo del sistema inmune intestinal (becerro) y calostro

La vida prenatal y postnatal temprana representa un período crucial durante el cual muchos sistemas se desarrollan, tales como el sistema inmune intestinal y microbiota comensal. Como en otras especies, el sistema inmune de los becerros es funcionalmente inmaduro al nacer, el recién nacido contiene escaso desarrollo del tejido linfóide asociado al intestino (GALT), a diferencia de la inmunidad sistémica (Bourgot et al, 2014). El contacto de GALT con el medio ambiente y las bacterias que colonizan desde el nacimiento, es esencial para la maduración inmune saludable y el desarrollo de tolerancia (Sacerdote et al, 2012). La lactancia materna también ejerce una influencia importante en la primera etapa de la infancia por la modulación de la maduración del sistema inmunitario neonatal. Debido a la

presencia de factores inmunológicos (IgG, IgA, IgM y citocinas), el calostro y la leche materna representan una fuente crucial de inmunidad pasiva (Salmon et al, 2009). La IgA secretora (sIgA) resiste la digestión en el intestino, donde se une a patógenos entéricos para proteger el amamantamiento neonato. IgG transferido a partir del suero da mayor protección contra las especies patógenas (Harris et al, 2006). El calostro, y en un grado menor la leche, contienen también citocinas inmunosupresoras, tales como TGFb1 y IL-10, que participan en la inducción y tolerancia a los antígenos de los alimentos inocuos y bacterias comensales. Los antígenos ambientales de intestino de la madre, transportados a la glándula mamaria, se transfieren a través del calostro y la leche para el recién nacido y afectan sus respuestas inmunes (Bourgot et al, 2014).

Los oligosacáridos del calostro contribuyen al desarrollo y maduración del sistema inmune intestinal del recién nacido y la suplementación podría contribuir acelerando ese desarrollo y su descendencia. Bourgot y colaboradores en el 2014 experimentaron con 34 cerdas que recibieron una dieta suplementada por fructooligosacaridos (scFOS) durante las últimas 4 semanas de gestación y 4 semanas de lactación midió las inmunoglobulinas en calostro y leche y la concentración de scFOS que se evaluaron en el día de parto, día 6 y 21 después del parto donde se observó el incremento significativamente los niveles de IgA en calostro debido a scFOS lo que demostró que la suplementación materna scFOS modificó las funciones inmunitarias intestinales en lechones en asociación con el aumento de la inmunidad del calostro. Estos resultados ponen de relieve el papel fundamental de la nutrición materna en apoyar el desarrollo postnatal de la inmunidad de la mucosa.

2.5.3 Absorción intestinal de componentes inmunes

En la vaca gestante los anticuerpos se encuentran concentrados en su calostro, los que fueron producidos por el sistema inmune de la vaca al reaccionar específicamente contra los antígenos y en respuesta a su exposición a diferentes organismos durante su vida debido al contacto con su entorno natural (Valdivia et al., 1995). No hay evidencia aun de que cualquiera de estos anticuerpos se encuentre

intacto en la sangre de individuos que ingieren calostro por vía oral. Sin embargo muchos de estos anticuerpos son reactivos contra bacterias, virus y hongos que infectan al tracto gastrointestinal.

Se conoce que el sistema inmune del becerro al nacimiento es inmaduro e incapaz de producir suficientes inmunoglobulinas (Igs) para combatir infecciones. Aunado a lo anterior, la estructura de la placenta bovina no permite la transferencia de Igs séricas de la madre al feto (transplacentaria) antes del nacimiento. Por lo que, el becerro nace desprovisto de inmunidad humoral (anticuerpos) y depende casi totalmente de la transferencia pasiva de inmunoglobulinas maternas presentes y a través del calostro. De esta forma, la adquisición de Igs a través de su absorción por vía intestinal, la que protege al becerro de las enfermedades hasta que su propio sistema inmune llegue a ser completamente funcional. La placentación de los bovinos donde no hay paso de inmunoglobulinas por vía transplacentaria, el becerro depende de la transferencia de inmunidad después de su nacimiento. Para asegurar una adecuada transferencia de inmunidad pasiva en becerras, es necesaria la administración de una cantidad adecuada de calostro de buena calidad durante las primeras 6-12 horas de vida del becerro (Elizondo 2007).

Para que la protección inmune sea eficiente en los becerros recién nacidos deben absorber las inmunoglobulinas del calostro durante las primeras 24 horas de vida, debido a que este es el tiempo en que los intersticios celulares del intestino se encuentran abiertos y se pueden absorber a través de ellos moléculas grandes. Por lo anterior, el tiempo después del nacimiento en el que se consume el calostro es crítico para adquirir una buena inmunidad, en la figura 6 se muestra la eficiencia de absorción de inmunoglobulinas vía intestinal en dependencia del tiempo. A través de la transferencia pasiva

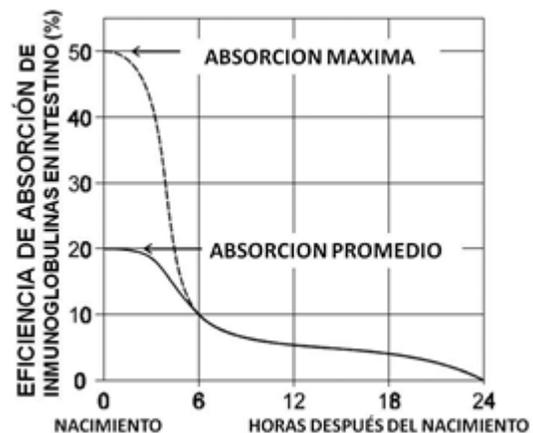


Fig. 6: Absorción intestinal de componentes inmunes con respecto al tiempo.

los primeros días de vida el becerro se encuentra protegido contra cualquier patógeno al que la madre ha estado expuesta o vacunada. Los becerros que no reciben la cantidad adecuada de calostro están más propensos a enfermar o morir en las primeras semanas de vida. Está documentado que los efectos benéficos de la transferencia pasiva de inmunidad a través del calostro son la reducción en las tasas de morbilidad y mortalidad, más tiempo para el primer evento de enfermedad, reducción en los costos de tratamientos, mejor ganancia de peso y aumento en la productividad (Blum y Hammon, 2000). Como se mencionó anteriormente existen evidencias de que hay paso de leucocitos del calostro a través de los becerros recién nacidos (Liebler-Tenorio 2002).

2.5.4 El calostro como defensa contra patógenos

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmune del becerro al nacimiento no posee la capacidad de producir suficientes inmunoglobulinas (Ig) que ayuden a combatir las infecciones. Por su parte el calostro, provee las Igs al becerro para su protección inmunológica durante las primeras semanas de vida. Además, el calostro contiene más de 10^6 células maternas inmunes viables por mililitro, incluyendo linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos, factores de crecimiento y hormonas como la insulina y el cortisol. El papel de estos factores de crecimiento y hormonas juegan un papel importante en la estimación del desarrollo del tracto gastrointestinal y otros sistemas en el becerro recién nacido (Elizondo 2007).

2.5.5 Transmisión de enfermedades por calostro

A la fecha esta reportado que el calostro también puede ser un vehículo de algunos patógenos importantes para animales y/o humanos, ya sea provenientes de la glándula mamaria o de la contaminación en el manejo del mismo: *Salmonella dublin* y *Salmonella typhimurium*, *Mycoplasma spp.*, *Mycobacterium paratuberculosis*, Coliformes fecales, *Salmonella spp.*, y el virus de la *leucemia bovina* (Palmer y Mudd, 1974, Steele, 1997; Streeter et al., 1995; Walz et al., 1997; McGuirk y Collins, 2004). Otras de las enfermedades que pueden ser transmitidas a los becerros

incluyen: *Mycobacterium avium* spp., *Listeria monocytogens*, *Campylobacter* spp., *Mycobacterium bovis* y *Escherichia coli*. Estos agentes infecciosos pueden ocasionar enfermedades como la enteritis y septicemia. También se ha sugerido que la presencia de bacterias en el intestino delgado podría interferir con la absorción de inmunoglobulinas provenientes del calostro (Elizondo 2007). Una enfermedad bacteriana crónica importante de los animales es la tuberculosis bovina, causada por *Mycobacterium bovis*.

2.6 Tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina es un problema de salud animal de carácter mundial y sigue siendo una de las principales amenazas al público sano en los países en que las personas viven en estrecho contacto con el ganado y consumo de leche no pasteurizada (Daborn, et al, 1996 y Hardie, et al, 1992). La presencia de ésta plantea un impedimento en el desarrollo de la ganadería ya que amenaza el ganado y sus subproductos entre regiones del país, así como entre países. Esta enfermedad de perdidas masivas en el área agropecuaria (Prat, 2006). Se caracteriza normalmente por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos, aunque se suele definir como una enfermedad crónica debilitante, la tuberculosis bovina puede presentar en ocasiones un curso agudo, rápido y progresivo. Cualquier tejido del cuerpo puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia en los ganglios linfáticos (sobre todo de la cabeza y tórax), pulmones, intestinos, hígado, bazo, pleura y peritoneo (Aranaz et al. 2003).

La tuberculosis bovina (TBb), es una enfermedad crónica de los animales provocada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), un bacilo perteneciente al género *Mycobacterium*, que guarda una estrecha relación con las bacterias causantes de las tuberculosis humana y aviar.

En las necropsias, un granuloma tuberculosos suele presentar un aspecto amarillento y consistencia caseosa, caseo-calcarea o calcificada. El corte seriado de

órganos y tejidos resulta vital para detectar las lesiones contenidas en un tejido. Aunque se considera que el ganado vacuno es el verdadero hospedador de *M. bovis*, se ha descrito la enfermedad en muchos animales domésticos y no domésticos. El microorganismo también se ha aislado a partir de: búfalos, bisontes, ovejas, cabras, équidos, camellos, palomas, cerdos, jabalíes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorras, visones, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, kudus, elands, tapires, alces, elefantes, sitatungas, orixes, addaxes, rinocerontes, opossums, ardillas, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como leones, tigres, leopardos y lince (Finney 1964).

2.6.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Los agentes etiológicos de la tuberculosis en mamíferos se clasifican como miembros del complejo *Mycobacterium* de tuberculosis, los cuales son:

1. - *Mycobacterium tuberculosis*;

2. - *Mycobacterium bovis*;

3. - *Mycobacterium microti*;

4. - *Mycobacterium canetti*;

5. - *Mycobacterium africanum*;

6. - *Mycobacterium caprae*;

7. - *Mycobacterium pinnipedi*

2.6.2 *Mycobacterium bovis*

M. bovis es una bacteria que pertenece al orden *Actinomycetales*, a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. Es un microorganismo intracelular obligado, gram positivo, aerobio, inmóvil, no esporulado, polimorfo, parásito intracelular facultativo, que se replica dentro de los fagosomas de los macrófagos. Su tiempo de duplicación es de 12 horas o más por lo que su crecimiento en medios de cultivo sólidos se desarrolla en colonias lisas o rugosas, generalmente opacas, *M.*

bovis crece más lentamente que *M. tuberculosis* que es microaerófilo y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. La forma más habitual de distinguir la tuberculosis bovina de la humana causada por *M. tuberculosis*, mediante el cultivo y tipificación bacteriana, ya que ambas patologías no se pueden diferenciar clínica ni radiológicamente (Heifets, 2004).

Ambas micobacterias se caracterizan por ser sensibles al calor, rayos ultravioleta, presenta resistencia a ácidos, alcoholes, álcalis, desinfectantes y a la desecación; debido principalmente a que la envoltura celular altamente hidrofóbica actúa como una barrera permeable lo que hace difícil su tratamiento. Su pared celular es compleja, posee un alto contenido de lípidos (60% peso seco), proteínas y polisacáridos; es rica en ácido micólico (60 a 90 átomos de carbono), el cual se encuentra unido covalentemente con glicolípidos tales como α , α -tetrahalosa dimicolato (TDM, cord factor) y α , α trihalosa monomicolato (TMM). Esta barrera permeable protege al organismo del medio ambiente, contribuye a la persistencia de la enfermedad y a la resistencia a una gran variedad de antibióticos a la vez que contribuye a la longevidad de la micobacteria (Ramirez et al, 2002).

2.6.3 Métodos de diagnóstico de *M. bovis*

Se considera un buen diagnóstico aquel que cumple los requerimientos de ser rápido, específico, con alta sensibilidad, además de ser costo efectivo y eficiente, para evitar que queden animales infectados en el rebaño o que se eliminen animales sanos. Actualmente las pruebas de diagnóstico para *M. bovis* pueden ser métodos directos, moleculares e indirectos encontrando los siguientes, Figura 7.

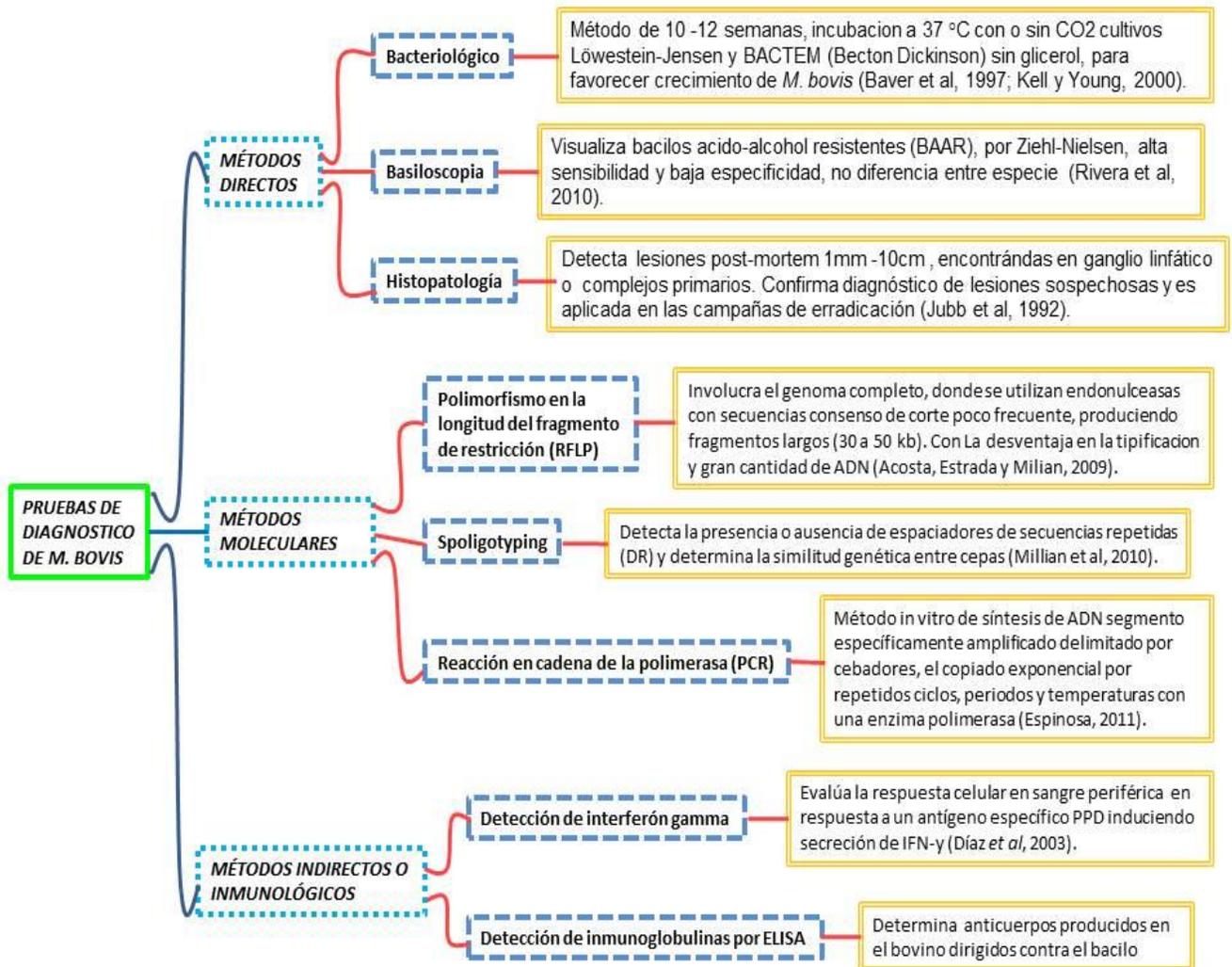


Figura 7. Resumen de pruebas y métodos de diagnóstico e identificación para *M. bovis*.

2.6.4 La tuberculinización

A la fecha no sería posible el diagnóstico en animales individuales, ni un programa de erradicación antes del desarrollo de la tuberculina por Koch en 1890. Ya que en el ganado vacuno no hay evidencia de signos clínicos de la enfermedad hasta que se han desarrollado y manifestado tardíamente lesiones muy extensas (Cousins, 2001). El diagnóstico oportuno es importante para evitar focos de infección y contribuir así con la erradicación de la tuberculosis bovina. A la fecha el único método de diagnóstico para la TBb aprobado en México, está basado en la norma (NOM-ZOO-031-1995), se basa en la prueba intradérmica de la tuberculina PPD (derivado proteico purificado) dando resultados que se interpretan como vacas

reactoras y no reactoras a PPD, que permite descubrir el 96-98% de los animales infectados (Beer, 1981; Blaha, 1995).

Esta prueba ha sido la base de todos los esquemas de erradicación de la tuberculosis que incluyen la detección y el ulterior sacrificio de los animales infectados (Tizard, 2002). PPD es un extracto total de proteínas de cepas de micobacterias, las más utilizadas actualmente es la AN5. La tuberculinización se prueba en el pliegue caudal, prueba cervical comparativa y



Fig. 8: Tuberculinización de bovino

prueba cervical simple. Las reacciones se clasifican de acuerdo a su reactividad: Reactor- cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación; Negativa- cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación, tomando la anterior clasificación se determinaron los grupos de estudio.

2.6.5 Situación epidemiológica, prevalencia y programas de erradicación de TBb en México y Jalisco

En México desde 1992 se realiza la campaña contra la tuberculosis bovina, basada en la prueba de tuberculina con la finalidad de obtener hatos libres y exportar becerros a los Estados Unidos de América. En 1996 se publicó la Norma Oficial Mexicana **NOM-031-ZOO-1995**, campaña nacional contra la Tuberculosis Bovina que se modificó en 1998, la que actualmente continua vigente y es la que regula y determina el método de diagnóstico, su confinamiento y destino final en caso de ser positivo (SAGARPA, 2012). Para el 2015 el avance en el control de la enfermedad era ya considerable, pues antes de 1992, la prevalencia de tuberculosis bovina era desconocida y, actualmente, existen 25 regiones o estados clasificados de baja prevalencia en el país según reporte SENASICA 2015 ver figura 9.



Figura 9. México dividido por zonas de control y erradicación por su prevalencia a tuberculosis bovina (SENASICA 2015).

A pesar de lo anterior, Jalisco es uno de los estados que tiene presencia significativa de la tuberculosis en ganado bovino en alrededor de sus 19 municipios, principalmente en las regiones Ciénega, Altos Norte y Altos Sur, lo que supone un gran reto para mayor rentabilidad de la actividad ganadera y evitar riesgos en la salud. Desde 1995 se tiene barrido permanente en Jalisco para detectar animales con tuberculosis figura 10 (Unión Ganadera Regional de Jalisco).

Entre los municipios con mayor prevalencia dentro del estado se encuentran Municipios como: Acatic, Acatlán de Juárez, Arandas, Atotonilco el Alto, Ayotlán, La Barca, Ciudad Guzmán, Chapala, Degollado, Encarnación de Díaz, Guadalajara, Ixtlahuacán de los Membrillos, Jalostotitlán, Jamay, Jesús María, Jocotepec, Juanacatlán, Lagos de Moreno, Ocotlán, Ojuelos de Jalisco, Poncitlán, El Salto, San Diego de Alejandría, San Juan de los Lagos, San Julián, San Miguel el Alto, Gómez

Farías (Fracción), Teocaltiche, Tepatitlán de Morelos, Tlajomulco de Zúñiga, Tlaquepaque, Tonalá, Tototlán, Unión de San Antonio, Valle de Guadalupe, Villa Hidalgo, Cañadas de Obregón, Zapopan, Zapotitlán del Rey, Zapotlanejo, San Ignacio Cerro Gordo. Desafortunadamente existen rancho que tienen aún alta prevalencia de TBb, ver la Figura 10 en donde se muestran las zonas sin acreditación.

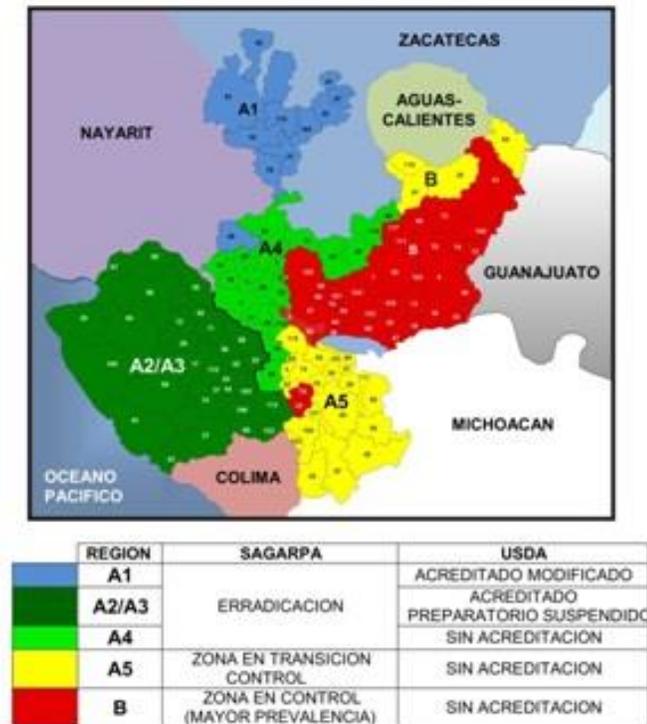


Figura 10. Situación actual de prevalencia a Tuberculosis bovina del estado de Jalisco (Unión Ganadera Regional de Jalisco 2014).

2.2.6 Vías de infección de TBb

Mycobacterium bovis tiene un rango excepcionalmente amplio de hospederos y aunque tradicionalmente la preocupación ha estado centrada en la infección del ganado y el ser humano, hoy en día la diversificación y cambios de manejo de las explotaciones ganaderas y la certeza de la importancia de otras especies que son reservorios de la enfermedad, ponen de manifiesto las limitaciones que puede tener el control de la infección, especialmente cuando los animales silvestres están involucrados en la persistencia de la bacteria (Abalos y Retamal, 2004).

Una de las principales vías de infección en el ganado es por inhalación, debido a que, en el 90 % de los bovinos afectados por TBb la lesión primaria involucra a los ganglios linfáticos del sistema respiratorio, sugiere que ésta es la principal vía de transmisión (Kistermann y Torres, 2000). Los bovinos son infectados más fácilmente por vía respiratoria que por la vía digestiva y a pesar de que un número relativamente grande de bacilo sale en las heces, según Hardie y Watson, 1992 los pastos no son una fuente importante de infección ya que se requieren grandes dosis del bacilo tuberculoso bovino para establecer la infección ver figura 11.

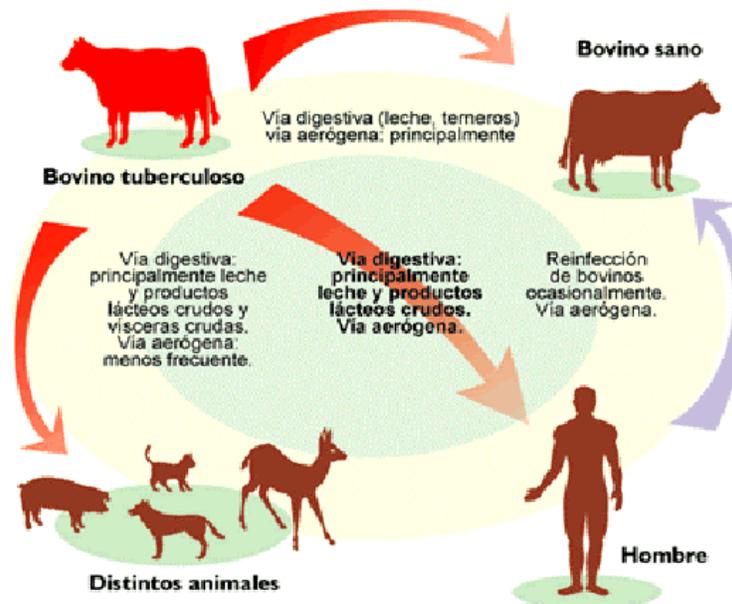


Figura 11. Vías de infección de la tuberculosis bovina (S. Garbaccio- Instituto de Patobiología- INTA-CICVyA).

También Dean y colaboradores en 2005 demostraron que los bovinos pueden infectarse por vía intratraqueal y desarrollar la patología pulmonar típica de TBb con tan solo 1 unidad formadora de colonias de *M. bovis* (Pollock et al., 2006). Phillips y colaboradores en 2003 establecen que la mejor evidencia de las rutas de transmisión de *M. bovis* en bovinos son los patrones de lesiones observadas en los bovinos sacrificados. A pesar de que no todos los animales infectados transmiten la enfermedad, aquellos con cuadros respiratorios o con mastitis tuberculosa son los más infecciosos, y en muchos de éstos las micobacterias pueden estar presentes en

orina, secreciones genitales, semen o deposiciones, lo que facilita su transmisión (Abalos y Retamal, 2004).

2.6.7 Infección de TBb por vía digestiva

La vía digestiva que es la segunda más importante, a través del consumo de calostro y leche contaminada con *M. bovis* procedente de vacas con TBb (Zanini et al., 2003). La infección de la glándula mamaria en la vaca aparece de manera tardía en la evolución de la enfermedad (Radostits et al., 2002) y se ha estimado que el 4 % de los bovinos positivos a la prueba de la tuberculina excreta *M. bovis* por leche (Mathias, 1980).

La tuberculosis por vía entérica (digestiva) es importante en los becerros amamantados con leche y por el uso compartido de bebederos y comederos, son factores de gran riesgo que aumentan proporcionalmente con el tamaño del rebaño y la concentración de los animales que contiene bacilos tuberculosos. Todos los bovinos infectados son una fuente potencial de diseminación y una alta proporción de ellos excretan *M. bovis* en algún momento de su vida (Abalos y Retamal, 2004).

2.7.8 Calostro como posible fuente de transmisión de la TBb

Se sabe que algunas enfermedades anteriormente mencionadas pueden ser transmitidas durante el proceso que el becerro debe ser provisto de calostro, algunas son transmitidas por la secreción misma que sale de la ubre y otras por contaminación posterior al ordeño. Una de las enfermedades más importantes en el ramo de la industria lechera en la Tuberculosis bovina esta es provocada por los gérmenes que provienen de la vaca. Los bacilos tuberculosos están contenidos en el calostro o leche incluso cuando la ubre parece sana (Margarinos, 2000). Existen reportes donde se ha demostrado la presencia de *M. bovis* en muestras de calostro bovino por ADN. Herrera y colaboradores en el 2013 demostraron la presencia de ADN de *M. bovis* en el calostro utilizando PCR anidada en animales reactivos a PPD. Con el fin de disminuir el riesgo de reacciones adversas en animales probables que contienen *M. bovis* observaron una relación inversa entre la frecuencia de la

detección de ADN de *M. bovis* y después de la vacunación en el primer y segundo períodos de 6 meses. Además, determinaron la concentración de interferón gamma (IFN- γ) fue mayor en muestras de calostro PCR-positivos. Esos resultados sugieren que la frecuencia de la presencia *M. bovis* (ADN) en el calostro es alta. (Herrera et al 2013).

2.7 Linfocitos T

Los linfocitos son células del sistema inmune capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes determinantes antigénicos y por lo tanto son responsables de las dos características que definen la respuesta inmunitaria adaptativa, especificidad y memoria (Abbas y Lichtman, 2007). Los linfocitos se clasifican en linfocitos T y B, los linfocitos T a su vez, se clasifican en células T helper o colaboradoras (Th), células T citotóxicas (Tc), y células T gamma delta ($\gamma\delta$).

Las células Th se clasifican de manera general en tipo Th1 y Th2 basados en la especificidad de su secreción en respuesta de citocinas específicas a la estimación por parte del antígeno patógeno. Th1 producen principalmente IFN- γ y activan una respuesta inmune celular (tipo 1). Th2, por otro lado, producen citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, e IL 10-, que inducen a la activación de células B y la producción de anticuerpos. Las células T citotóxicas también producen citocinas de Tipo 1 tales como IL-2 e IFN- γ . Los linfocitos T gamma delta ($\gamma\delta$) se localizan generalmente en los epitelios, tales como la piel y el tracto intestinal, donde contribuyen a la mucosa de inmunidad, pero también producen IFN- γ en respuesta a antígenos de la pared celular de micobacterias (Hagiwara et al, 2008).

En bovinos infectados con *M. bovis* se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ de sangre producen cantidades más altas de IFN- γ en relación a otras poblaciones celulares (Buddle, et al, 2005). De igual modo, las células T CD8+ poseen un papel importante en la resistencia hacia la tuberculosis, ya que además de destruir

directamente a las células infectadas, delimitan el granuloma e impiden la diseminación bacteriana (Gonzalez et al, 2012). Figura 12.

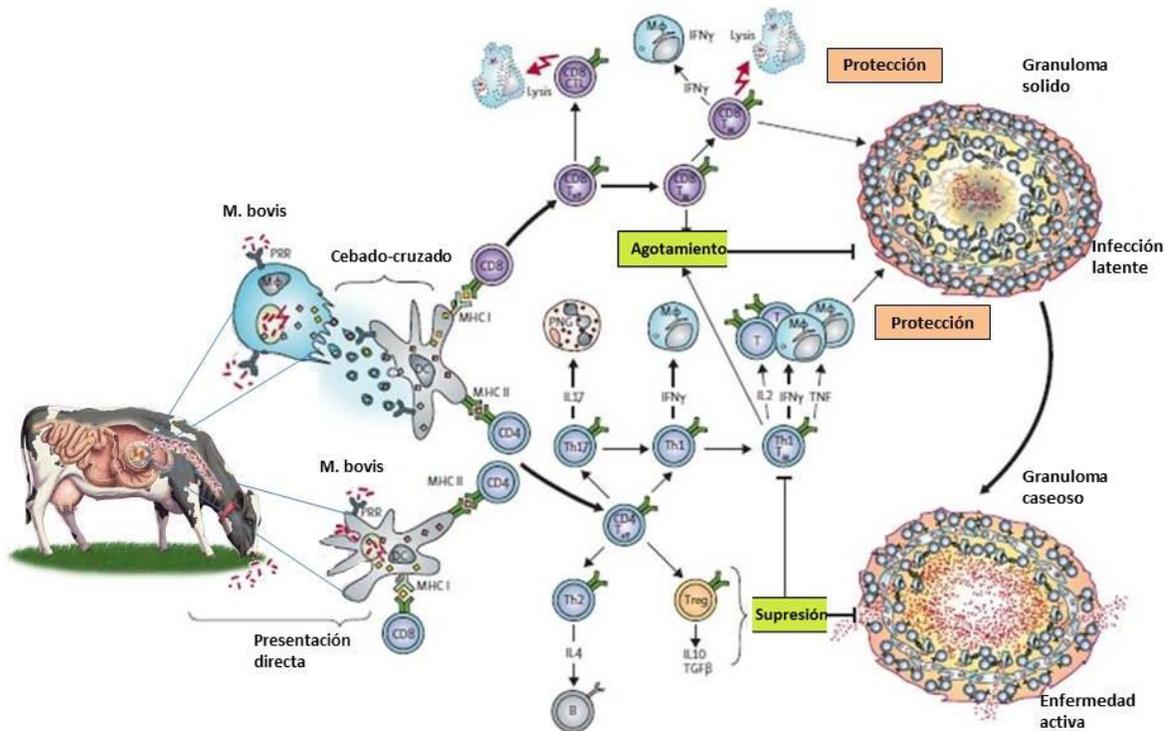


Figura 12. Infección de *Mycobacterium bovis* en bovino (modificada de Kaufmann 2010).

2.7.1 Linfocitos T en respuesta a TBb

Estudios experimentales empleando dosis altas de vacuna BCG (8×10^6 UFC) señalan que la primera población que se activa y prolifera después de la vacunación es la de los linfocitos T $\gamma\delta$; mientras que los linfocitos T CD4⁺ aumentan a partir de la cuarta semana, siendo las células CD8⁺ la última población en activarse (Gonzalez et al, 2012).

Los linfocitos T $\gamma\delta$ representan el enlace entre la inmunidad y la inmunidad adquirida; poseen funciones antiinflamatorias, de protección y de regulación, por tanto representa una primera línea de defensa contra patógenos intracelulares. Estas células se acumulan en el sitio de lesión al inicio del proceso infeccioso y funcionalmente son capaces de producir IFN- γ , y exhibir citotoxicidad en respuesta a macrófagos infectados, otra de sus habilidades es reconocer antígenos no

peptídicos en ausencia de mecanismos clásicos de presentación antigénica (Gonzalez et al, 2012).

2.7.2 Citocinas

Las citocinas son moléculas producidas por diferentes tipos celulares del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, NK) y células no inmunes (fibroblastos, células endoteliales). Dentro de este, se agrupan: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral.

Funcionalmente presentan tanto regulación positiva y negativa entre sí y por lo general no actúan solas sino en conjunto con otras citocinas, producidas por la misma célula pudiendo inducir, potenciar o inhibir la producción de otras citocinas y/o modular negativa o positivamente los efectos de dichas citocinas

Las citocinas son de bajo peso molecular entre 15-30 kDa, constituidas por alrededor de 120-180 aminoácidos, son un amplio grupo de moléculas de gran interés en inmunología por su capacidad de regular la respuesta inmune a modular los procesos de activación, proliferación y diferenciación de leucocitos. También, ciertas citocinas, poseen otras funciones fuera del campo inmunológico como son las de particular en la embriogénesis y diferenciación celular, entre otros (Suarez, et al, 2003).

Poseen dos importantes características funcionales. Una es que son pleiotrópicas, donde una misma citocina puede ejercer efectos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares. Otra es la de redundancia, donde varias citocinas pueden tener la misma función sobre un determinado tipo celular, en ausencia de una determinada citocina, sus funciones pueden ser reemplazadas total o parcialmente por otras. Por ello que las acciones de las citocinas se engloban dentro de un sistema o red funcional complejo, donde el efecto de una molécula está estrechamente regulado, positiva o negativamente, por otras moléculas del sistema. Así, la secreción de una citocina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citocina que, a su vez, puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores (Suarez, et al, 2003).

Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas, dentro del sistema inmune innato, los macrófagos son la células más comprometidas en la síntesis de citocinas, mientras que en el sistema inmune específico son las células T colaboradoras (Th) ya que sus citocinas son esenciales para que se produzca la respuesta inmune, una vez activadas por el contacto con las correspondientes

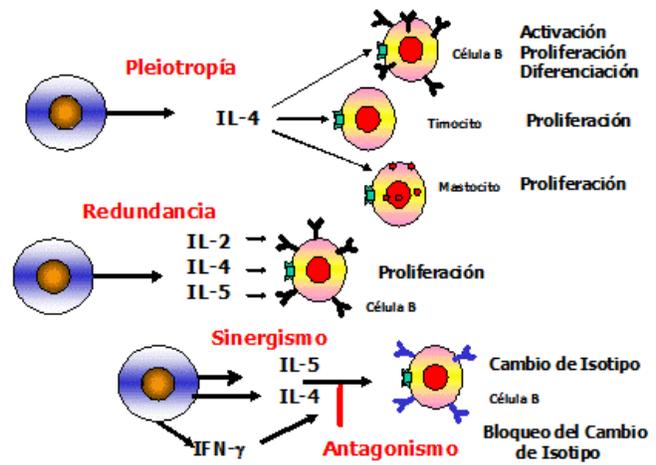


Fig. 13: Características funcionales de citocinas (Resino epidemiología molecular de enfermedades infecciosas 2015).

células presentadoras de antígenos (CPA) con las que se unen a través de receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica.

La producción de las citocinas suele ser breve (transitoria), limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo (es decir, el agente extraño) en muchos casos ello se debe a que los correspondientes ARNm tiene un corta vida media.

Considerando la diversas citocinas, estas pueden exhibir una o varias de la siguientes cualidades: pleiotropica, redundancia, sinergismo y antogonismo.

El distinto espectro de citocinas secretadas por las subpoblaciones de linfocitos determinada los efectos biológicos diferenciales durante el curso de la respuesta inmune. Las poblaciones linfocitarias están sujetas a finos controles cruzados.

Las células Th1: producen principalmente de manera general: IL-2, IFN- γ y TNF- β . Son responsables de funciones de inmunidad celular (activación de linfocitos T citotóxico e hipersensibilidad de tipo retardado), destinadas a responder a parásitos intracelulares (virus, protozoos y algunas bacterias).

Las células Th2 producen principalmente: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Actúan como colaboradoras en la activación de las células B, y son mejores para responder a bacterias extracelulares y a helmintos.

Las citocinas se pueden medir con distintos tipos de bioensayos. En la actualidad, se utilizan como técnica más habitual inmunoensayos en fase sólida, como ELISA para cuantificar la concentración de citocinas en fluidos biológicos, y el ELISPOT para conocer el número de células productoras. También es posible cuantificar y caracterizar las células productoras identificando las citocinas intracelulares mediante citometría de flujo. Otra posibilidad es la utilización de técnicas de RT-PCR cuantitativa que permiten detectar y medir los niveles de ARNm que codifican una determinada citocina (Suarez, et al, 2003).

2.7.2.1 Interleucina 4 (IL-4)

Esta interleucina tiene un peso molecular de 20 kDa la originan las células T y mastocitos y sus principales efectos: induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial. Es el principal estímulo para la síntesis de anticuerpos IgE y para el desarrollo de linfocitos del perfil Th2 a partir de los linfocitos T cooperadores CD4 vírgenes. La interleucina 4 (IL-4) es un miembro de la familia de citocinas con cuatro hélices alfa. Las principales fuentes celulares de citocina son los linfocitos T CD4 de la subpoblación Th2. Las acciones biológicas de IL-4 incluyen la estimulación de IgE y las reacciones mediadas por mastocitos / eosinófilos y la supresión de las reacciones que dependen de los macrófagos: Es la principal citocina que estimula el cambio de clase de cadena pesada de Ig en el linfocito B al isotipo IgE.

- a) Estimula la aparición de los linfocitos Th2 a partir de los CD4 vírgenes y actúa como un factor de crecimiento autocrítico para los linfocitos Th2 diferenciados.
- b) Antagoniza los efectos activadores de macrófagos del IFN- γ y por consiguiente, inhibe las reacciones inmunitarias celulares.

Es una citocina pleiotropica, ya que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1. Posee efectos inmunosupresores, ya

que inhibe la producción de determinados mediadores inflamatorios de los macrófagos e induce la producción de IL-1RA (Interleucina 1 Receptor Antagonista), que bloquea la acción de la IL-1. Por otra parte, promueve el desarrollo de las respuestas inmunes humorales a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B, produciendo el cambio isotípico hacia IgG e IgE e incrementando la expresión de moléculas CD23 en linfocitos B, basófilos y eosinófilos. Por todo ello, los efectos de esta citocina se han relacionado con el desarrollo de los procesos alérgicos y con el incremento de IgE en las infecciones parasitarias.

2.7.2.2 Interferón gamma (IFN- γ)

Tiene un peso molecular entre 20-25 kDa teniendo origen en linfocitos CD4, CD8, también es producido por linfocitos Th1, linfocitos T citotóxicos (LTC) y por células NK. Además de su efecto antiviral posee una importante actividad inmunoreguladora. Incrementa la expresión de antígenos leucocitarios humanos (HLA) de clase I y II en varios tipos celulares, lo que facilita su función presentadora de Ag y activa a los macrófagos, incrementando su capacidad contra tumores y de defensa contra las infecciones. Actúa de forma autócrina sobre las propias células NK que lo producen, aumentando su actividad citolítica y, como consecuencia, incrementando su efecto antitumoral. Sobre los linfocitos Th2 inhibe la proliferación, de manera que su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T hacia células efectoras tipo Th1 favoreciendo, por lo tanto, el desarrollo de las respuestas inflamatorias (Suarez, et al, 2003).

El INF-gama es una citocina la cual es la principal activadora de los macrófagos y realiza funciones críticas en la inmunidad innata y la inmunidad celular adaptativa. Las funciones de IFN- γ son importantes en la inmunidad celular frente a los microorganismos intracelulares, también es activadora de macrófagos que proporciona el medio por el que los linfocitos T y NK activan a los macrófagos para destruir microorganismos fagocitados.

- a) Estimula la expresión de moléculas del Complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase I y II y de coestimuladores en las CPA.

- b) Favorece la diferenciación de los linfocitos T CD4 vírgenes en la subpoblación Th1 e inhibe la proliferación de los linfocitos Th2.
- c) Actúa sobre los linfocitos B para favorecer el cambio a ciertas subclases de IgG, sobre todo, IgG2a y para inhibir el cambio a isotipos dependientes de IL4, como IgG e IgG1.
- d) Activa los neutrófilos y estimula la actividad citolítica de los linfocitos Nk.

En investigaciones efectuadas sobre los aspectos inmunológicos de la tuberculosis se ha encontrado que la inmunidad mediada por células participa de manera relevante en la resistencia a esta enfermedad (Chan y Kaufmann, 1994). IFN- γ es un elemento importante para la respuesta celular, que a su vez activa la acción bactericida de los macrófagos. (Baldwin, 2002a; Schurig et al., 1991). Investigaciones en esta línea han probado que diferentes fracciones proteicas inducen los linfocitos provenientes de animales sensibilizados, producen diferentes niveles de INF- γ e IL-4, que se correlacionan positivamente con los índices de linfoproliferación (Zhan et al., 1993). Esta citocina está relacionada con el perfil Th1.

2.7.2.3 Interleucina 6 (IL-6)

Tiene un peso molecular de 23-30 kDa, es una citocina pleiotrópica que tiene una amplia gama de actividades biológicas en diferentes células diana, principalmente en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria y la reacción de defensa del huésped. Ambos anti y pro-inflamatorios efectos se han atribuido a IL-6 (Dinarello, 1997; Naka et al., 2002).

Es producida fundamentalmente por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno. (Van Snick, 1990). Las actividades biológicas de IL-6 incluyen la diferenciación de las células B, la activación de las células T, la promoción del crecimiento de hibridomas / plasmacitomas, la proliferación de las células madre hematopoyéticas y la estimulación de la respuesta de fase aguda por hepatocitos (Geiger et al., 1988; Heinrich et al., 1990).

2.7.2.4 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

TNF- α se origina en fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrocitos, células endoteliales y células del musculo liso. Con un peso molecular de 17 kDa teniendo efecto proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea como principales efectos. Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores. Con posterioridad, sin embargo, ganaron protagonismo por las numerosas funciones que ejercen sobre la respuesta inmune. Se han descrito las moléculas TNF-alfa y el TNF-beta están estrechamente relacionadas, con una elevada homología en su secuencia aminoacídica. El TNF-alfa es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el lipopolisacaridos (LPS), siendo esta citocina el principal responsable del shock séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producido por linfocitos T y B, NK, y fibroblastos. Junto con la IL-1 está implicado en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos, elevando la temperatura corporal y produciendo caquexia y sueño al actuar sobre el sistema nervioso central (SCN). Por otra parte, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos (Suarez, et al, 2003).

2.7.3 Citocinas en calostro

A la fecha existen reportes de la presencia de citocinas en calostro bovino, producidas y secretadas por la glándula mamaria. Hagiwara y colaboradores en el 2000 reportan que el calostro bovino contiene citocinas con propiedades inmunomoduladoras, la expresión de ARNm de citocinas (IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa y INF-gama) en las células del calostro fue detectado por RT-PC donde las concentraciones de citocinas en el calostro eran concentraciones significativamente más altos que los de la leche madura. Se observó una correlación y concluyeron que el calostro contiene niveles de citocinas que podrían ser producidos y secretados en

la glándula mamaria y que puedan tener una actividad inmunomoduladora e influir en la inmunidad neonatal.

En otro estudio por citometría de flujo se determinaron las poblaciones de los tres tipos de linfocitos que se encuentran en el calostro células T CD4 (Th), T CD8 (T citotóxico) y células T- $\gamma\delta$. También se cuantificó la concentración de IFN- γ en calostro. El resultado sugirió que las células T CD8 en calostro desempeñan un papel como productoras de IFN- γ a su vez esta es una citocina de tipo Th1 que juega un papel importante en el refuerzo de la activación de células mediadas por la inmunidad, también activa los neutrófilos y producción de estas células (Hagiwara et al, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La transferencia pasiva maternal a través del calostro (vaca-becerro), es un proceso requerido para la maduración del sistema inmune del becerro y fundamental para su supervivencia. El calostro además de transferir componentes inmunes a su vez puede ser el medio de transferir microorganismos patógenos, entre ellos *Mycobacterium bovis* pues existen estudios donde se ha mostrado una alta presencia de *M. bovis* en calostro, pudiendo ser un factor importante para la infección por esta vía.

Parte de los componentes inmunes del calostro son las citocinas que se encuentran contenidas en el suero de calostro. Sabiendo que el interferón gama es una molécula clave en el control de la infección por *Mycobacterium bovis*, teniendo la particularidad de desencadenar la activación de macrófagos por citocinas de linfocitos T específicos y a su vez inducir efectos microbicidas, además de ser usado como prueba para detectar bovinos infectados secretando interferón al reaccionar ante PPD. Por lo anterior, este trabajo se realizó con la finalidad de determinar si, en el calostro potencialmente infeccioso a *Mycobacterium bovis* también podrían estar contenidas citocinas como interferón que pudieran contrarrestar la posible infección con esta. Por lo que se evaluaron los niveles de citocinas en muestras bovinos reactivos a PPD, no reactivos y de hatos libres.

4. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad que tiene un impacto económico en todo el mundo. En México se estiman pérdidas por 40 millones de dólares anuales por esta causa. Esta enfermedad afecta en la disminución de la producción de leche alrededor de un 17%, pudiera ser transmitida por vía transversal a través del calostro bovino, además la TBb puede tener implicaciones en la salud humana (zoonosis).

La inmunidad contra la tuberculosis implica una serie compleja de interacciones entre varias poblaciones celulares, que tienen como finalidad controlar la infección, así como prevenir al hospedero de una posible reactivación. Estudios al respecto señalan un papel central para las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, las cuales no sólo contribuyen a la defensa del hospedero secretando citocinas activadoras de los macrófagos, sino también lisan o destruyen células infectadas por micobacterias (Pollock et al., 2001; Buddle et al., 2005).

Conociendo que la principal función de los linfocitos Th1 radica en la defensa mediada por fagocitos contra las infecciones de microorganismos intracelulares, y que el IFN- γ producido por los linfocitos Th1 estimula la actividad microbicida de los fagocitos, lo que favorece la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados.

Por lo que el propósito del siguiente estudio fue el de evaluar el perfil inmunológico de los sueros de calostro para conocer su perfil Th1 o bien un perfil Th2 el cual se sabe no favorece la respuesta de células contra la infección de patógenos intracelulares como *M. bovis* a través de sus niveles de citocinas. En muestras de bovino de ranchos con alta prevalencia a TBb en las que se determinaron los niveles de citocinas. El único estudio existente a la fecha de los niveles de citocinas fue realizado en calostro de bovinos en condiciones controladas (Hagiwara et al., 2000). A la fecha no existen estudios en muestras de calostro de vacas con alta prevalencia de TBb y clasificadas como rectoras y no rectoras a PPD.

Por lo que se evaluó el nivel de IL-4 ya que es una molécula que antagoniza los efectos activadores de los macrófagos y la producción de IFN- γ y por consiguiente, inhibe las reacciones inmunitarias celulares. Por otra parte debido a que hay

estudios en diferentes especies que han evaluado el papel de la IL-6 en la tuberculosis, y los datos entran en conflicto cuando se intenta determinar si la IL-6 ejerce efectos beneficiosos o perjudiciales contra la tuberculosis (Ladel et al., 1997). El papel que juega TNF- α en los bovinos ha sido poco reportado, solo se ha visto involucrado en humanos con tuberculosis pulmonar activa, por estas razones era necesario indagar en la presencia de esta citocina y así determinar el perfil que predomina en vacas con una prevalencia de TBb alta en Jalisco.

5. HIPÓTESIS

Los niveles de citocinas del perfil Th1 como IFN-gama estarán mas elevados que las citocinas del perfil Th2 como IL-4 en muestras de suero calostro bovino de vacas reactoras a PPD a diferencia de las NO reactoras a PPD. Ademas los niveles de IL-6 y TNF- α (citocinas pro inflamatorias) se encontraran diferentes concentraciones en los grupos de estudio.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el nivel de las citocinas IL-4, INF- γ , IL-6 y TNF- α para conocer el perfil inmune Th1 o Th2 en calostros de bovinos de ranchos lecheros con alta prevalencia a tuberculosis bovina del estado de Jalisco.

6.2 Objetivos específicos

- 1.- Obtener y seleccionar muestras de calostro bovino de acuerdo a su reactividad a PPD.
- 2.- Estandarizar las condiciones y cuantificar los niveles de IL-4 en suero de calostro de bovino por medio de técnica de ELISA tipo sándwich (perfil de tipo Th2).
- 3.- Cuantificar los niveles de Interferón-gama en suero de calostro de bovino (perfil Th1).
- 4.- Cuantificar los niveles de la Interleucina-6 y Factor de necrosis tumoral alfa (proinflamatoria) en suero de calostro bovino.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Estrategia experimental

En el siguiente diagrama se muestra en azul de manera general la estrategia experimental que se realizó en este estudio formando parte del proyecto “Evaluación de la inmunidad pasiva materna contra la tuberculosis bovina (*M. Bovis*) en el calostro de vacas de hatos lecheros del estado de Jalisco” (ver figura 14).

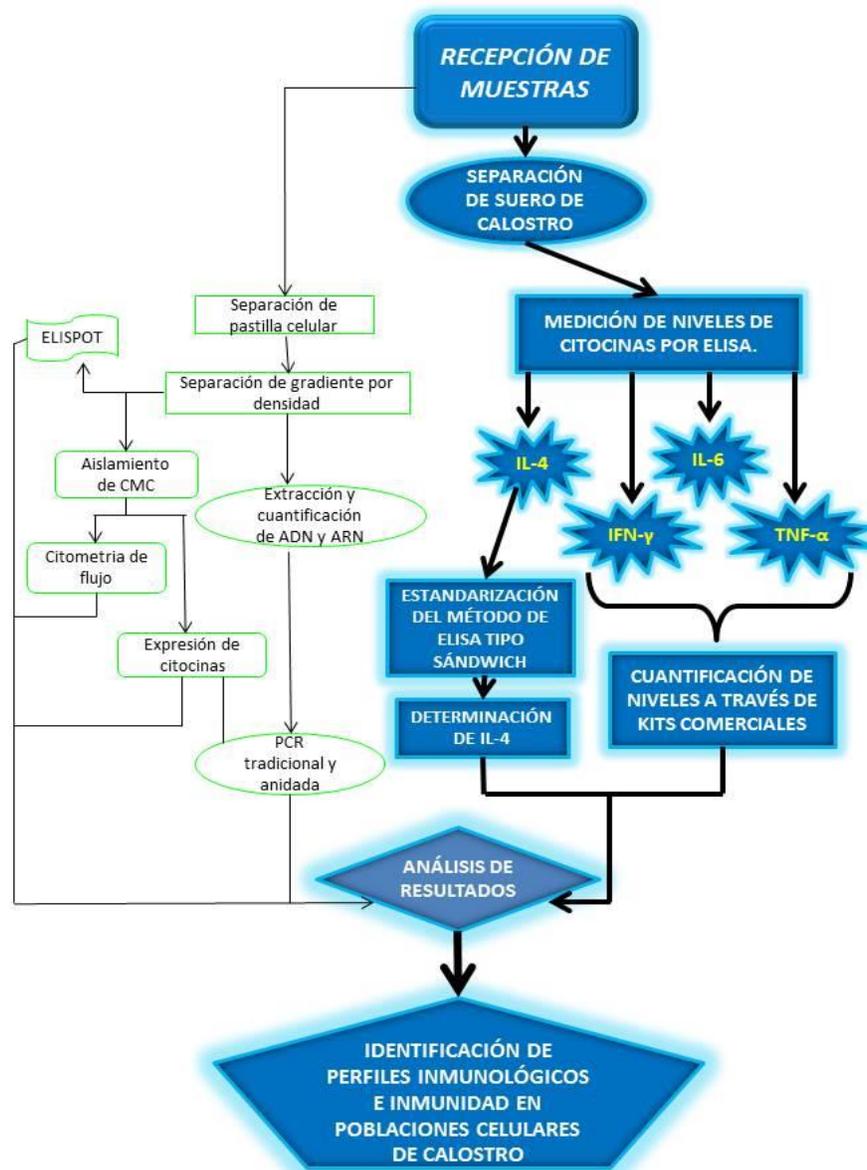


Figura 14. Estrategia experimental de la evaluación de citocinas.

7.2 Grupos de estudio

Las muestras fueron seleccionadas de 8 diferentes ranchos lecheros del estado de Jalisco con alta prevalencia a TBb >10% basado en el resultado de reactividad a PPD realizado por un personal calificado.

Los Grupos de estudio generados fueron:

- 1.- Vacas reactoras a PPD ranchos de alta prevalencia.
- 2.- Vacas no reactoras a PPD ranchos de alta prevalencia.
- 3.- Vacas de ranchos libre de TBb.

Durante la selección de los grupos de estudio se aplicaron los siguientes criterios de inclusión y exclusión ver cuadro 7.

Cuadro 7. Criterios de inclusión y exclusión de muestras y grupos de estudio.

CRITERIOS DE MUESTRA PARA CONSIDERAR EN GRUPOS DE ESTUDIO.		
GRUPO	INCLUSIÓN	EXCLUSIÓN
REACTORAS	1.- Estar en continuo contacto con animales afectados por tuberculosis bovina 2.- Haber dado tres veces reactiva a la prueba tuberculina. 3.- Pertenecer a las zonas con alta prevalencia a TBb. 4.- Tener mínimo un parto. 5.- Pertenecer a la cuenca lechera de Jalisco	1.- Toma de muestra (calostro) después del quinto día del nacimiento. 2.- Haber dado negativo a tuberculina alguna vez. 3.- No haber sido congelada inmediatamente la muestra después de haber sido tomada. 4.- muestra externa a la zona con alta prevalencia del estado de Jalisco.
NO REACTORAS	1.- Estar en continuo contacto con animales afectados por tuberculosis bovina 2.- Haber dado tres veces negativo a la prueba tuberculina. 3.- Pertenecer a las zonas con alta prevalencia a TBb. 4.- Tener mínimo un parto. 5.- Pertenecer a la cuenca lechera de Jalisco	1.- Toma de muestra (calostro) después del quinto día del nacimiento. 2.- Haber dado reactiva a tuberculina alguna vez. 3.- No haber sido congelada inmediatamente la muestra después de haber sido tomada. 4.- muestra externa a la zona con alta prevalencia del estado de Jalisco.
HATOS LIBRE	1.- Rancho libre TB. 2.- Haber dado tres veces negativo a la prueba tuberculina. 3.- Pertenecer a las zonas con alta prevalencia a TBb. 4.- Tener mínimo un parto. 5.- Pertenecer a la cuenca lechera de Jalisco	1.- Toma de muestra (calostro) después del quinto día del nacimiento. 2.- Haber dado reactiva a tuberculina alguna vez. 3.- No haber sido congelada inmediatamente la muestra después de haber sido tomada. 4.- muestra externa a la zona con alta prevalencia del estado de Jalisco.

7.3 Muestras de suero de calostro

Se tomaron 25 ml de calostro y se mezclaron con 25 ml de PBS, se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 20 min, se separaron 4 alícuotas de 1.0 ml que fueron guardadas en tubos Eppendorf y almacenados a -20°C hasta su uso. Los sueros de calostro fueron utilizados para la medición de las citocinas de estudio.

7.4 Determinación de citocinas por ELISA

La cuantificación de IL-4, IFN- γ , IL-6 y TNF- α fue realizada empleando la prueba ELISA (Prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas) que determina la presencia en este caso de una proteína presente en la muestra, es utilizada para saber si el analito está presente. Se empleó en este estudio ELISA tipo sándwich, donde se mide la cantidad de un determinado antígeno entre dos capas de anticuerpos (es decir un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección). La ventaja de ELISA Sándwich es que la muestra no tiene que ser purificada antes de su análisis, y el ensayo puede ser muy sensible (de 2 a 5 veces más sensible que ELISA directa o indirecta). Las lecturas fueron realizadas a 450 nm en un lector de microplacas espectrofotómetro (BIO-RAD 168-1150).

7.4.1 Estandarización y determinación de IL-4

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos, se logró estandarizar la técnica ya que era uno de los objetivos de la tesis y después de diversos intentos con reactivos, soluciones, tiempos, temperaturas y cantidades diferentes se logró estandarizar la técnica tomando en consideración el artículo de Bartley y colaboradores del 2012 con modificaciones. El protocolo estandarizado final: Se agregaron 50 μ l por pozo de anticuerpo de captura no marcado (Mouse Anti Bovine Interleukin 4 #MCA2371 AbD Serotec) diluido a una concentración final de 6 μ g / ml en buffer de carbonatos (NaCO₃ y NaHCO₃) en placas de 96 pozos, se incubaron a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron 5 veces con 100 μ l buffer de lavado (PBS/Tween 20 al 0.05%). Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de solución de bloqueo (buffer de

lavado con 3% de BSA) para bloquear sitios no específicos, la placa fue incubada a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora. Se lavaron 5 veces con 100 µl buffer de lavado, se agregaron 50 µl de las diluciones de los estándares IL-4 (PBP010 AbD Serotec) partiendo de una solución inicial de 4000 pg/ml y diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, como se muestra en el cuadro 8; además se adicionaron las muestras a analizar y un control negativo, se incubaron a TA durante 1 hora, se lavaron 5 veces con buffer de lavado. Posteriormente se añadieron 50 µl por pozo de anticuerpo de detección marcado con biotina (MCA2372B AbD Serotec) diluido a una concentración de 2 µg / ml en buffer de lavado con BSA al 1%, se incubó a TA/1 hora. Se lavaron 5 veces con buffer de lavado. Se añadieron 50 µl de HRP (estreptavidina-peroxidasa #SA-5704 VECTOR LABORATORIES) e incubaron a TA/ 45 min. Se lavaron 5 veces con buffer de lavado. Se añadieron 100 µl de TMB (34028 Thermo Scientific) y se incubaron a TA /25 min en oscuridad. Se añadieron 50 µl de solución de paro (H₂SO₄ 2N) y finalmente se leyeron las placas con un lector de microplacas a 450 nm.

Cuadro 8. Curva estándar de interleucina-4.

DILUCIÓN	CANTIDADES	CONCENTRACIÓN
Solución inicial	24.5 µl del stock +195.5 µl de PBS	4 ng/ml o 4000 pg/ml
Dilución 1:2	110 µl de solución anterior + 110 µl de PBS	2 ng/ml o 2000 pg/ml
Dilución 1:4	110 µl de solución anterior + 110 µl de PBS	1 ng/ml o 1000 pg/ml
Dilución 1:8	110 µl de solución anterior + 110 µl de PBS	0.5 ng/ml o 500 pg/ml
Dilución 1:16	110 µl de solución anterior + 110 µl de PBS	0.25 ng/ml o 250 pg/ml
Dilución 1:32	110 µl de solución anterior + 110 µl de PBS	0.125 ng/ml o 125 pg/ml
Dilución 1: 64	110 µl de solución anterior + 110 µl de PBS	0.0625 ng/ml o 62.5 pg/ml

7.4.2 Determinación de IFN-γ

Se utilizó el kit (Bovine Interferón-γ ELISA KIT #MCA5638K22 ABD Serotec) y siguió el protocolo de acuerdo a la casa comercial: Se agregaron 100µl por pozo de anticuerpo diluido (1:200) en buffer de recubrimiento (50 µl de Ac + 10 ml de buffer para una placa completa). Se cubrió la placa e incubó a 4 °C durante la noche. Se preparó una serie de tubos etiquetados 1-9 y se hicieron diluciones seriales del estándar como se muestra en el cuadro 9. Se lavó la placa tres veces con buffer de lavado (0.2 M NaCl, 0.05% Tween-80). Se añadieron 200µl por pozo de buffer de

bloqueo (BSA 4% /PBS) e incubo durante 1 hora a TA Se lavó tres veces con buffer de lavado y posteriormente se añadieron 100µl de las diluciones del estándar para la curva estándar, además se agregaron las muestras por triplicado, se selló la placa e incubo a TA durante 1 hora. Se lavó con buffer de lavado 3 veces. Se agregaron 100ul/pozo de anticuerpo de detección en buffer de lavado (1:500: 20µl de Ac marcado + 10 ml de buffer) fue incubada a TA por 1 hora. Se lavó tres veces con buffer de lavado. Se añadieron 100µl de estreptavidina HRP (SA-HRP) conjugado por pozo (diluido 1:1000 en buffer de lavado: 10 µl de HRP + 10 ml de buffer) se incubaron a TA durante 1 hora. Se lavaron tres veces con buffer de lavado. Finalmente se añadieron 100µl de sustrato TMB/pozo, la placa e incubo durante 15 minutos en oscuridad a TA transcurrido el tiempo de incubación y se adicionaron 100µl por pozo de solución de paro. Se leyeron las absorbancias a 450 nm en un lector de microplacas.

Cuadro 9. Curva estándar de interferón gamma.

DILUCION	STANDARD	ADICIONAR
1	50 ng/ml	50ul standard reconstituido + 350ul buffer de lavado
2	12.5ng/ml	150ul del tubo 1 + 450ul de buffer de lavado
3	6.25ng/ml	250ul del tubo 2+ 250ul de buffer de lavado
4	3.13ng/ml	250ul del tubo 3 + 250ul de buffer de lavado
5	1.56ng/ml	250ul del tubo 4 + 250ul de buffer de lavado
6	0.78ng/ml	250ul del tubo 5 + 250ul de buffer de lavado
7	0.2ng/ml	150ul del tubo 6 + 450ul de buffer de lavado
8	0.1ng/ml	250ul del tubo 7 + 250ul de buffer de lavado
9	0.025ng/ml	100ul del tubo 8 + 300ul de buffer de lavado

7.4.3 Determinación de IL-6

Se utilizó un kit comercial de la marca Thermo Scientific (# ESS0029) siguiendo las indicaciones de la casa comercial:

El anticuerpo de captura fue diluido (100 µl de anticuerpo de captura en 9.9 ml de buffer de carbonatos) se agregaron 100 µl por pozo y se incubó a TA durante toda la noche. Se lavaron 3 veces con solución de lavado 100 µl (PBS con 0.05% de Tween 20). Se bloquearon con 250ul de buffer de bloqueo: PBS/4% de BSA/5% de Sacarosa (1g BSA + 1.25 g Sacarosa en 25 ml PBS) e incubada a TA /1 hora. Se lavó 3 vez con 250µl de solución de lavado. Se resuspendió el estándar IL-6 con 900

µl de reactivo diluyente PBS/4% BSA quedo a 10,000 pg/ml. La curva estándar se muestra en el cuadro 10. Se agregaron 50 µl de muestras y estándares para la curva, se incubo a temperatura ambiente durante 90 min con agitación moderada. Se Lavaron 4 veces con 100 µl de buffer de lavado. El anticuerpo secundario biotinilado fue diluido (100 µl de anticuerpo más 9.9 ml de PBS/4% BSA) y se agregaron 100 µl e incubaron a TA /1 hora con agitación moderada. Se lavaron 4 veces con solución de lavado. Después se agregó SA-HRP (1:400 en diluyente: 25 µl por 10 ml) y se añadieron 100 µl por pozo e incubó por 30 min con agitación moderada. Se lavó 4 veces con solución de lavado. Posteriormente se agregaron 100 µl de sustrato TMB (# 34028 Thermo Scientific) se incubo en oscuridad durante 20 minutos a TA y finalmente se adicionaron 100 µl de solución de paro H₂SO₄ 2N y se leyeron en un lector de placas a una densidad óptica de 450nm.

Cuadro 10. Curva estándar de interleucina-6.

DILUCIÓN	CANTIDADES	CONCENTRACIÓN
1:2	250 µl de stock de 10 000 pg/ml + 250 µl de PBS	5000 pg/ml
1:4	250 µl de solución anterior + 250 µl de PBS	2500 pg/ml
1:8	250 µl de solución anterior + 250 µl de PBS	1250 pg/ml
1:16	250 µl de solución anterior + 250 µl de PBS	625 pg/ml
1:32	250 µl de solución anterior + 250 µl de PBS	312.5 pg/ml
1:64	250 µl de solución anterior + 250 µl de PBS	156.25 pg/ml
1:128	250 µl de solución anterior + 250 µl de PBS	78.125 pg/ml
1:256	250 µl de solución anterior + 250 µl de PBS	39.0625 pg/ml

7.4.4 Determinación de TNF-α

Se utilizó el kit de R&D Systems DuoSet ELISA development system bovine TNF-α (#DY2279) siguiendo el protocolo del proveedor:

Se diluyo el anticuerpo de captura a una concentración final de 0.8 µg/ml en PBS (56ul de stock reconstituido + 9.944ul de PBS estéril) se agregaron 100 µl por pozo de anticuerpo de captura e incubó durante la noche a TA Se lavó 3 veces con 200 µl de buffer de lavado. Transcurrida la incubación se bloqueó con 300 µL por pozo de buffer de Bloqueo (30ml de buffer de lavado + 0.9 gr de BSA filtrado). Se incubaron 1 hora a TA Se Lavaron 3 veces con 200ul de buffer de lavado, después se agregaron 50 µl de muestra (previamente centrifugadas 5 min A 8000 rpm A 4°C) y los estándares diluidos (ver cuadro 11) y se incubaron 2 horas a TA Se lavaron 3 veces

con 200ul de buffer de lavado. Posteriormente se añadieron 100 µL de anticuerpo de detección a una concentración de 1.2 µg/ml con 2% de Suero Normal de Cabra (NGS), (9.8ml de reactivo diluyente + 200ul de NGS, de esa solución se tomó 9.944 ml + 56µl anticuerpo de detección) e incubada 2 horas a TA Se lavaron 3 veces con 200ul de buffer de lavado. Se añadieron 100 µl por pozo de Estreptavidina-HRP (1:200:50µl de stock de HRP + 10ml de reactivo diluyente) se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando colocar la placa en la luz directa, se lavó 3 veces con 200µl de buffer de lavado. Se agregaron 100 µL de solución de sustrato TMB en cada pozo e incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, transcurridos los 20 min se añadieron 50 µL de solución de paro por pozo. Se determinó la densidad óptica utilizando un lector de microplacas a 450 nm con una corrección de la longitud de onda 550 nm.

Todas las concentraciones de las moléculas se determinaron sacando un promedio de los triplicados promediando las densidades ópticas, comparándolas con las curvas estándar y a está aplicándole una regresión y así poder sacar las concentraciones apoyándonos en una página digital: <http://elisaanalysis.com/app>.

Cuadro 11. Curva estándar de factor de necrosis tumoral alfa.

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN	CANTIDADES
Solución inicial	8000 pg/ml	15ul de stock + 435ul de reactivo diluyente
Dilución 1	3555.55 pg/ml	200ul de sol ante. + 200ul de reactivo diluyente
Dilución 2	1777.77 pg/ml	200ul de sol ante. + 200ul de reactivo diluyente
Dilución 3	888.88 pg/ml	200ul de sol ante. + 200ul de reactivo diluyente
Dilución 4	444.44 pg/ml	200ul de sol ante. + 200ul de reactivo diluyente
Dilución 5	222.22 pg/ml	200ul de sol ante. + 200ul de reactivo diluyente
Dilución 6	111.11 pg/ml	200ul de sol ante. + 200ul de reactivo diluyente

Debido a que la citocina mas alta determinada por ELISA fue IL-4, se evaluó su presencia mediante su perfil proteico, para lo cual se cuantificaron las proteínas totales, posteriormente fueron separadas en geles de poliacrilamida. Las muestras fueron concentradas por filtración por punto de corte de peso molecular, precipitadas con acetona, las proteínas de las fracciones fueron cuantificadas, fueron separadas en geles de poliacrilamida, transferidas a geles de nitrocelulosa y evaluada su inmunoreactividad utilizando los anticuerpos antes mencionados anti-IL-4 en

ensayos de Western Blot. Cabe mencionar que estos anticuerpos están descritos para ensayos de ELISA y no para Western Blot.

7.5 Análisis de perfiles proteicos de suero de calostro

7.5.1 Cuantificación de proteínas para geles de poliacrilamida

Se realizó utilizando el kit (DC Proteín Assay Instruction Manual de BIO-RAD). Se pipetearon 5 µl por pozo de los estándares y de las muestras, después se agregaron 25 µl de reactivo A en cada pozo, posteriormente se añadieron 200 µl de reactivo B en cada pozo, se incubaron por 15 minutos, se leyeron las absorbancias a 750 nm (estable durante aproximadamente 1 hora). Para la curva de los estándares con BSA (albumina de suero bovino) se partió de una concentración [10 mg / ml]. Se prepararon 6 diluciones en cada ensayo que se realizó en el mismo buffer que la muestra. La curva de BSA se muestra en el cuadro 12.

Cuadro 12. Curva de BSA.

DILUCIÓN	CANTIDADES	CONCENTRACIÓN
Solución inicial	30 µl del stock de 10mg/ml	10 mg/ml
Dilución 1:2	15 µl de solución anterior + 15 µl de diluyente	5 mg/ml
Dilución 1:4	15 µl de solución anterior + 15 µl de diluyente	2.5 mg/ml
Dilución 1.8	15 µl de solución anterior + 15 µl de diluyente	1.25 mg/ml
Dilución 1:16	15 µl de solución anterior + 15 µl de diluyente	0.625 mg/ml
Dilución 1:32	15 µl de solución anterior + 15 µl de diluyente	0.03125 mg/ml

7.5.2 Gel de Poliacrilamida

Se preparó un gel separador al 12 % de poliacrilamida como se muestra en el cuadro 13.

Cuadro 13. Gel separador de poliacrilamida al 12%.

Cálculos para 2 geles	
Reactivo	Cantidad
Acrilamida 30%	4 ml
4 x Tris pH 8.8	2.5 ml
Agua desionizada	3.5 ml
PSA	50 µl
TEMED	10 µl

Se agregó la solución, se añadió lo faltante de agua desionizada hasta el borde, una vez polimerizado se retiró el exceso de agua con papel absorbente, posteriormente se preparó el gel concentrador de poliacrilamida como se muestra en el cuadro 14.

Cuadro 14. Gel concentrador de poliacrilamida.

<i>Cálculos para 2 geles</i>	
<i>Reactivo</i>	<i>Cantidades</i>
Acrilamida 30%	430 μ l
4 x Tris pH 6.8	830 μ l
Agua desionizada	2.033 ml
PSA	25 μ l
TEMED	5 μ l

Una vez polimerizado el gel se retiró el peine y se desmontó de la base haciéndole unos lavados de agua destilada para retirar los excesos de acrilamida en los pozos. El gel se montó en la cámara de electroforesis. Se cargó el marcador molecular (BIO-RAD SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) en un pozo para poder comparar las muestras, previamente se ponen a hervir durante 5 min para desnaturalizarlas, se cargan en el gel, la concentración por carril fue de 25 μ g. Se sometieron a electroforesis a 150 W por 5 minutos y después 1 hora a 120 W para separar las proteínas, una vez que transcurrió el gel se colocó en un recipiente para tinción con azul de Coomassie por 20 min con agitación. Posteriormente se agregó la solución decolorante (Ácido acético, Metanol y Agua bidestilada) que se cambió varias veces hasta desteñir el gel y se pudieran observar las bandas de las proteínas, una vez desteñó el gel se retiró la solución decolorante y se agregó agua destilada para evitar deshidratación.

7.5.3 Concentración de proteínas de suero de calostro

Se utilizó el Dispositivo Amicon Ultra 30K – 30 000 Limite de Peso Molecular Nominal (NMWL) Millipore # UFC803008 para corroborar la presencia de interleucina 4 (peso 14 KDa) en concentrado de muestras.

Se agregó el concentrado de muestras con alto contenido de IL-4 previamente analizadas por ELISA 3000 [pg/ml] en la unidad de filtración Amicon de 30K y se

aforo hasta 4 mL con PBS. Se colocó el dispositivo en la centrifuga (columpio preferentemente); se centrifugo a 4 000g (cada 5 o 8 minutos se detuvo la centrifuga y observó la unidad de filtración, se retiraba lo filtrado para mejor centrifugación, se resuspendió la muestra en la unidad de filtración, después de 40 minutos la muestra que se quedó en la unidad de filtración se tomó y estaba viscosa se agregaron 200 µl de PBS, se resuspendió y se volvió a centrifugar por otros 20 min. Se retiró la muestra del concentrado utilizando un barrido de lado a lado para asegurar la recuperación. El filtrado se recuperó e hicieron alícuotas en tubos eppendorf (molécula de interés).

NOTA: Para una óptima recuperación se retiró la muestra concentrada inmediatamente después de centrifugar.

7.5.4 Precipitación con acetona

La solución filtrada que se esperaba tuviera un tamaño de proteínas de 0 a 30 kDa (unidad de filtración de 30K), en un tubo se agregaron 4 volúmenes de acetona absoluta (Acetona a -20°C). La solución anterior (muestra + acetona) se incubo a -20°C toda la noche. Se centrifugo a 13,000 rpm a 4°C durante 20 min, se descartó el sobrenadante con micropipeta, se dejó secar el tubo eppendorf (para quitar los excesos de acetona) por 2 horas, posteriormente fue resuspendida en 1 ml de PBS se hicieron alícuotas y se guardó a -20°C hasta su uso.

7.5.5 Western Blot

Se realizó el gel como previamente fue descrito, separadas las proteínas, el gel se humedeció con buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192mM y Metanol 20%) por 20 minutos a TA se preparó el Sándwich de transferencia (Unidad de transferencia, esponja, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa) la unidad fue llenada con buffer de transferencia y se realizó la transfeencia a 110v/90min. Se verifico la transferencia tiñendo la membrana de nitrocelulosa (#1620112 BIO-RAD) con solución de rojo de Ponceau por 5 minutos/TA antes del bloqueo, se destiño enjuagando la membrana varias veces con PBS. Se bloqueó (leche al 5% en PBS-Tween 20 al 0.05%) toda la noche a 4°C. Se enjuago 3 veces con PBS-Tween 20 al

0.05% 10min/TA con agitación fuerte. Se incubó toda la noche el anticuerpo primario diluido 1:500 (leche 2.5% en PBS-Tween 20 al 0.05%). Se lavó 5 veces por 10min/TA con agitación fuerte. Se agregó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (goat anti-bovine IgG #101-035-003) diluido 1:1000 en PBS-T /1% leche y se incubó 1 hora/TA con agitación constante. Se lavó con PBS-Tween20 0.05% 5 veces por 10 min a TA. Se reveló la membrana con método peroxidasa colorimétrico (0.0075g HRP, 2.5ml Metanol, 12.5ml TBS y 30 μ l H₂O₂) 30min. Se paró la reacción con agua.

7.6 Análisis estadístico

Los resultados de los niveles de todas las citocinas fueron analizados con el software GraphPad PRISM versión 6.0b, las muestras fueron categorizadas basadas en la prueba de la tuberculina además de cumplir con los aspectos de inclusión. Lo primero que se realizó fue un análisis estadístico de Shapiro-Wilk con significancia del factor alfa = 0.05, D'Agostino & Pearson y KS en los cuales se analizó la normalidad en cada set de datos y se mostró que distintas variables no son de distribución gaussiana con un valor de $P = <0.0001$. Posteriormente los resultados de las diferencias en los niveles de citocinas (IL-4, IFN- γ , IL-6 y TNF- α) entre grupos de Reactoras, No Reactoras y Hatos libres de esta fase experimental fueron analizados mediante un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente se realizó un intervalo de confianza para la mediana de acuerdo a la prueba Dunn ($p \leq 0.05$).

8. RESULTADOS

Del total de muestras seleccionadas que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión mostrados en el cuadro 7, considerando la reactividad de las muestras se obtuvieron una n =33 para reactoras, n = 46 NO reactoras a PPD y una n= 29 para ranchos libres de TBb, los tres grupo de estudio analizados en este trabajo. Se muestran en el cuadro 15.

Cuadro 15. Grupos de estudio

	Reactoras	No Reactoras	Hatos Libres
N del grupo	33	46	29

Los resultados de todos los niveles de IL-4, IL-6, INF-gama y TNF-alfa se muestran representados de manera resumida en el cuadro 16, donde se encuentra la identificación de la muestra, los resultados de los niveles de cada una de las citocinas en suero de calostro de vacas **Reactoras**, una columna con su reactividad a PPD, las densidades ópticas obtenidas en los ensayos de ELISA y los niveles de las moléculas en pg/ml.

Cuadro 16. Resumen de niveles de citocinas de vacas rectoras, [pg/mL] de todas las muestras del grupo de estudio.

GRUPO	MUESTRA	PPD	IL-4		IFN- γ		IL-6		TNF- α	
			Densidad Optica	Concentracion pg/ml						
MUESTRAS REACTORAS	11263 R6	REACTORA	0.306	535.32	0.122	55.72	0.060	0	0.154	81.86
	82 R2	REACTORA	0.445	802.30	0.133	84.86	1.060	2509.98	0.315	365.22
	413 R1	REACTORA	0.922	1525.00	0.138	100.58	0.198	287.50	0.185	125.72
	41 R8	REACTORA	0.496	881.98	0.129	75.14	0.087	0	0.162	92.60
	24 R1	REACTORA	0.673	1173.74	0.147	125.08	0.302	546.78	0.176	111.58
	INQUILLER R4	REACTORA	0.374	673.74	0.126	66.36	0.219	340.33	0.150	76.74
	171 R2	REACTORA	0.534	954.92	0.162	165.32	0.297	534.40	0.234	205.32
	01 R3	REACTORA	0.257	427.92	0.077	0	0.159	586.34	0.145	69.78
	167 R3	REACTORA	0.325	575.26	0.075	0	0.142	144.18	0.166	98.08
	202 R8	REACTORA	0.222	341.56	0.253	419.14	3.050	>5000	0.159	87.84
	135 R2	REACTORA	0.129	0	0.088	0	0.067	0	0.167	98.88
	410 R1	REACTORA	0.387	693.24	0.079	0	0.055	0	0.139	63.02
	1911 R5	REACTORA	0.140	36.50	0.092	0	0.184	252.06	0.148	73.48
	1917 R5	REACTORA	0.379	680.38	0.101	0	0.072	0	0.115	35.90
	202 R3	REACTORA	0.208	305.12	0.074	0	0.177	234.28	0.264	261.64
	45 R3	REACTORA	0.405	730.86	0.083	0	0.318	586.32	0.160	89.86
	167 R8	REACTORA	0.267	451.54	0.091	0	0.231	371.50	0.155	82.58
	281 R3	REACTORA	0.207	302.00	0.086	0	0.680	1490.44	0.162	92.58
	100 R2	REACTORA	1.288	2000.14	0.084	0	2.098	6318.76	0.536	924.64
	40 R2	REACTORA	0.596	1054.48	0.156	150.06	2.107	6369.32	0.655	1289.36
	106 R6	REACTORA	0.297	517.14	0.086	0	0.110	59.66	0.156	84.50
	281 R6	REACTORA	0.341	594.06	0.141	107.06	2.942	13029.16	0.164	95.90
	27 R6	REACTORA	0.213	317.66	0.135	91.80	0.156	180.32	0.133	56.08
	GARDENIA R7	REACTORA	0.552	982.94	0.301	550.90	0.196	282.44	0.156	84.74
	112 R6	REACTORA	0.291	504.66	0.010	0	0.065	0	0.120	41.80
	684338 R3	REACTORA	0.177	205.90	0.072	0	0.139	136.40	0.127	52.08
	19 R6	REACTORA	1.747	2536.20	0.110	21.04	1.031	2430.66	0.172	107.10
	48 R2	REACTORA	0.312	549.92	0.121	51.56	0.211	320.22	0.140	64.20
	178 R3	REACTORA	0.350	626.08	0.087	0	0.264	452.58	0.144	69.22
	217 R8	REACTORA	0.135	0	0.077	0	0.151	167.48	0.137	60.60
373 R1	REACTORA	0.170	189.22	0.077	0	0.235	380.32	0.14	63.60	
110 R6	REACTORA	0.297	508.70	0.069	0	0.076	0	0.145	69.74	
BURRILLA R4	REACTORA	0.318	561.98	0.108	0	0.144	150.66	0.130	52.24	
PROMEDIO			0.417	673.95	0.112	62.56	0.524	1192.57	0.188	158.44

Los resultados de todos los niveles de las citocinas IL-4, IL-6, INF-gama y TNF-alfa se muestran representados de manera resumida en el cuadro 17 donde se encuentra la identificación de la muestra , los resultados de los niveles de cada una de las citocinas de suero de calostro de vacas **NO Reactoras** (prueba de la

tuberculina, reactividad negativa a PPD), una columna con su reactividad a PPD, las densidades obtenidas en los ensayos de ELISA y los niveles de molécula en pg/ml.

Cuadro 17. Resumen de niveles de citocinas de vacas NO reactoras, [pg/mL] de todas las muestras del grupo de estudio.

GRUPO	MUESTRA	PPD	IL-4		IFN- γ		IL-6		TNF- α	
			Densidad Optica	Concentracion pg/ml	Densidad Optica	Concentracion pg/ml	Densidad Optica	Concentracion pg/ml	Densidad Optica	Concentracion pg/ml
MUESTRAS NO REACTORAS	54 R2	NEGATIVA	0.560	997.72	0.231	358.12	0.232	372.86	0.128	50.28
	75 R1	NEGATIVA	0.359	643.82	0.160	161.16	0.220	342.80	0.144	69.10
	45 R6	NEGATIVA	0.310	542.58	0.102	0	0.109	56.46	0.130	52.10
	244 R1	NEGATIVA	0.624	1098.32	0.084	0	0.106	48.22	0.201	150.52
	239 R8	NEGATIVA	0.403	728.02	0.082	0	0.119	83.52	0.343	425.76
	294 R3	NEGATIVA	0.272	463.30	0.070	0	0.154	175.34	0.225	189.78
	12 R3	NEGATIVA	0.287	495.98	0.115	34.92	0.075	0	0.181	118.90
	198 R3	NEGATIVA	0.197	274.52	0.098	0	0.135	125.92	0.291	179.32
	214 R3	NEGATIVA	0.284	489.56	0.074	0	0.238	387.84	0.193	137.12
	295 R3	NEGATIVA	0.184	225.94	0.081	0	0.164	201.06	0.270	273.20
	04 R3	NEGATIVA	0.255	424.12	0.074	0	0.124	96.86	0.155	82.60
	16 R3	NEGATIVA	0.389	700.80	0.073	0	0.443	895.12	0.320	374.72
	114 R3	NEGATIVA	0.169	188.46	0.071	0	0.071	0	0.204	155.48
	265 R3	NEGATIVA	0.539	962.88	0.067	0	0.330	615.98	0.234	206.20
	32 R6	NEGATIVA	0.165	172.82	0.074	0	0.079	0	0.170	103.04
	36 R2	NEGATIVA	0.382	689.10	0.070	0	0.654	1423.80	0.256	246.40
	45 R2	NEGATIVA	0.268	454.36	0.072	0	0.182	246.98	0.150	76.16
	10 R1	NEGATIVA	0.374	670.40	0.082	0	0.498	1031.64	0.177	113.76
	684314 R5	NEGATIVA	0.374	671.84	0.074	0	0.997	2334.44	0.238	213.50
	328 R8	NEGATIVA	0.128	0	0.069	0	0.680	1490.44	0.193	137.20
	2028 R6	NEGATIVA	0.254	421.18	0.075	0	0.103	39.90	0.153	80.56
	109 R6	NEGATIVA	0.346	618.14	0.065	0	0.137	131.16	0.172	105.84
	121 R6	NEGATIVA	0.161	124.06	0.122	53.04	0.120	86.21	0.161	91.20
	325 (NO REGISTRO)	NEGATIVA	0.483	0.868	0.104	5.76	0.192	273.56	0.170	103.06
	184 R1	NEGATIVA	0.337	599.96	0.394	808.86	0.460	937.24	0.289	309.88
	64 R3	NEGATIVA	0.582	1031.86	0.161	163.46	0.318	586.34	0.165	96.00
	272 R1	NEGATIVA	0.697	1192.42	0.120	50.18	0.433	871.62	0.264	261.70
	257 R1	NEGATIVA	0.183	231.08	0.123	58.50	0.739	1643.34	0.171	104.52
	46 R3	NEGATIVA	0.229	356.74	0.072	0	0.136	128.54	0.190	133.24
	251 R1	NEGATIVA	0.434	781.64	1.499	2309.72	0.081	0	1.416	4409.58
	255 R3	NEGATIVA	0.402	722.96	0.110	21.04	0.113	67.34	0.371	490.90
	166 R3	NEGATIVA	0.347	620.30	0.110	21.04	0.102	37.10	0.184	124.12
	111 R6	NEGATIVA	0.303	527.88	0.178	209.70	0.106	48.22	0.155	82.52
	46 R6	NEGATIVA	0.543	969.98	0.120	50.16	0.217	335.10	0.164	94.62
	332 R8	NEGATIVA	0.225	347.00	0.142	111.22	0.178	236.82	0.266	264.48
	128 R6	NEGATIVA	0.170	184.96	0.114	33.52	0.122	91.34	0.160	90.50
	265 R2	NEGATIVA	0.680	1184.16	0.069	0	0.460	937.24	0.188	130.18
	77 R2	NEGATIVA	0.273	464.84	0.066	0	0.105	46.74	0.155	84.10
	31 R6	NEGATIVA	0.438	790.44	0.067	0	0.115	72.12	0.152	78.96
	29 R6	NEGATIVA	0.294	512.98	0.100	0	0.371	717.20	0.176	111.64
26 R8	NEGATIVA	0.272	462.26	0.130	76.52	0.095	17.14	0.162	92.58	
16 R6	NEGATIVA	0.351	629.14	0.221	330.36	0.500	1036.58	0.154	81.38	
1245 R2	NEGATIVA	0.338	602.00	0.095	0	0.151	167.58	0.278	288.86	
1946 R5	NEGATIVA	0.229	359.52	0.107	14.10	0.109	56.40	0.308	349.14	
1-134 (NO REGISTRO)	NEGATIVA	0.768	1313.36	0.203	279.06	0.309	564.08	0.303	339.70	
240 R1	NEGATIVA	0.317	560.74	0.117	41.84	0.120	85.76	0.399	558.40	
PROMEDIO			0.352	576.20	0.141	112.88	0.250	416.17	0.238	267.67

Los resultados de todos los niveles de IL-4, IL-6, INF-gama y TNF-alfa se muestran representados de manera resumida en el cuadro 18 donde se encuentra la identificación de la muestra, los resultados de los niveles de cada una de las citocinas en suero de calostro de vacas libres de TBb **Hato Libre**, una columna con su reactividad a PPD, las densidades ópticas obtenidas en los ensayos de ELISA y los niveles de molécula en pg/ml.

Cuadro 18. Resumen de niveles de citocinas de vacas Hato Libre [pg/mL] de todas las muestras del grupo de estudio.

GRUPO	MUESTRA	PPD	IL-4		IFN- γ		IL-6		TNF- α	
			Densidad Óptica	Concentración pg/ml						
MUESTRAS DE HATO LIBRE	HL 20	NEGATIVA	0.194	265.76	0.159	158.38	0.103	39.90	0.292	317.02
	HL 29	NEGATIVA	0.168	169.44	0.198	266.12	0.072	0	0.287	305.96
	HL 25	NEGATIVA	0.272	460.56	0.108	0	0.171	0	0.367	481.52
	HL 36	NEGATIVA	0.228	357.60	0.298	542.58	0.125	99.52	0.290	312.92
	HL 32	NEGATIVA	0.515	853.82	0.130	76.54	0.222	347.84	0.290	312.92
	HL 23	NEGATIVA	0.168	183.30	0.123	58.44	0.065	0	0.353	448.08
	HL 2	NEGATIVA	0.212	313.06	0.077	0	0.112	64.58	0.295	322.20
	HL 1	NEGATIVA	0.345	586.36	0.119	47.40	0.276	482.38	0.403	566.86
	HL 27	NEGATIVA	0.21	297.58	0.150	132.94	0.140	139.00	0.273	278.40
	HL 26	NEGATIVA	0.667	1141.88	0.097	0	0.166	206.18	0.330	397.56
	HL 24	NEGATIVA	0.258	427.04	0.137	97.34	0.139	136.40	0.318	370.42
	HL 13	NEGATIVA	0.675	1173.68	0.106	0	0.090	0	0.279	288.72
	HL 12	NEGATIVA	0.806	1365.92	0.169	180.46	0.652	1418.78	0.281	294.84
	HL 11	NEGATIVA	2.561	3409.96	0.105	0	0.767	1714.76	0.327	390.98
	HL 10	NEGATIVA	0.366	646.96	0.084	0	0.167	208.74	0.286	303.82
	HL 6	NEGATIVA	0.382	686.94	0.071	0	0.059	0	0.263	258.82
	HL 5	NEGATIVA	0.387	697.36	0.084	0	0.047	0	0.275	282.12
	HL 4	NEGATIVA	0.377	678.58	0.115	36.30	0.046	0	0.277	285.98
	HL 3	NEGATIVA	0.375	671.28	0.102	0	0.072	0	0.278	287.86
	HL37	NEGATIVA	0.329	582.32	0.121	51.56	0.045	0	0.302	337.60
	HL 35	NEGATIVA	0.446	791.02	0.120	50.18	0.098	26.84	0.333	404.20
	HL 31	NEGATIVA	0.278	477.08	0.144	116.76	0.098	25.80	0.324	383.36
	HL 18	NEGATIVA	0.334	594.40	0.081	0	0.170	216.42	0.343	425.34
	HL 16	NEGATIVA	0.540	964.10	0.089	0	0.333	623.40	0.296	325.38
	HL 14	NEGATIVA	0.309	544.00	0.081	0	0.108	53.72	0.297	326.22
	HL 15	NEGATIVA	0.363	644.74	0.079	0	0.115	72.76	0.427	628.62
	HL 22	NEGATIVA	0.442	797.32	0.106	0	0.224	354.10	0.430	636.06
	HL 33	NEGATIVA	0.416	751.20	0.196	259.62	0.063	0	0.282	296.86
	HL 30	NEGATIVA	0.228	359.88	0.161	163.92	0.084	0	0.301	334.70
	PROMEDIO			0.443	720.45	0.124	77.19	0.167	214.87	0.314

Los resultados de los niveles de IL-4 mostrados anteriormente en los cuadros de los tres grupos de estudio fueron graficados de acuerdo a su concentración en pg/ml, al realizar los análisis estadísticos de tipo no paramétricos Kruskal-Wallis y un post hoc Dunn's. No se observó diferencia significativa de los niveles entre los grupos de estudio, los niveles de IL-4 fueron de un rango de 36.50 - 3409.96 pg/ml, la mediana del grupo de estudio rectoras = 562.0, la del grupo No rectora = 551.7 y la hato libre = 644.7 como se muestra en la figura 15.

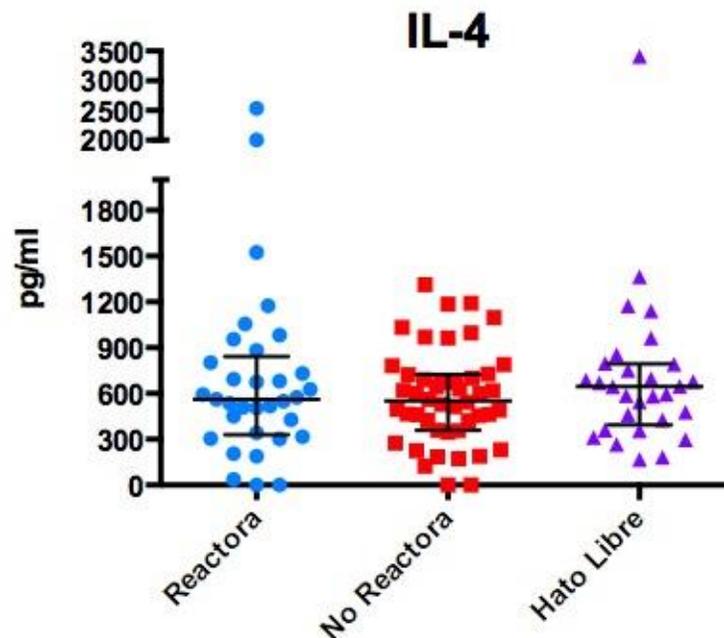


Figura 15. Niveles de IL-4 [pg/ml] en sueros de calostro de los grupos de estudio: Reactoras TST (+) n= 33, No Reactoras TST (-) n= 46 y Hatos libres n= 29.

Los niveles de interferón gama obtenidos de esta fase experimental fueron analizados mediante un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente se realizó un intervalo de confianza para la mediana de acuerdo a la prueba Dunn ($p \leq 0.05$), para determinar si existía alguna diferencia entre los niveles de los diferentes grupos de estudio, los niveles de INF-gama fueron de entre 5.76 - 542.58 pg/ml, la mediana para cada grupo de estudio de rectoras, No rectoras y hatos libres fue de 0, 0 y 36.30 respectivamente, no se observó diferencia

significativa de los niveles entre los grupos de estudio y muchas muestras no mostraron presencia de interferón gama (ver figura 16).

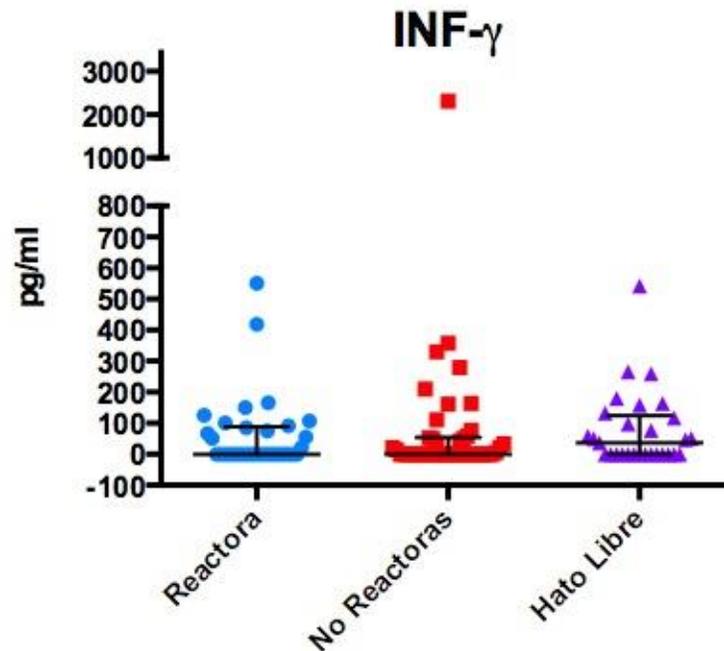


Figura 16. Niveles de interferón gama [pg/mL] en suero de calostro. Grupos: Reactoras TST (+) n= 33, No Reactoras TST (-) n= 46 y Hatos libres n= 29.

Los niveles de interleucina 6 (IL-6) fueron graficados de los tres grupos de estudio y se les realizaron las pruebas estadísticas Kruskal-Wallis y un post hoc de Dunn's para determinar si presentaba diferencias entre grupos se obtuvo significancia estadística en el entre el grupo reactoras y Hatos Libres con un valor de $p=0.0096$ y entre los grupos NO reactoras y Hatos Libre con un valor de $p=0.0406$. Los niveles de IL-6 fueron entre 17.14 a >5000 pg/ml, el grupo reactoras tuvo una mediana de 287.5, el grupo NO reactoras una mediana de 171.5 y finalmente el grupo hatos libres con 53.72 (ver figura 17).

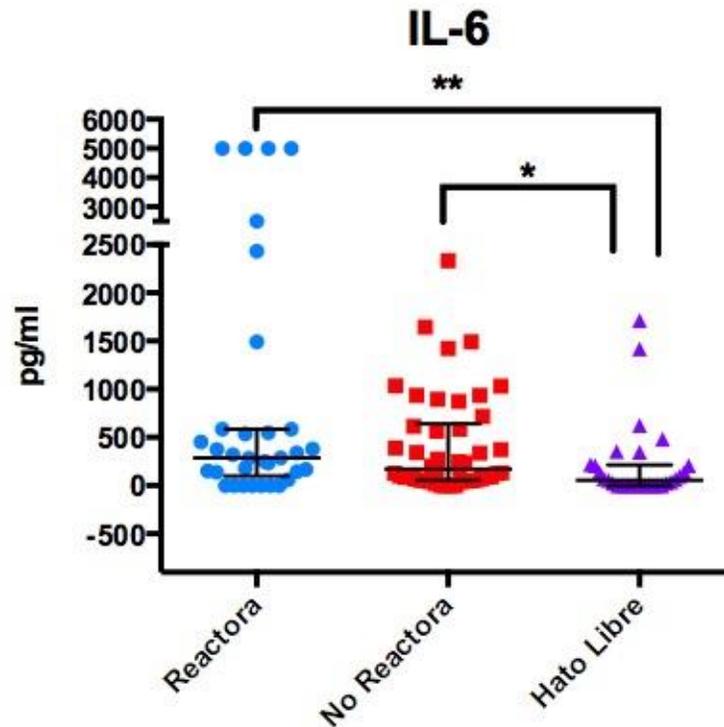


Figura 17. Niveles de interleucina 6 [pg/ml] en suero de calostro. Grupos: Reactoras TST (+) n= 33, No Reactoras TST (-) n= 46 y Hatos Libres n= 29; diferencia p=0.0096 (**), p=0.0406 (*)

Finalmente, los resultados de esta fase experimental fueron analizados mediante un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente se realizó un intervalo de confianza para la mediana de acuerdo a la prueba Dunn ($p \leq 0.05$). Se graficaron los niveles determinados por ELISA del factor de necrosis tumoral alfa, los niveles de TNF- α fueron desde 35.90-636.06 pg/ml, el grupo Reactoras tuvo una mediana de 84.50, el grupo No Reactoras una mediana de 124.1 y finalmente el grupo Hatos Libres la mediana de 325.4, las pruebas mostraron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Reactoras con No Reactoras con un valor de $p = 0.0287$, entre los grupos Reactoras con Hatos libres con un vapor de $p = <0.0001$ y otra diferencia entre No Reactoras con Hatos Libres con un valor de $p = <0.0001$ ver figura 18.

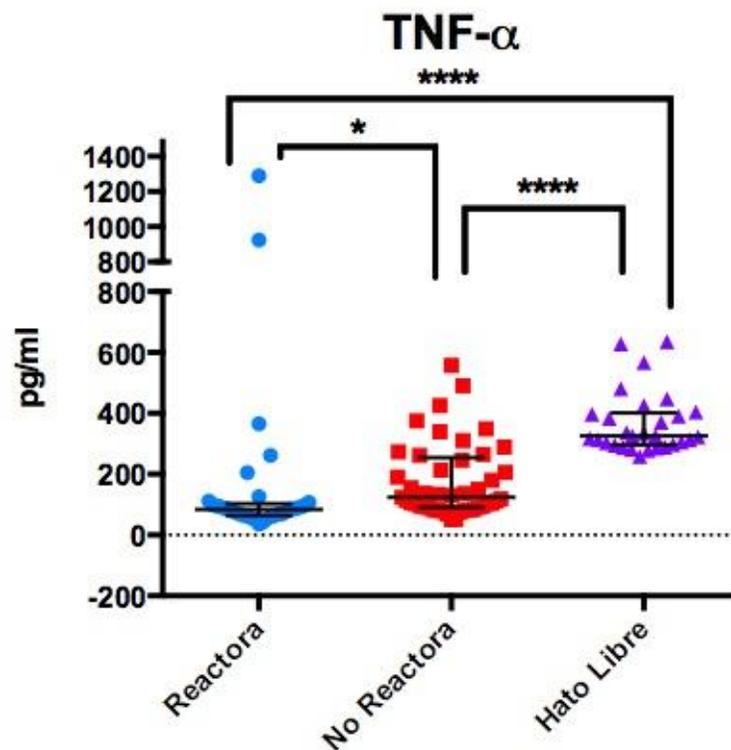


Figura 18. Niveles de Factor de Necrosis Tumoral alfa [pg/ml] en suero de calostro. Grupos: Reactoras TST (+) n= 33, No Reactoras TST (-) n= 46 y Hatos Libres n= 29; diferencia $p=0.0287$ (*), $p<0.0001$ (****) y $p<0.0001$ (****).

Los resultados de los niveles de citocinas mostraron que IL-4, IFN- γ , IL-6 y TNF- α si presentaron valores elevados, IL-4 presento los valores mas altos mientras que los valores de IFN- γ fueron disminuidos, estas dos moléculas anteriores no presentaron alguna diferencia significativa entre grupos, mientras que en IL-6 y TNF- α si hubieron diferencias.

Debido a que la inmunidad se puede ver afectada con la edad del individuo, se realizaron análisis basados en los resultados antes mencionados de los niveles de las moléculas IL-4, INF- γ , IL- 6 y TNF- α tomando en consideración el factor edad (número de partos) y la reactividad a PPD, con la finalidad de conocer si se presentaban diferencias entre los niveles de las citocinas con respecto a la edad puesto que el sistema inmune es menos efectivo con el paso de los años. Los

niveles de las citocinas fueron analizadas para descartar que se influenciaban por la variable del tiempo de vida del animal.

En la figura 19 se muestran los análisis de los niveles de IL-4, IFN- γ , IL-6 y TNF- α en el grupo Reactoras [pg/ml] y divididas en grupos por el número de partos de la vaca (1 y 2, 3 o 4) se les aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con un post hoc de Dunn's dichas pruebas no presentaron significancia estadística en ninguna de las moléculas.

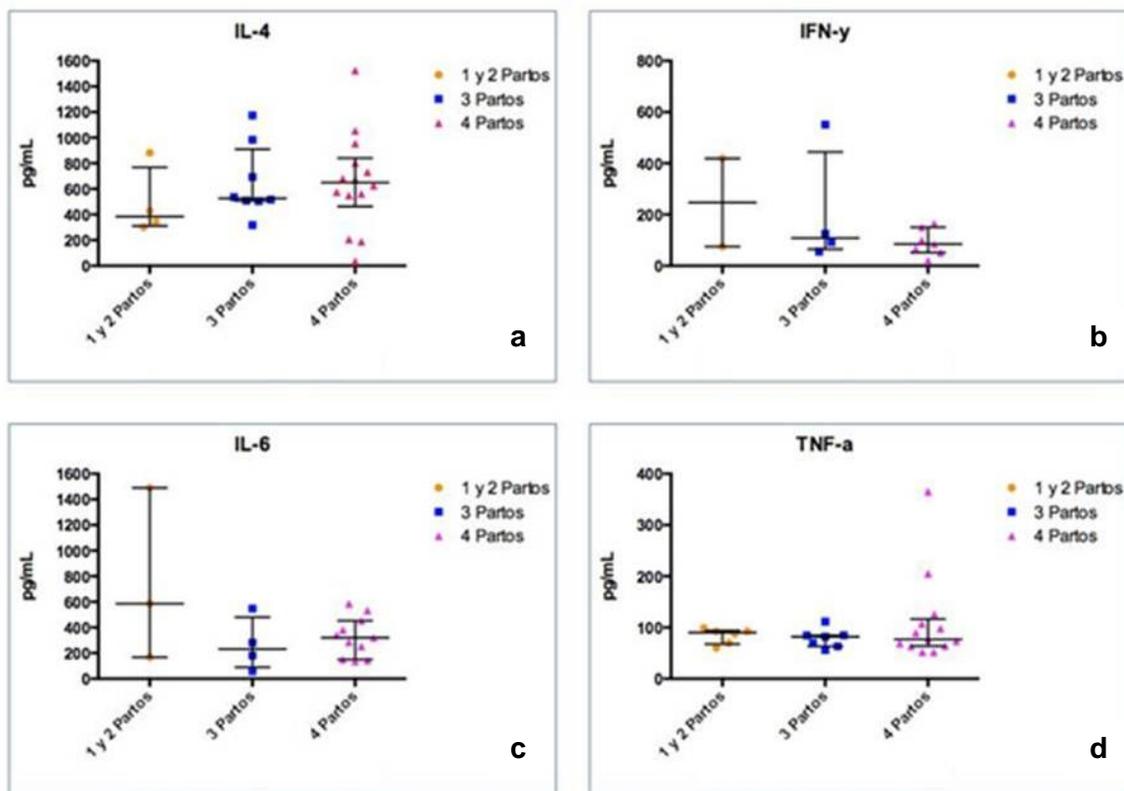


Figura 19. Niveles de citocinas [pg/ml] en sueros de calostro del grupo de estudio rectoras PPD (+) agrupadas por número de partos. **a)** Interleucina 4, **b)** Interferón gamma, **c)** Interleucina 6, **d)** Factor de necrosis tumoral alfa.

En la figura 20 se muestra el resumen de los resultados obtenidos de niveles de IL-4, IFN- γ , IL-6 y TNF- α por el número de partos en el grupo de las No Reactoras, se determinó ausencia de cualquier significancia estadística, se observó que en todas

las moléculas analizadas los valores se comportaron parecidos de tal manera que no influyo la edad de la vaca ni el número de partos en los niveles de las citocinas.

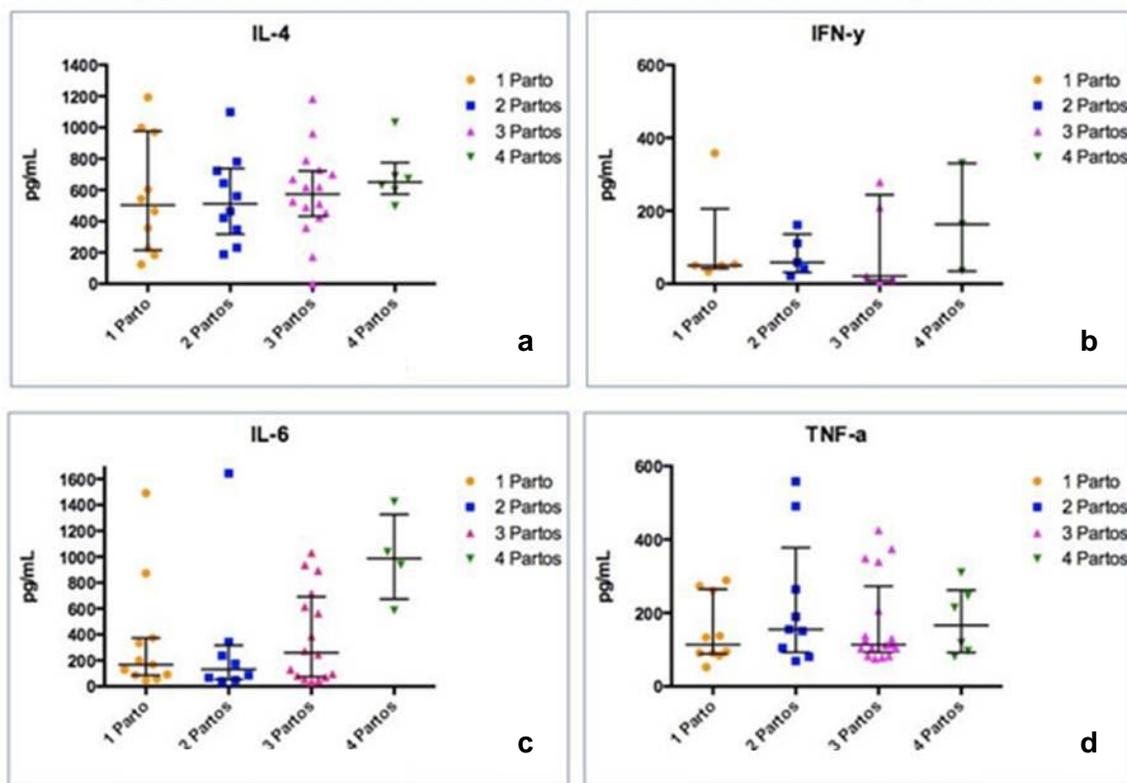


Figura 20. Niveles de citosinas [pg/ml] en sueros de calostro del grupo de estudio No Reactoras PPD (-) agrupadas por el número de partos. **a)** Interleucina 4, **b)** Interferón gamma, **c)** Interleucina 6, **d)** Factor de necrosis tumoral alfa.

Debido a que la citocina mas alta determinada por ELISA en mayor cantidad de alrededor de 500 ng/ml fue IL-4 por lo cual fue de nuestro interés evaluar el su perfil proteico en estas muestras, para lo cual primero se cuantificaron las proteínas totales, posteriormente fueron separadas en geles de poliacrilamida. De esta manera determinamos la presencia cualitativa de IL-4.

Los resultados del perfil proteico en gel de poliacrilamida de muestras de suero de calostro de vacas rectoras, no rectoras y hatos libre, mostraron bandas de

diferentes tamaños algunas correspondientes al peso de la cadena pesada (55 kDa) y cadena ligera (26 kDa) de las inmunoglobulinas y se observó una banda débil de alrededor de 14 kDa que podría ser IL-4 ver figura 21.

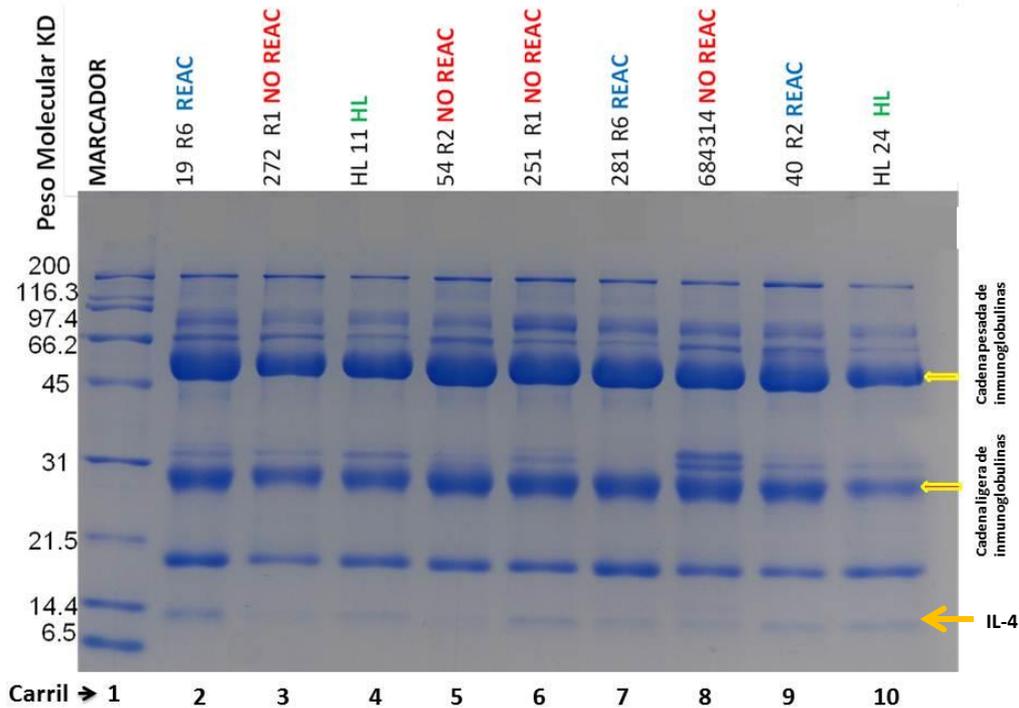


Figura 21. Gel de poliacrilamida 12 %. Carril: 1) Marcadores de peso molecular; 2) muestra 19 reactiva a PPD (+) del rancho 6; 3) muestra 272 no reactiva a PPD (-) del rancho 1; 4) muestra 11 de hato libre; 5) muestra 54 PPD(-) del rancho 2; 6) muestra 251 PPD (-) del rancho 1; 7) muestra 281 PPD(+) del rancho 6; 8) muestra 684314 PPD (-); 9) muestra 40 PPD (+) del rancho 2; 10) muestra 24 de hato libre.

Debido a la gran cantidad de proteínas incluídas las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas que estaban en gran cantidad se decidió para favorecer la presencia de IL-4 la semipurificación de estas muestras utilizando un filtro menor de 30 kDa y las muestras fueron concentradas por filtración, después fueron precipitadas con acetona, en las fracciones se cuantificaron las proteínas totales, posteriormente fueron separadas en gel de poliacrilamida, se realizaron dos gels con su respectivo marcador cada gel, un gel se tiñó con azul coomassie y el otro gel

se transfirió a membrana de nitrocelulosa para probar reconocimiento por inmunoreactividad utilizando los anticuerpos antes mencionados anti-IL-4 en ensayos de Western Blot en un ensayo tipo Western Blot.

Los resultados del gel teñido con coomassie muestran la molécula de alrededor de 14 kDa concentrada como se muestra en la figura 22 a) el marcador de peso molecular en el carril 1, seguido de dos repeticiones de la muestra concentrada ambas presentan la banda del peso de 14kDa que concuerda con el peso de la interleucina IL-4. En la misma figura sección b) se muestra la membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau para verificación de las proteínas transferidas, después se le realizó el ensayo Western blot donde no se obtuvo ningún resultado o detección de los anticuerpos por esta razón no se muestra la imagen de la membrana de nitrocelulosa revelada.

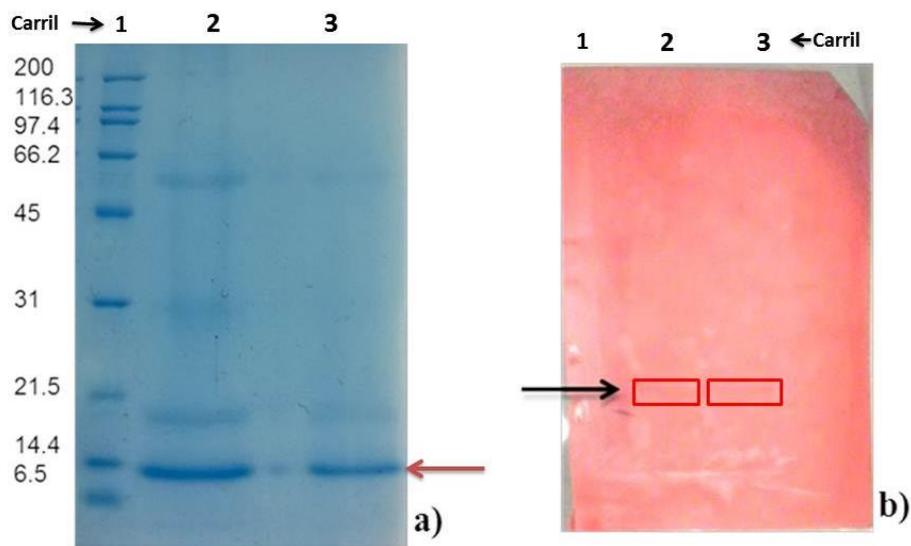


Figura 22. a) Gel de poliacrilamida de proteínas concentradas con unidad de filtración de un grupo de muestras altas en IL-4. Carril: 1) marcador de peso; 2) muestra de IL-4 concentrada; y 3) duplicado de muestra de IL-4 concentrada. **b)** Membrana de nitrocelulosa transferida para Western blot teñida con rojo de ponceau.

8.1 Resumen de resultados

En este estudio se evaluó la diferencia entre los niveles de las citocinas IL-4, IFN-gama, IL-6 y TNF-alfa en muestras de calostro bovino de vacas de ranchos con alta prevalencia a *Mycobacterium bovis* en tres diferentes grupos de estudio generados de la reactividad a tuberculina (reactoras, NO reactoras y hatos libres). Como primera conclusión los niveles de citocinas no se ven afectados considerando el factor edad de acuerdo a los análisis en las muestras de sobrenadante de calostro que fueron analizadas por el número de partos figuras 19 y 20. En el presente trabajo se logró estandarizar la técnica ELISA para la determinación de niveles de interleucina 4 (IL-4) ya que no se contaba con algún kit comercial.

Se cuantificaron los niveles de las cuatro citocinas de estudio (IL-4, IFN- γ , IL-6 y TNF- α) en los tres grupos de estudio (Reactoras, No Reactoras y Hatos Libres) de muestras de calostro bovino donde se obtuvieron diferencias significativas en reactoras y no reactoras a TST con hatos libres en citocinas IL-6 y TNF- α .

Se identificó en nuestro estudio la presencia de citocinas tempranas proinflamatorias IL-6 y TNF- α con diferencias significativas y niveles considerables sobre todo en el grupo hatos libres se observó marcada la diferencia de TNF- α con respecto a los otros grupos, dicha identificación es de gran relevancia ya que no existen muchos reportes de lo encontrado en este trabajo en muestras de calostro.

9. DISCUSIÓN.

La habilidad de distinguir entre el tipo de respuesta Th1 y Th2 proporcionara valiables ideas en el papel que juega IL-4 en la respuesta inmune bovina contra patógenos. En el presente no hay pruebas de confianza para la medición de IL-4 en ruminantes. La detección de IL-4 por ELISA proporciona un fiable ensayo que podría ser rutinariamente usado en lugar de los bioensayos que han sido usados para detectar IL-4 bovina. Ambos IFN- γ como IL-4 han sido reportados previamente en ganado infectado con *M. bovis*, estos estudios utilizan células B para la detección de IL-4, pero también pueden detectar la presencia de otras citocinas bovinas. Por lo que nos surgió la duda si los anticuerpos comerciales que se utilizaron en el ELISA podrían ser empleados para ensayos de tipo WB y el resultado fue negativo, no se detecto IL-4 en muestras de calostro por esta técnica ya el anticuerpo que se utilizó no detecto a la molecula y no se realizó la unión antígeno anticuerpo o la cantidad de IL-4 no fue sufuciente.

La inmunidad contra la tuberculosis implica una serie compleja de interacciones entre varias poblaciones celulares. Estudios de células T helper en ratón y humano han demostrado que existe respuesta divergente y que el tipo de célula T herper responde provocado por patógenos que puedan determinar el resultado de infección. El paradigma Th1/Th2 ha sido útil en comprensión a la compleja interacción de células mediadas y humorales respuestas inmunes. A la fecha existen pocos reportes de la presencia de citocinas en calostro bovino, Hagiwara reportó niveles de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α , secretado por la glándula mamaria en el calostro en condiciones experimentales controladas (Hagiwara et al, 2000), la diferencia con el estudio que se describe en esta tesis es que en este estudio fue realizado con muestras de calostro bovinos en campo los cuales están naturalmente expuestos a TBb y además en ranchos de alta prevalencia.

IL-4 citocina característica de la subpoblación Th2 y actúa como inductora y efectora de estas células. Antagoniza los efectos activadores de macrófagos del IFN- γ y por consiguiente, inhibe las reacciones inmunitarias celulares. En nuestro trabajo no se encontró ninguna diferencia significativa de niveles de IL-4 entre grupos lo que

concuerta con Taylor y colaboradores (1994). Aunado a ello reportes en modelo ratón muestran que dosis bajas inducen preferentemente una respuesta Th1 por el aumento significativo de las citocinas IL-2 e IFN- γ , mientras que dosis altas favorecen el desarrollo de una respuesta Th2 debido a la producción de IL-4 e IL-10, respuesta que no favorece resistencia ante el desafío micobacteriano (Gonzalez et al, 2012) En nuestro estudio se apreció el mismo efecto ya que por las altas concentración de IL-4 se inclina el perfil de citocinas a Th2 ya que por su predominancia inhibe la producción de IFN- γ por lo tanto se reprime el perfil Th1.

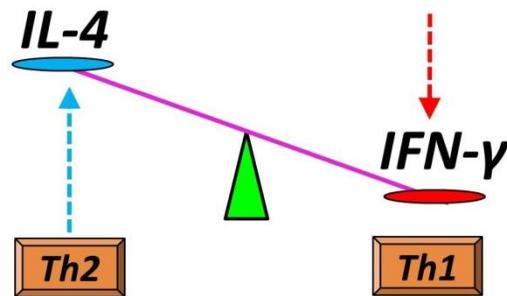


Figura 23. Resumen del predominio del perfil inmune por los niveles de IL-4 e IFN- γ .

El rol de IL-4 en respuesta inmune a *mycobacteria* es un tema de gran interés reciente. Un numero de estudios se han realizado en humanos y ratones infectados con *Mycobacteria tuberculosis* y estos indican que la producción de IL-4 es asociado con la progresión de enfermedades y reactivación de enfermedades latentes (Hope et al, 2005). El papel que juega IL-4 en la patogénesis de TB en la actualidad no está claro y debe ser el foco de nuevos estudios en humanos y bovinos.

IFN-gama es una citocina asociada al perfil Th1 la cual es la principal activadora de los macrófagos y realiza funciones críticas en la inmunidad innata y la inmunidad celular adaptativa, con origen en linfocitos CD4, CD8, también es producido por linfocitos Th1, LTC y por células NK. Además posee una importante actividad inmunoreguladora, tiene funciones importantes en la inmunidad celular frente a los microorganismos intracelulares, además de activar macrófagos para destruir microorganismos fagocitados, los niveles de IFN- γ se comportaron de manera similar pero con valores disminuidos o cercanos a cero de 5.76- 542.58 pg/ml lo cual no arrojo ninguna significancia estadística la prueba estadística. Lo reportado en

pacientes con estado avanzado de tuberculosis pulmonar se induce el aumento de producción de IL-10 y disminuye la producción de IFN- γ (Deveci, et al 2005).

Existen evidencias de que citocinas son expresadas dependientes del embarazo por el endometrio bovino. Un estudio realizado por Almeria et al en el 2012 mostro que IL-10, IL-12 y TNF- α son constantemente expresado a través del embarazo, mientras IFN- γ y IL-4 son expresados incrementando en el día 120 del embarazo. Tal vez el perfil de expresión de citocinas por el endometrio influye en la distribución endometrial de células inmune en la vaca.

Varios estudios previos han documentado cambios en expresión de citocinas proinflamatorias en torno al tiempo de parto en las glándulas mamarias infectadas. Por ejemplo el incremento de la expresión de citocinas proinflamatorias incluyendo IL-1 β , IL-6, IL-8, y TNF- α han sido vinculado a la patología de mastitis aguda durante el periodo de periparturiento (Oviedo-Boyso et al, 2007). Los macrófagos son el principal tipo celular inmune presente en leche y el tejido de las glándulas mamarias lactantes sanas y puede facilitar el reclutamiento de neutrófilos vía a través de varias citocinas tales como interleucinas y TNF- α en el inicio de la inflamación. TNF-alfa es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, principal responsable del shock séptico asociado a bacteriemias, implicado en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos. En nuestro trabajo que se realizó si hubo significancia estadística entre los tres grupos de estudio porque se comportaron de manera diferente entre ellos: No Reactoras- Reactoras P= 0.0287, HL- Reactoras P= <0.0001 y HL- No Reactoras P= <0.0001, la presencia de TNF- α en los grupos donde las vacas esta expuestas y en contacto con TB con niveles de: reactoras= 35.90-125.72, no reactoras= 50.28-409.58 mientras que el grupo de los hatos libre de TB se comporta con valores un poco más elevados que los otros dos grupos (HL= 317.02- 636.06) y esto es relevante puesto que reportes por Deveci y colaboradores en el 2005 donde encontraron significativamente planteados niveles en suero de IL-10, IL12, TNF- α y IFN- γ en pacientes humanos con tuberculosis pulmonar activa. TNF- α es producida en el sitio de enfermedad en pacientes con tuberculosis. Un deterioro clínico al principio del

tratamiento lo asocio con un aumento selectivo de TNF- α en plasma. En particular, pacientes con tuberculosis pulmonar acompañado por manifestaciones sistémicas (persistente fiebre y pérdida de peso) mostraron aumento de TNF- α y IL-10, otro reporte de previos estudios donde mostraron altos niveles de TNF- α los pacientes humanos con tuberculosis pulmonar. También en sueros los niveles de TNF- α fueron significativamente altos en pacientes activos e inactivos a tuberculosis. Además el aumento de TNF- α se ha reportado en las primeras etapas de tuberculosis, y esto extiende a plasma de contactos de pacientes con tuberculosis pulmonar que son sospechosos de estar en los primeros estados de infección de TB pero no son pacientes confirmados de TB (Deveci, et al 2005). Sin embargo en el caso del calostro los niveles están disminuidos en los grupos expuestos a TB mientras que los niveles de hatos libres están aumentados como lo reportado por Hagiwara y colaboradores en el 2000 donde ve concentraciones altas de TNF- α en calostro de vaca en condiciones experimentales controladas sumado a que esta citocina es parte del perfil Th2. Ishikawa y colaboradores en 2004 menciona que durante el embarazo, la función de las células Th1 se contuvo y se hizo evidente que la función de las células Th2 se convierte en dominante en ratones y seres humanos. Ohtsuka en 2009 sugiere que la función inmune durante el embarazo y la inmunidad humoral se convirtió dominante en vacas embarazadas en etapa tardía de gestación

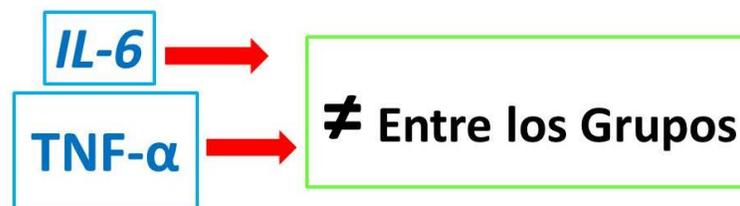


Fig. 24: Resumen de citocinas proinflamatorias.

Interleucina 6 es una citocina proinflamatoria pleiotropica producido por inmunidad innata así como células T. Un gran número de estudios en diferentes especies ha evaluado el papel de IL-6 en la tuberculosis. Por ejemplo. Aldwell y colaboradores en 1996 mostraron que IL-6 fue secretado por macrófagos bovinos después de la infección con *M. bovis*. También reportan conflictos en los datos para conocer y tratar de

determinar si la IL-6 ejerce beneficio o perjudiciales efectos en la tuberculosis. Otros estudios en humanos han mostrado una asociación de IL-6 con la tuberculosis pulmonar activa comparado con los sujetos sanos o en comparación con individuos latentemente infectados y en algunos otros estudios con tratamiento a tuberculosis activa reduce la producción IL-6 (Vordermeier et al, 2012). Lo cual concuerda con nuestros resultados teniendo concentraciones considerables en los tres grupos de estudio entre 17.14- >5000 [pg/ml] generando significancia estadística entre dos grupos de estudio una fue entre Reactoras y Hatos libres con una P= 0.096 y la otra entre No Reactoras y Hatos libres con una P= 0.0406 donde los dos grupos que tuvieron contacto con TB se comportaron parecidos entre si mientras que el grupo de los HL se encuentra disminuido.

Sin embargo es difícil determinar si esto es un reflejo de la actividad inflamatoria en curso durante la tuberculosis activa o representa un directo vínculo entre IL-6 y la patología a la susceptibilidad del huésped. En contraste estudios en el gen de IL-6 alterado en ratón han sugerido un rol de IL-6 en la protección contra tuberculosis y en el mantenimiento pero no iniciación de granulomas. Además experimentos de vacunación en primates han asociado a distintivo perfil de citocinas incluyendo IL-6 con protección (Reed et al, 2009), mientras un reciente estudio en ratón han hecho hincapié en su papel en el establecimiento de la respuesta inmune local después de la vacunación subunitaria de TB. IL-6 también promueve la diferenciación de células Th17 murino y (en menor grado) humano, un subconjunto de células T recientemente vinculado a protección contra tuberculosis (Vordermeier et al, 2012).

Un estudio de Yukikawa en el 2004 reportó cambios en concentración de IL-6 en sangre periférica pre y post parto en ganado lechero y su relación a enfermedades reproductivas postparto mostró que las concentraciones de IL-6 antes del parto fueron más altas que aquellos después del parto. Esto podría ser viable solo que en nuestro estudio se realizó en calostro y por ello no se midieron los niveles de IL-6 antes del parto.

10. CONCLUSION

Se encontraron niveles detectables de las cuatro citocinas en los tres grupos de estudio por la técnica de ELISA. IL-4 presento los mayores niveles de concentración lo que nos confirma que el perfil en muestras de calostro con alta prevalencia a tuberculosis bovina se inclina a Th2 aunado a ello IL-6 refuerza dicha inclinación por sus niveles en los dos grupos de estudio que han estado expuestos a *M. bovis* reactoras y no reactoras a diferencia del hato libre con niveles bajos. Sin embargo dicha inclinación al perfil Th2 podría estar influenciada por otros factores como el estado de gestación de la vaca lo cual podría estar influenciando la supresión de IFN- γ con niveles bajos o indetectables contradiciendo a la asociación de esta citocina con la respuesta inmune protectora contra tuberculosis bovina.

Se encontró que los niveles de TNF- α en el grupo de HL se encontraron elevados a diferencia de los grupos que han estado en contacto con *M. bovis* esto marca una diferencia ya que este resultado es relevante y podría dar pie a posteriores estudios y tratar de implementar algún tipo de prueba de diagnostico.

Se concluye de manera general que la transferencia pasiva maternal es esencial para la maduración y supervivencia del becerro ya que se comprovo dicha transferencia por los niveles encontrados en las muestras de calostro y que dichas muestras tienen un perfil Th2 además de la presencia de citocinas proinflamatorias tempranas.

11. EXPECTATIVAS

Aunque este estudio no mostró diferencia de todas las citocinas determinadas entre grupos, si hubo niveles que apoyan la hipótesis. Por lo tanto, los datos actuales estimularán más estudios al respecto en el grupo de trabajo y abundar más en ellos y complementándolos con otras investigaciones como analizar a nivel de expresión las citocinas a través de RT-PCR y determinar las proporciones de subpoblaciones

célulares CD4, CD8 y WC1 presentes en calostro de bovinos reactivos y no reactivos a PPD.

12. BIBLIOGRAFÍA.

Abalos P., and P. Retamal. 2004. Tuberculosis: Una zoonosis re-emergente? Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 23(2):583-594.

Abbas A. K., Lichtman A. H. 2007. Inmunología Celular y Molecular mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria. Elsevier. España. 4: 241-297.

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

Agarwal N, G. Lamichhane, R. Gupta, S. Nopan, W. R. Bishai. 2009. Cyclic Amp intoxication of macrophages by a mycobacterium tuberculosis adenylate cyclase. Nature 466:98-102.

Aldwell F. E., D. N. Wedlock, and B. M. Buddle. 1996. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. Immunology and cell biology 74: 45-51.

Alluwaimi A. M. 2004. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. Research in Veterinary Science. 77: 211-222.

Almeria S., B. Serrano, J. L. Yaniz, L. Daewich, and F. Lopez-Gatius. 2012. Cytokine gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from *Neospora caninum* naturally infected dams throughout gestation. Vet Parasitol. 183: 237-243.

APS biogrup. (2012). *apsbiogroup.com*. Recuperado el 09 de Enero de 2013, de <http://es.apsbiogroup.com/colostrum/about.php>

Aranaz A., D. Cousins, et al. 2003. "Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp.nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53(Pt 6): 1785-1789.

Baldwin C. 2002. Immune response overview. Vet Microbiol, 90: 365-366.

Bartley P. M., Wright S. E., Maley S. W., Macaldowie C. N., Nath M., Hamilton C. M., Katzer F., Buxton D. and Innes E. A. 2012. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. *Veterinary research*. 43:1-38

Baver J., Thomesen V., Poulsen S. y Andersen A. 1997., False positive results from cultures of *Mycobacterium Tuberculosis* due to laboratory cross contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism.

Beer J. 1981. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. España. 229-249.

Blum, J. W. & Hammon H. 2000. Colostrum effects on gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66, 1151–1159.

Boudry C., Dehoux J. P., Portetelle D. and Buldgen A. 2008. Bovine colostrum as a natural growth promoter for newly weaned piglets: a review. *Biotechnol. Agrom. Soc. Environ.* 12 (2) 157-170.

Bourgot C., S. Ferret-Bernard, L. Normand, G. Savary, E. Menendez, S. Blat, E. Appert, F. Respondek y I. L. Hhueron. 2014. Maternal shot-chain fructooligosaccharide suplementacion influences intestinal immune system maturation in piglets. *Plos one. france* 9: 1-12.

Buddle BM, Wedlock N, Denis M, Skinner MA. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108(1-2):45-51.

Chan J., Kaufmann S. H. E. Inmune Mechanism of protection. *Tuberculosis pathogenesis, protection, and control*. Washigton (DC): Asm Prees, 1994:398-416.

Daborn C. J., J. M. Grange, and R. R. Kazwala. 1996. The bovine tuberculosis cycle— an African perspective. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 25:27S-32S.

Dean G. S., Rhodes S. G., Coad M., Whelan A. O., Cockle P.J., Clifford D. J. 2005. Minimun infective dose of *mycobacterium bovis* in catte. *Infect immune.* 73 (10) 6467-6471.

Deveci F., H. H. Akbulut, T. Turgut, and M. H. Muz. 2005. Changes in Serum Cytokine Levels in Active TuberculosisWith Treatment. *Mediators of Inflammation* 256–262

Díaz-Otero F., Banda-Ruiz V., Jaramillo-Meza L., Arriaga-Díaz C., González-Salazar D. y Estrada-Chávez C., 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet. Méx.* 34 (1) 13-26.

Dinarello C. A. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112: 321S–329S.

Espinosa, A. L. (2011). Guía Práctica sobre la técnica PCR. IVIC.

Elizondo J. 2007. Alimentación y manejo del calostro en el ganado de leche. *Agronomía Mesoamericana* 18(2): 271-281.

Ezzat M., M. Quintela, K. Böhme, I. Fernández, S. Caamaño, P. Calo, and J. Barros. 2014. Review Article. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Veterinary Medicine*. 2014:1-31"

Finney D.J. 1964. *Statistical Methods in Biological Assays*, Second Edition. Charles Griffin, London, UK.

Geiger T., Andus T., Klapproth J., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P. C. 1988 Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur J Immunol*, 18:717–721.

Gonzales X., L. Jaramillo, R. Lascurain, J. Torres, E. Quevillon y F. Diaz. 2012. Evaluation of T lymphocyte subpopulations in cattle vaccinated against bovine tuberculosis: longitudinal comparative study. *Rev Mex Cienc Pecu* 3(2): 137-154.

Hagiwara K., Domi M., Ando J. 2008. Bovine colostrum CD8-positive cells are potent IFN- γ -producing cells *Veterinary Immunology and Immunopathology* 124: 93–98

Hagiwara K., Kataoka S., Yamanaka H., Kirisawa R., Iwai H. 2000. Detection of cytokines in bovine colostrums. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Japan. 76: 183-190.

Hardie, R. M., J. M. Watson. 1992. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol. Infect.* 109:23–33.

Harris T. H., N. M. Cooney, J. M. Mansfield, D. M. Paulmock. 2006. Signal transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. *Infect immune*. 74(8): 4530-7.

Heifets, L. 2004. Mycobacterium infections other than tuberculosis and leprosy Infections causes by nontuberculous Mycobacterium -NTM. *Sem Resp Crit Care Med*, 283-96.

Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. 1990 Interleukin-6 and acute phase response. *Biochem J*, 265:621-636.

Herrera S. E., M. A. Gordiano, G. Lopez, L. Bojorquez, F. J. Padilla, A. L. Pereira, M. A. Florres, and C. Estrada. 2013. Mycobacterium bovis DNA detection in colostrum as a potential indicator of vaccination effectiveness against bovine tuberculosis. *CLin. Vaccine Immunol*. 20(4): 627-633.

Hope J. C., L. S. Kwong, M. Thom, P. Sopp, W. Mwangi, W. C. Brown, G. H. Palmer, S. Wattedgedera, G. Entrican, C. J. Howard. 2005. Development of detection methods for ruminant interleukin (IL-4). *Journal of Immunological Methods* 301: 114-123.

Ishikawa Y., K. Nakada, K. Hagiwara, R. Kirisawa, H. Iwai, M. Moriyoshi, and Y. Wamuka. 2004. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre-and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *J. Vet. Med. Sci*. 66(11): 1403-1408.

Jubb P. K. y Palmer N., 1992. Patología de los animales domésticos. 4ta Edición. Editorial Labor, Tomo I 527 pp.

Kaufmann H. E., G. Hussey, and P. H. Lambert. 2010. Tuberculosis 6 New vaccines for tuberculosis. Department of immunology, max planck institute for infection biology. Berlin Germany. 375:2110-2119.

Khader S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nature Immunology*. 8: 369-377.

Kistermann J. C., Torres P. M. 2000. Epidemiología de la tuberculosis bovina. En: Torres P. Actualización en Tuberculosis bovina. SENASA. Buenos Aires. 39-48.

Kleinsmith A., Ph D. 2011. Related to bovine colostrum. Its relationship and use en the treatment of disease in humans. Scientific and medical research. 1-31.

Lee C.S., Wooding F.B., Kemp P., Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows, J. Dairy Res. 47 (1980) 39–50.

Leitner, G., E. Lubashevsky, A. Glickman, M. Winkler, A. Saran, and Z. Trainin, 2003. Development of a Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials. Vet. Immunol Immunopathol 93: 31-8. (a)

Liebler-Tenorio, E.M., Riedel-Caspari, G., Pohlenz, J.F., 2002. Uptake of colostrum leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. Vet. Immunol. Immunopathol. 85, 33–40.

Llamas laboratorio y servicios. 2012. BOVINOS falla de transferencia pasiva de inmunidad. Argentina.

Lonnerdal B., Iyer S. 1995. Lactoferrin: molecular structure and biological function. Cancer Invest 11:732–742.

Magariños, H. 2000. Producción higiénica de leche cruda. Guatemala: Producción y Servicios Incorporados S.A.

Matthias D. 1980. Infecciones por micobacterias: Tuberculosis. En: Beer, J. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Acribia. España. 229-252.

McGuirk, S. M., Collins M. 2004. Managing the production, storage and delivery of colostrum. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 20(3):593-603.

Meglia G.E., H. T. Mata. 2001. Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam 1-12.

Naka T., Nishimoto N., Kishimoto T. 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis Res 4(Suppl 3), S233–S242.

Nguyen T., L. Yuan, M. S. P. Azevedo, K. Jeong, A. M. Gonzales y L. Saif. 2007. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117: 236-248.

Ohtsuka H., S. Terasawa, C. Watanabe, M. Kohiruimaki, M. Mukai, T. Ando, K. Petrovski y S. Morris. 2009. Effect of parity on lymphocytes in peripheral blood and colostrum of healthy holstein dairy cows. *The Canadian journal of veterinary research*. 74:130-135.

O'Reilly L. M., Daborn C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis*; 76 Supl 1: 1-46.

OIE Organizacion Mundial de Sanidad animal. 2004. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.

Oliveira LL. J., R. S. N. Barreto, F. Perecin, N. Mansouri-attia, F. T. V. Pereira y F. v. Meirelles. 2012. Modulation of maternal immune system during pregnancy in cow. *Reprod Dom Anim* 47 (suppl) 384-393.

Palmer, G.H. and Mudd, A. 1974. The survival and possible multiplication of *Salmonella* Dublin and *Salmonella typhimurium* in stored bovine colostrums. *Vet. Record* (16): 129

Philadelphia, T. C. 2010. The History of vaccine. Recuperado el 8 de 10 de 2012, de The History of vaccine: <http://www.historyofvaccines.org/es/contenido/articulos/inmunizaci%C3%B3n%20pasiva>

Phillips C. J., C. R. Foster, P. A. Morris, and R. Teverson. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci*. 74(1): 1-15.

Pollock J. M., Rodgers J. D., Welsh M. D., McNair J. 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Veterinary microbiology*, 112: 141-150.

Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, et al. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2001;81(1-2):103-107.

Prat Aymerich, D. B. 2006. *Mycobacterium bovis*. Control Calidad SEIMC.

Quigley J. D. III, J. J. Drewry, K. R. Martin. 1998. Estimation of plasma volume in Holstein and Jersey calves. *J. Dairy Sci* 81: 1308-1312.

Radostits O., Blood O., Gay C., Hinchcliff K. 2002. *Medicina veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. España 9a ed. p 1076-1085.

Rainard P. and C. Riollot. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland; *Veterinary Research*, vol 37, no. 3 369-400.

Ramírez Rivera, N. A., Cocotle Ronzón, B. E., Mendéz Pérez, A., & Arenas Benhumea, J. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Revista Medica de la Universidad Veracruzana*.

Reed S. G., R. N. Coler, W. Dalemans, E. V. Tan, E. C. DeLa Cruz, R. J. Basaraba, I.M. Orme, Y. A. Sheiky, M. R. Alderson, K. D. Cowgill, J.P. Prieels, R. M. Abalos, M. C. Dubois, J. Cohen, P. Mettens, and Y. Lobet. 2009. Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 106: 2301-2306.

Rivera P. S. y Giménez J. F., 2010. La tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria* 1695-7504 volumen 11.

Roa I., C. Smok, and R. Prieto. 2012. Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *Int. J. Morphol.*, 30(4):1490-1496,

Roth, J. and D. Desmech. 1998. Non-specific immunity. In: P. P. Pastoret, P. Griebel, H. Bazim, A. Govaerts (Eds.) *Handbook of Vertebrate Immunology*, Academic Press. New York, pp. 466-71.

Sacerdote P., F. Mussano, S. Franchi, A. E. Panerai, G. Bussolati, S. Carossa, and A. Bartorelli. 2013. Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum. *J Dairy Sci*. 96:1745-1754.

SAGARPA Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (18 de Marzo 2015). <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>.

- Saito S., Maruyama M., Kato Y., Moriyama I., Ichijo M. 1991. Deteccion of Il-6 in human milk and its involvement in IgA production. J. Reprod. Immunol. 20: 267-276.
- Salmon H. 1999. The mammary gland and neonate mucosal immunity. Veterinary Immunology and Immunopathology 72 (1999) 143-155.
- Scammell A. W. 2001. Produccion and uses of colostrum. Aut. J. Dairy Technol. 56(2) 74-82.
- Schroeder H.W. Jr.,D. Wald, N. S. Greenspan. 2008. Immunoglobulins: Structure and Function. Fundamental Immunology, 6th Edition 1-41.
- Schurig G., Roop R., Bagchi T., Boyle S., Bubrman D., Sriranganathan N. 1991. Biological properties of RB51, a stable rough strain of Brucella abortus. Vet. Microbiol, 28:171-188.
- Secretaria de Agricultura, Ganaderia y Desarrollo Rural (SAGAR). 1995. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-031-ZOO-1995, campaña nacional contra la tuberculosis bovina. (*mycobacterium bovis*).
- Shafer–Weaver K.A., and L. M. Sordillo. 1997. Bovine CD8+ lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. Vet. Immunol. Immunopathol 56: 53–64.
- Smith K. L. and Todhunter. 1982. The physiology of mammary gland during the dry period and the relationship to infection. Annu. Mtg. Natl. Mastitis Council., Louisville, KY. Natl. Mastitis Council., Inc., Arlington, VA. 87.
- Solomons N. W. 2002.Modulation of the immune system and the response against pathogens with bovine colostrums concentrates. Eur J Clin Nutr. 56 (S3): 450-60.
- Steele, M.L., McNab W.B., Poppe C., Griffiths M.W., Chen S., Degrandis S. A., Fruhner L.C., Larkin C.A., Lynch J.A., and Odumeru J.A. 1997. Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. J. Food Protection. 60(11):1341-1346.
- Stelwagen K., E. Carpenter, B. Haigh, A. Hodgkinson and T. T. Wheeler. 2008. Immune components of bovine colostrum and milk. J ANIM SCI 2009, 87:3-9.
- Stott G. H. and Fella A. 1983. Colostral immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves. J. Dairy Sci. 66: 1319-1328.

Stott G. H., Marx D. B., Menefee B. E., and Nightengale G. T. 1979a. colostral immunoglobulin transfer in calves II. The rate of absorption. J. Dairy Sci. 62: 1766-1773.

Stott G. H., Marx D. B., Menefee B. F. and Nightengale G. T. 1979b. colostral immunoglobulin transfer in calves III. Amount of absorption. J. Dairy Sci. 62: 1902-1907.

Streeter, R. N., Hoffsis G. F., Bech-Nielsen S., Shulaw W. P., and Rings D. M. 1995. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am J Vet Res. 56(10):1322-1324.

Suárez A., L. Mozo, and C. Gutiérrez Martín. 2003. 09 citocinas y quimiosinas. www.inmunologiaenlinea.es

Suárez A., R. Tejada, L. Mozo, C. Gutiérrez Martín and J. Peña. 2003. Citocinas y sus receptores. [Http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/sitemap/03mmm11?tmpl=component&print=1&page=](http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/sitemap/03mmm11?tmpl=component&print=1&page=)

Tizard I. 1996. Veterinary Immunology: an introduction. 5th Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA.

Tizard I. 2002. Inmunología veterinaria. España. 371-379.

Unión Ganadera Regional de Jalisco. Comisión Estatal para la Erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis del estado de Jalisco. A.C. http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=60&Itemid=368.

UGRJ. 2014. [ugrj.org.mx](http://www.ugrj.org.mx). Recuperado el 09 Enero 2015. http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=460

Valdivia F. A., Ortiz M. R., de la Cerda E., Martínez A., Jaramillo F. 1995. El calostro bovino hiperinmune en la terapéutica de infecciones humanas gastroentericas. Investigacion y ciencia 14 (5): 19-24.

Van Snick J. 1990. Interleukin-6: An overview. Annu Rev Immunol, 8:253–278.

Vordermeier M., G. Ameni, E. J. Glass. 2012. Cytokine responses of holstein and sahiwal zebu derived monocytes after mycobacterial infection. Trop anim health Prod 44: 651-655.

Walz P.H., Mullaney T. P., Render J. A., Walker r. d., Mosser T., Baker J. C. 1997. Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. J. Vet. Diagn. Invest. 9: 250-254.

Zanini D., C. Garro, W. Morris, F. Delgados, S. Garbaccio. 2011. Vet. Arg. 28276 Tuberculosis bovina en terneros. Instituto de patologia. INTA. Castelar.

Zecconi A., K. L. Smith. June 2000. IDF. International symposium on ruminant mammary gland immunity 16:11-14 Stresa, Italy.

Zhan Y., Yang C., Cheers C. 1993. Cytokine response of T-cell subset from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. Infect. Immun, 61: 2841-2847.