



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE PROLACTINA E
INTERLEUCINA 12 EN CÉLULAS DE DISTINTOS ÓRGANOS DE BOVINOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium bovis***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
LÓPEZ RINCÓN, GONZALO

TUTOR:
PEREIRA SUÁREZ, ANA LAURA

COMITÉ TUTORAL:
ARRIAGA DÍAZ, CAMILA
GUTIÉRREZ PABELLO, JOSÉ ÁNGEL

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias Agropecuarias (**ICAP**) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por la disponibilidad y facilidades brindadas.

A la **FES-C (UNAM)** por las oportunidades brindadas y el apoyo para la realización de este trabajo.

Muy en especial a la Dra. **Ana Laura Pereira Suárez** y al Dr. **Ciro Estrada Chávez** por compartir sus conocimientos, con lo cual fue posible llevar este proyecto a buen fin y sobre todo por su amistad.

A mis padres quienes a lo largo de mi vida siempre me han brindado apoyo de manera incondicional y sobre todo por su amor.

A mis hermanos por su interés, sus buenos consejos y sobre todo por su apoyo para continuar estudiando.

A los integrantes de mi comité tutorial la Dra. **Camila Arriaga Díaz** y al Dr. **José Ángel Gutiérrez Pabello** por su disponibilidad y atenciones proporcionadas.

Al Dr. **Fernando Díaz Otero** por la donación de los tejidos de las vacas infectadas experimentalmente con *M. bovis*.

A **Yadira Roció Rodríguez Míguez** por su interés en mi trabajo y sobre todo por su infinita amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo económico proporcionado.

Está tesis fue financiada parcialmente por los proyectos:

“Papel de la prolactina y sus receptores en la tuberculosis bovina: implicaciones en la respuesta inmune y la producción láctea”

Financiado por:

CONACyT-SAGARPA 0178

“Evaluación de la inmunidad protectora contra la tuberculosis bovina empleando BCG y extracto proteico de filtrado de cultivo”

Financiado por:

SEP-CONACyT D-43244-z

RESUMEN

López Rincón, Gonzalo. Análisis de la expresión del receptor de prolactina e interleucina 12 en células de distintos órganos de bovinos infectados con *Mycobacterium bovis*. (Bajo la dirección de la Dra. **Pereira Suárez, Ana Laura**).

La prolactina (PRL) participa en diversas funciones fisiológicas como proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Además, actúa como un factor estimulante del sistema inmune, provocando fluctuaciones en la respuesta inmunológica bajo condiciones de estrés. La PRL se une a su receptor (PRL-R), el cuál se expresa en una amplia gama de células y tejidos, incluyendo linfocitos y macrófagos. Recientemente, se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias estimulan la expresión del PRL-R en fibroblastos pulmonares y en un modelo *in vivo* de inflamación en ratón, la expresión del PRL-R resultó ser específica de tejido. Durante la tuberculosis, el control de la micobacteria depende de la activación de macrófagos (MØs), por diferentes mecanismos antimicrobianos. Estudios en bovinos muestran que *Mycobacterium bovis* activa macrófagos e induce la producción de TNF- α e IL-12. En modelos murinos, la IL-12 presente en las lesiones, favorece la respuesta inmune celular mediante la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Th1 favorece la producción de IFN- γ . Sin embargo, es poco conocido el papel del PRL-R e IL-12 en la tuberculosis bovina (TBB). El objetivo de este trabajo fue identificar la expresión del PRL-R e IL-12 en muestras de vacas infectadas natural y experimentalmente con *M. bovis*. Los tejidos estudiados fueron timo, bazo, nódulo linfático (traqueobronquial, retrofaringeo y mediastínico), pulmón e hígado, obtenidos de cuatro bovinos infectados de forma experimental con *M. bovis*, cuatro infectados de forma natural y dos libres de TBB. También, se incluyeron muestras de lavados bronquioalveolares (LBA) de los 3 grupos de bovinos. La expresión del PRL-R y de IL-12 se analizó mediante *Western blot* y por RT-PCR. Estos análisis revelan la sobreexpresión del PRL-R e IL-12 en los tejidos y en los LBA de bovinos infectados con *M. bovis*. En las muestras de vacas sanas, sin tuberculosis, no se detectó la expresión de ninguna de las 2 moléculas. Se demostró la expresión de diversas isoformas del PRL-R: en timo y bazo observamos isoformas de 120, 110, 90, 75, 55 y 40 kDa; en el hígado dos de 90 y 100 kDa; en el pulmón tres de 140, 75 y 55 kDa, en nódulos linfáticos (NL), sin lesión, una de 75 kDa; sin embargo, en aquellos NL con lesiones se identificaron dos isoformas de 65 y 40 kDa. Estos resultados permiten suponer que la infección por *M. bovis* promueve la expresión del PRL-R en diferentes tejidos bovinos. Por otra parte, también se evaluó la expresión de IL-12 en ambos modelos de infección con *M. bovis* donde se observó una alta expresión de IL-12p35 e IL-12p40, así como de heterodímeros de 70 kDa y de homodímeros de 80 kDa. En conclusión, se sugiere que la infección por *M. bovis* induce una sobreexpresión de PRL-R e IL-12, que podría modular diferentes aspectos de la respuesta inmune durante la tuberculosis.

Palabras clave: *M. bovis*, receptor de prolactina, citocinas, IL-12 inmunomodulación.

SUMMARY

Prolactin (PLR) is known to regulate many physiological functions such as proliferation, differentiation and cell survival among many others. Recent studies support the role of PRL as an immunomodulatory factor under stress conditions capable of enhancing immune function. The diverse activities of PRL are mediated by its receptor (PRL-R), which is expressed on many cell types including immune cells. Recently, it was shown that pro-inflammatory cytokines induce the expression of PRL-R in pulmonary fibroblasts, as well as, the tissue-specific expression of PRLR in several tissues *in vivo*, in a mouse model of acute inflammation. However, PRL responses during chronic infections are poorly characterized. During tuberculosis infection, the control of mycobacteria depends largely upon macrophages (MØs) activation, which display an array of antimicrobial mechanisms. *In vitro* studies in cattle have shown that *M. bovis* activates MØs to produce TNF- α and IL-12. In murine models, the IL-12 present in the lesions, favors the cellular immune responses by means of the T CD4+ Th1 lymphocytes differentiation and the production of IFN- γ . However, little is known about the role of PRL-R and IL-12 in bovine tuberculosis (TB). The objective of this work was to identify the expression of PRL-R and IL-12 in *M. bovis* experimentally and naturally infected cattle. The bovine tissues studied were thymus, spleen, mediastinal, tracheobronchial and retropharyngeal lymph nodes (LN), lung and liver obtained from: 4 *M. bovis* naturally and 4 experimentally infected and 2 healthy cattle as controls. Also, bronchoalveolar lavages of these animals were included. The PRL-R and IL-12 expression was analyzed by *Western blot* and RT-PCR. These analyses reveal high expression of PRL-R and IL-12 in tissues from *M. bovis* infected cattle. In healthy cattle the expression of the 2 molecules was not detected. The presence of different isoforms of PRL-R protein was revealed: in thymus and spleen were observed isoforms of 120, 110, 90, 75, 55 y 40 kDa; in liver two of 90 and 100 kDa; in lung three of 140, 75 and 55 kDa; in LN without lesion one of 75 kDa; but in those with lesions two isoforms of 65 and 40 kDa were observed. These results suggest that *M. bovis* infection promotes the expression of PRLR in different bovine tissues. Moreover, the analysis of IL-12 revealed a high expression of IL12p35, IL-12p40, IL-12(p40)₂ homodimers of 80 kDa and heterodimers of 70 kDa. In conclusion, our observations suggest that during the *M. bovis* infection an over-expression of PRL-R and IL-12 is induced, suggesting its role to modulate different aspects of the immune response during tuberculosis.

Key words: *M. bovis*, prolactin receptor, cytokines, IL- 12, immunomodulation.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS | I |
| RESUMEN | II |
| SUMMARY | III |
| ÍNDICE | IV |
| LISTA DE TABLAS Y FIGURAS | VII |
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Definición de la enfermedad | 1 |
| 1.2 Importancia de la tuberculosis en México | 1 |
| 1.3 Etiología | 3 |
| 1.4 Vías de infección | 4 |
| 1.5 Patogenia de tuberculosis | 5 |
| 1.6 Respuesta inmune a la tuberculosis bovina | 7 |
| 1.6.1 Participación de IL-12 y su receptor en la modulación de la respuesta inmune | 10 |
| 1.7 Generalidades de la prolactina | 12 |
| 1.7.1 Composición química | 14 |
| 1.7.2 Regulación de prolactina | 17 |
| 1.7.3 La prolactina en la glándula mamaria | 18 |
| 1.7.4 La prolactina y el sistema inmunológico | 18 |
| 1.7.5 Prolactina y su receptor en la tuberculosis bovina | 21 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 3. HIPÓTESIS | 24 |
| 4. OBJETIVOS | 24 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 5.1 Material biológico | 25 |
| 5.1.1 Muestras de vacas infectadas con <i>M. bovis</i> y controles sanos | 25 |
| 5.1.2 Obtención de los lavados bronquioalveolares | 27 |
| 5.2 Extracción de RNA | 27 |
| 5.3 Electroforesis en geles de agarosa con formaldehído | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.4 Síntesis de ADN complementario | 29 |
| 5.5 Análisis de la expresión del PRL-R por RT-PCR | 29 |
| 5.6 Análisis de la expresión del PRL-R e IL-12 por <i>Western blot</i> | 31 |
| 6. RESULTADOS | |
| 6.1 Pruebas inmunológicas y patológicas | 32 |
| 6.2 Observación de la integridad de las proteínas por electroforesis en geles de acrilamida | 34 |
| 6.3 Análisis de la expresión del PRL-R en bovinos sanos e infectados con <i>M. bovis</i> por <i>Western blot</i> | 35 |
| 6.3.1 Expresión del PRL-R en timo y bazo de bovinos sanos e infectados con <i>M. bovis</i> | 36 |
| 6.3.2 Expresión del PRL-R en nódulos linfáticos de bovinos sanos e infectados con <i>M. bovis</i> . | 37 |
| 6.3.3 Expresión del PRL-R en pulmón e hígado de animales sanos e infectados con <i>M. bovis</i> | 40 |
| 6.3.4 Expresión del PRL-R en lavados bronquioalveolares de bovinos sanos e infectados con <i>M. bovis</i> | 43 |
| 6.4 Expresión de IL-12 en tejidos y LAB de bovinos infectados con <i>M. bovis</i> | 44 |
| 6.5. RT-PCR para el PRL-R utilizando RNA total de tejidos y LBA de bovinos infectados con <i>M. bovis</i> y sanos | 46 |
| 6.5.1 Gen del PRL-R bovino empleado en el análisis de RT-PCR | 49 |
| 7. DISCUSIÓN | 52 |
| 8. CONCLUSIONES | 59 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 60 |

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Tablas: | |
| Tabla 1. Respuesta inmune a <i>Mycobacterium bovis</i> | 8 |
| Tabla 2. Acciones biológicas de la prolactina | 20 |
| Tabla 3. Diagnóstico Immunopatológico de bovinos infectados experimental y naturalmente con <i>M. bovis</i> | 33 |
| Tabla 4. Resultados macroscópicos de bovinos infectados experimental y naturalmente con <i>M. bovis</i> | 34 |
| Tabla 5. Isoformas del PRL-R en diferentes tejidos y LBA de bovinos infectados con <i>M. bovis</i> | 44 |
| Figuras: | |
| Figura 1. La patogenia de la tuberculosis | 6 |
| Figura 2. Efectos inmunológicos por la infección de <i>M. bovis</i> en bovinos | 9 |
| Figura 3. Modelo de diferenciación celular hacia una respuesta Th1 | 12 |
| Figura 4. Diferentes isoformas del PRL-R | 16 |
| Figura 5. Integridad de proteínas totales de tejidos y de LBA | 35 |
| Figura 6. <i>Western blot</i> con anti-PRL-R en tejido de glándula mamaria de bovinos libres de TBB | 36 |
| Figura 7. Expresión del PRL-R en células de timo y bazo de bovinos infectados experimentalmente con <i>M. bovis</i> por <i>Western blot</i> | 37 |

| | |
|---|----|
| Figura 8. Expresión del PRL-R en muestras de nódulos linfáticos de bovinos infectados experimentalmente con <i>M. bovis</i> | 38 |
| Figura 9 Expresión del PRL-R en nódulos linfáticos de bovinos infectados de manera natural con <i>M. bovis</i> por <i>Western blot</i> | 39 |
| Figura 10. Identificación de BAAR por Zhiel-Neelsen | 39 |
| Figura 11. Expresión del PRL-R en células de pulmón e hígado de bovinos infectados experimentalmente con <i>M. bovis</i> por <i>Western blot</i> | 41 |
| Figura 12. Expresión del PRL-R en células de pulmón e hígado de bovinos infectados naturalmente con <i>M. bovis</i> por <i>Western blot</i> | 42 |
| Figura 13. Expresión del PRL-R en células de LBA de bovinos infectados natural y experimentalmente con <i>M. bovis</i> | 43 |
| Figura 14. Expresión de IL-12 en tejidos y lavados bronquioalveolares de bovinos con TBB y sanos | 45 |
| Figura 15. Integridad del RNA en tejidos y LBA de bovinos infectados con <i>M. bovis</i> | 47 |
| Figura 16. Expresión del PRL-R en células de tejidos de bovinos infectados con <i>M. bovis</i> por RT-PCR | 48 |
| Figura 17. Expresión del PRL-R en células de LBA de bovinos infectados con <i>M. bovis</i> y libres de TB por RT-PCR | 49 |
| Figura 18. Gen de la isoforma larga del PRL-R de bovino | 51 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de la enfermedad

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica y progresiva, de distribución mundial, causada por bacterias del complejo *Mycobacterium*, que afecta a un amplio espectro de hospederos incluyendo al hombre (Guevara y col., 2003). A la tuberculosis (TB) se le conoce como una de las enfermedades más antiguas que han afectado a la humanidad, es común en países en vías de desarrollo, teniendo un incremento importante en su incidencia debido a la pandemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Dunlap y col., 2000).

1.2 Importancia de la tuberculosis en México

La tuberculosis ha sido y es un problema de salud pública en México. Los datos de 1999 reportan, según el estado, entre 4.2 y 37 casos por cada 100,000 habitantes (García-García y col., 1999). En nuestro país, la tuberculosis es la única enfermedad infecciosa ocasionada por un sólo agente etiológico que se encuentra entre las 20 principales causas de muerte, sólo superada por las enfermedades infecciosas intestinales y la neumonía e influenza (Tapia y col., 1995). Cada año se notificaban en promedio 10,000 casos con un subregistro del 45%, estimándose la cifra real de casos activos en 30,000 de los cuales el 80% son de localización pulmonar (García-García y col., 1999).

En América latina la TB humana y bovina constituyen un problema difícil de erradicar. Cerca de 350,000 casos de TB activa y más de 50,000 muertes en humanos fueron los estimados para la región durante el 2004 (De Kantor y Ritacco, 2006). Actualmente el bacilo de la tuberculosis infecta cerca de un tercio de los seres humanos en el mundo, con uno de los índices más altos de mortalidad estimado en una enfermedad infecciosa simple, cerca de 3 millones de personas por año (Kaufmann y col., 2005). Los casos de tuberculosis activa

aumentaron a casi 8 millones al año, debido a la pandemia de HIV/SIDA (Dye y col., 1999). Sin embargo, sólo el 10 % de los infectados desarrollan la infección debido a diversos factores de resistencia (Pan y col., 2005).

La TBB causada por *Mycobacterium bovis* es una zoonosis asociada al consumo de leche o derivados contaminados con el bacilo y al trabajo en granjas o rastros (Grange y col., 1994). Recientemente, se han identificado hatos infectados en el sur de Texas, Michigan y California, considerándose a *M. bovis* como una causa importante de tuberculosis en niños de estas regiones (Dankner y col., 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la tuberculosis humana causada por *M. bovis* una zoonosis y en América latina se calculan 7,000 casos anuales (Ritacco y col., 1992).

En México entre los años de 1991 y 1993 se presentaron más de 29,000 casos anuales confirmados de tuberculosis en humanos y se considero que un 8% fueron causados por *M. bovis*, de 1995 a 2005 la tasa anual de casos fue de 18,000. El problema de TBB en México es grave, la prevalencia en la parte norte de México, se ha estimado en 2.1% para el ganado lechero y en un 0.1% para el ganado de carne. En la zona centro y sur de México, los valores de prevalencia de TBB son mayores. En estas regiones se han detectado establos lecheros con prevalencias mayores al 25% de TBB (Milián y Gallegos, 2001). Esto causa cuantiosas pérdidas por bajas de la producción hasta en un 20%, desecho prematuro o muerte de los animales, así como el riesgo latente de infección principalmente para trabajadores en establos y rastros, por lo cual es una de las enfermedades más importantes del ganado productor de leche, ya que se traduce en barreras no arancelarias para la exportación (Gurria, 1994).

El diagnóstico mediante la tuberculina y el sacrificio de animales reactivos permiten el control, con un costo muy elevado para la economía de los productores mexicanos y la erradicación ha sido imposible con estas políticas. Por

lo tanto, las pérdidas económicas debidas a la tuberculosis son sumamente elevadas y la zoonosis presenta un foco de infección para humanos que no puede ser despreciado (Milián y Gallegos, 2001). Existe una subnotificación por parte de los laboratorios de diagnóstico, esto se ve reflejado en la poca cantidad de muestras que se reportan y en el reducido número de aislamientos del bacilo (Betancourt y col., 2001).

1.3 Etiología

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. canetti* causantes de TB en humanos y *M. microti* en pequeños roedores. Sin embargo, *M. bovis* tiene uno de los más amplios rangos de hospedadores, se ha identificado en el hombre, primates, ungulados y carnívoros, tanto domésticos como silvestres (Pfyffer y col., 1998).

Las micobacterias son definidas como bacilos delgados, aeróbicos, inmóviles, que no esporulan, contienen arabinosa, galactosa y ácidos micólicos en la pared celular. (Maher y col., 2002). Se tiñe con facilidad con la técnica de Zhiel Neelsen, su decoloración no es fácil (ácido-alcohol resistencia). Esta última es su principal característica y se debe a la composición de su pared celular, rica en lípidos de alto peso molecular (hasta un 60% del peso de la bacteria) (Kremer y Besra, 2005). Los lípidos de la pared son considerados como factores de virulencia sumamente importantes, pero ninguno esencial, pues la patogenia del bacilo parece ser multifactorial. Los microorganismos del género son de crecimiento lento pudiendo transcurrir varias semanas antes de que sus colonias sean visibles. Es importante confirmar la especie de micobacteria aislada, *M. tuberculosis* tiene capacidad de producir niacina y carece de la actividad de la catalasa a 68°C, *M. bovis* es fisiológicamente muy similar, pero no produce niacina. La pared de las micobacterias está compuesta principalmente por dos polímeros el arabinogalactano micolato y el peptidoglicano (Cole y col., 1998).

Los ácidos micólicos forman el llamado factor cordón o acordonamiento, identificado en la mayoría de las micobacterias, es el 6,6- dimicolato de trehalosa y funciona como tóxico, influenciando la virulencia de las cepas. Debido a este factor algunas cepas crecen en forma de cuerdas o trenzas (Balandrano y col., 1996). Los bacilos son moderadamente resistentes al calor, la desecación y muchos desinfectantes, sin embargo, son fácilmente destruidos por la luz solar directa.

1.4 Vías de infección

Existen numerosas vías de diseminación de la TB en el ganado, influenciadas por factores como la edad, ambiente y prácticas de manejo (Pollock y Nelly, 2002). Los hallazgos *post mortem* indican que la vía de infección usualmente es respiratoria. Del 80 al 90% de los casos la transmisión ocurre por vía aerógena; con la tos o respiración de un animal infectado se expelen gran cantidad de microgotitas que contienen al bacilo. Esto se ve favorecido por contacto directo diariamente de los bovinos en el pastoreo, comederos, corrales y salas de ordeño. (Morán y Lozano, 2001). De esta forma, la micobacteria logra llegar hasta los alvéolos pulmonares, donde son fagocitadas por los macrófagos residentes pudiendo ser eliminadas o sobrevivir gracias a factores de virulencia (Figura 1). Al sobrevivir se diseminan por vía linfática o sanguínea a nódulos linfáticos regionales. Es por ello que de 70 a 90% de las lesiones tuberculosas son localizadas en nódulos linfáticos de la región torácica y cabeza (Neill y col., 2001).

Otra vía de ingreso es la digestiva por el consumo de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, materia fecal y orina que contienen al agente causal. La vía digestiva es muy importante en terneros que se alimentan con leche cruda proveniente de las vacas enfermas, debido a que las vacas infectadas eliminan el microorganismo en la leche. Otras vías no usuales pero probables son: la vía cutánea, congénita, genital y la transmisión iatrogénica en la glándula mamaria por el uso de infusiones contaminadas y posiblemente, por la introducción mecánica por instrumentos quirúrgicos (Pollock y Nelly, 2002).

1.5 Patogenia de tuberculosis

El género *Mycobacterium* utiliza diferentes vías para ingresar al huésped, sin embargo, la principal ruta es la inhalación de aerosoles, en los que se forman gotas menores a 5 μm que contienen en su interior de 1 a 3 bacilos, de esta forma logran llegar hasta los alvéolos pulmonares, en donde el bacilo tuberculoso crece y se replica lentamente dentro del macrófago (Dunlap y col., 2000), provocando quimiotaxis de monocitos hacia esta zona y el inicio de la formación del granuloma o tubérculo (Figura 1). Este granuloma se caracteriza por un centro necrótico y posiblemente bacterias libres rodeadas de macrófagos infectados, células epiteliales, células gigantes, que a su vez puede estar rodeado por tejido conectivo fibroso. El granuloma se forma para tratar de eliminar la infección y permite que el proceso inflamatorio y los mecanismos inmunológicos destruyan los bacilos.

Sin embargo, los bacilos se multiplican y aproximadamente 14 días después se desarrolla una hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos T, responsables de la producción de linfocinas, las cuales atraen, inmovilizan y activan otras células mononucleares al sitio de infección, además de contribuir a la muerte celular y destrucción tisular (Figura 1). Las lesiones son observadas principalmente en nódulos linfáticos y pulmón pudiendo ser unilateral o bilateral, predominantemente en el lóbulo caudal y en el tercio distal de los lóbulos. También se han reportado lesiones en tonsilas y nódulo linfático mesentérico, cuando la tuberculosis es generalizada se caracteriza por lesiones en órganos tales como el hígado, riñones, meninges y cavidades serosas (Nelly y col., 2001).

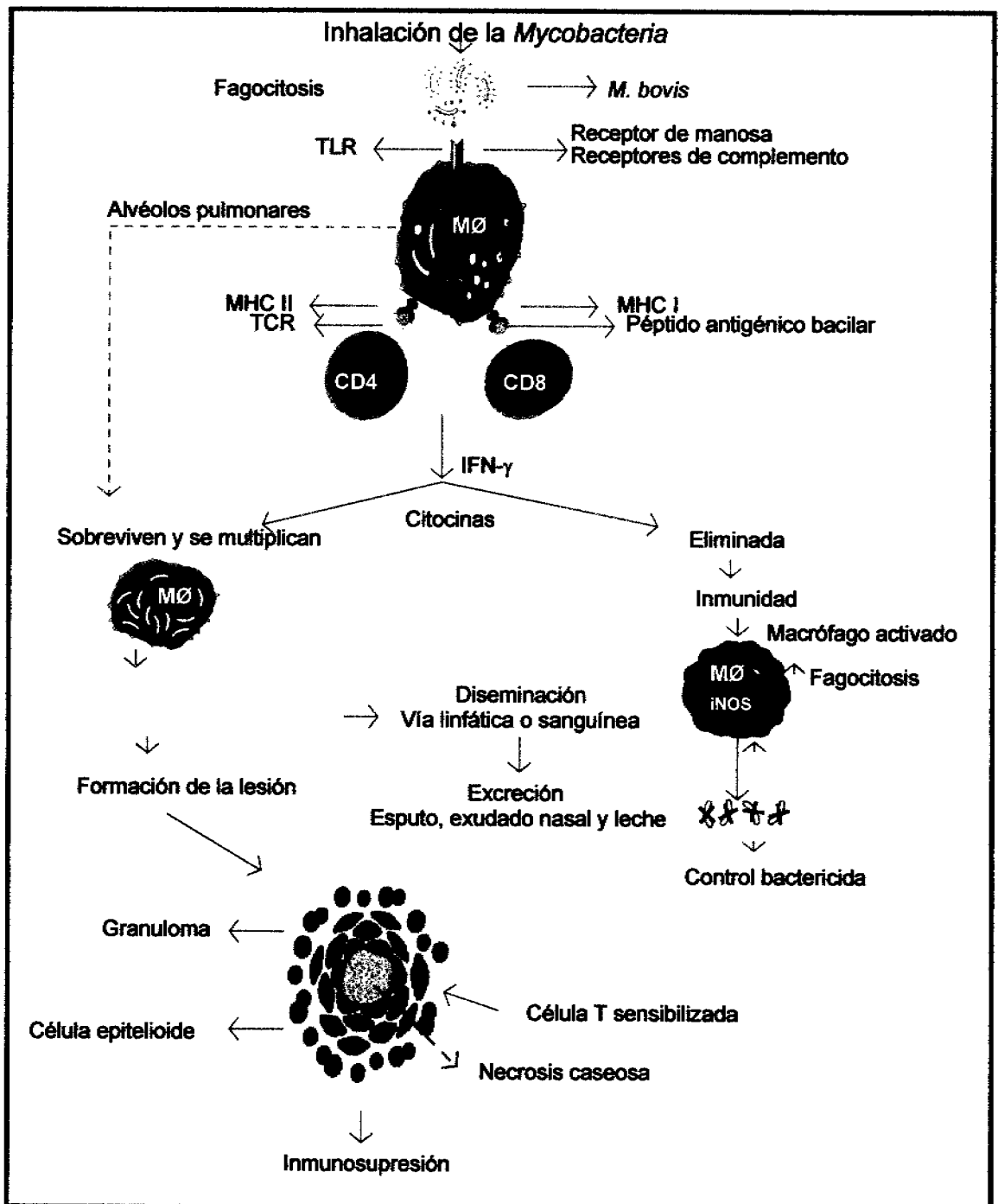


Figura 1. La patogenia de la tuberculosis. Las células presentadoras de antígenos estimulan los receptores de linfocitos T CD4+ y T CD8+ que liberan las citocinas responsables de la respuesta inmune.

1.6 Respuesta inmune a la tuberculosis bovina

La respuesta mediada por células predomina durante el curso de la tuberculosis bovina, debido a que *M. bovis* es un patógeno intracelular que infecta macrófagos (Pollock y col., 2001). Después de la infección, los macrófagos actúan como células presentadoras de antígenos. La inmunidad adquirida en la TBB involucra principalmente a los linfocitos T CD4+ con receptores capaces de secretar IFN- γ . Éste se requiere durante la TBB para inducir la activación de macrófagos infectados con *M. bovis* y esta actividad se considera primordial en la defensa contra este patógeno (Tabla 1). En general, la resistencia a patógenos intracelulares correlaciona con una respuesta inmune Th1, regulada por IL-1 e IL-12 producidas por los macrófagos activados, además por la secreción IL-2 e IFN- γ por las células T CD4+ (Raja, 2004).

Los macrófagos infectados liberan citocinas que promueven la migración de macrófagos y linfocitos T γ/δ , siendo éstos linfocitos los primeros en ser reclutados hacia el sitio de la lesión, colaborando en la secreción de IFN- γ e IL-2 (Pollock y col., 2005). En el bovino, estos linfocitos además de producir citocinas, tienen la capacidad de matar a macrófagos infectados mediante un mecanismo de citotoxicidad dependiente de gránulos, similar al de los linfocitos T CD8+ (North y Yu-Jin, 2004). Las citocinas también pueden dirigir a los linfocitos T CD4+, hacia los sitios donde se está iniciando una respuesta de hipersensibilidad retardada que culmina con la formación del granuloma, esto se logra mediante la expresión selectiva de receptores (IL-18R, IL-12R, IL1 β R y TNF- α R) en los linfocitos Th1. Por otra parte, la acción efectora de los linfocitos Th1 depende del reconocimiento de péptidos antigénicos sobre la superficie celular asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) con los receptores de células T (TCR) y a la secreción de citocinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ . Los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas

MHC II y presentados a linfocitos T CD4+ o bien acoplados a moléculas MHC I y presentados a linfocitos T CD8+ (Flynn y Chan, 2001).

El acumulo de células inmunes comúnmente en nódulos linfáticos, conlleva a la formación del granuloma, que constituye un frente de defensa del huésped que localiza, detiene y destruye bacilos mediante anaerobiosis (Lalvani y col., 2001). La IL-12 y la IL-18 producidas por los macrófagos activados, también inducen la producción de IFN- γ en las células *Natural Killer* (NK) lo que favorece la actividad microbicida de los macrófagos para la generación de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno, regulando la respuesta inmune innata y adquirida como se resume en la Figura 2 (Endsley y col., 2006).

Tabla 1. Respuesta inmune a *Mycobacterium bovis*

| Células | Mecanismos | Efectos | Resultado |
|-----------------------------------|--|--|--|
| Macrófago | Receptores TLR2 y TLR4 Fusión fagolisosomal Mecanismos basados en radicales libres | Activación de células inmunes Degradación de macromoléculas Producción de Intermediarios de oxígeno | Acción bactericida Inducción de IL-12 Inducción iNOS |
| Macrófagos y células T | Producción de IL-12 Expresión del PRL-R? | Inducción de respuesta TH1 (con producción de IFN- γ) | Disminución de carga bacteriana |
| Macrófagos alveolares y células T | Producción IFN- γ Producción TNF- α Expresión PRL-R? | Activación de macrófagos Respuesta protectora a <i>M. bovis</i> Formación de granulomas | |
| Células T CD4+ | Respuesta inmune protectora a <i>M. bovis</i> | Producción de IL-2 e IFN- γ Expresión de iNOS | Activación macrófagos Eliminación de bacilos intracelulares |
| Células T CD8+ | Lisis celular | Citotoxicidad mediada por enzimas (perforina y granulosina) | Muerte bacteriana |
| <i>M. bovis</i> | Evita la unión fagolisosomal Evita acción de intermediarios de Oxígeno | Impide degradación y procesamiento de antígenos Altera expresión de moléculas MCH-II Limita activación de macrófagos Producción de citocinas disminuida | Impide acción bactericida Altera presentación de antígenos a células T CD4 + Evita el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal |

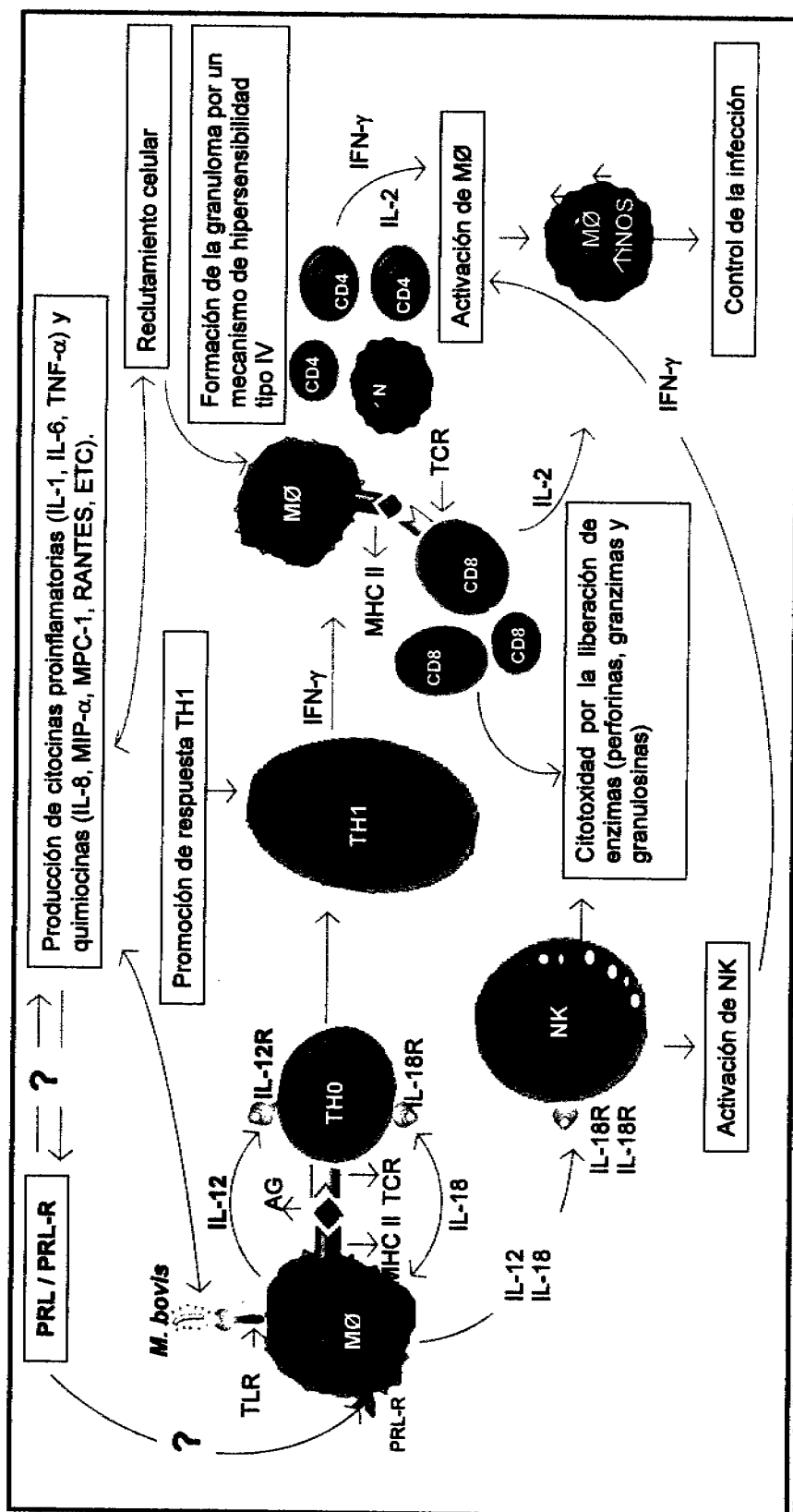


Figura 2. Efectos inmunológicos por la infección de *M. bovis* en bovinos. MØ: Macrófago; N: neutrófilo; MHC: complejo principal de histocompatibilidad; TCR: receptor de linfocito T; TLR: receptores tipo toll; PRL-R: receptor de prolactina, CD4+: linfocitos T CD4+; CD8+ linfocitos T CD8+; IL: Interleucina; IL-R: receptor de interleucina; IFN-γ: interferón gamma; TH: linfocito T cooperador; NO: óxido nítrico; iNOS: sintasa de óxido nítrico; NK: células natural killer.

1.6.1 Participación de IL-12 y su receptor en la modulación de la respuesta inmune

La IL-12 es una citocina heterodimérica producida principalmente por células presentadoras de antígenos (Figura 3). Está compuesta por dos subunidades proteicas, una de 35 kDa (p35) y una de 40 kDa (p40) (Trinchieri, 2007). En el bovino, los genes residen en *loci* independientes, p35 se encuentra en el cromosoma 1 ubicado en el locus p12-3q13.2 y p40 en el cromosoma 7 en q31-33. La subunidad (p35) presenta secuencias homólogas con IL-6, G-CSF, mientras que la (p40) no presenta regiones homólogas con ninguna citocina (Trinchieri, 2007).

El receptor de IL-12 (IL-12R) es una proteína heterodimérica expresada principalmente en células T y NK, compuesta por dos subunidades glicoproteicas transmembranales, la IL-12R β 1 de 100 kDa y la IL-12R β 2 de 130 kDa (Figura 3). Estudios recientes realizados en humanos y en ratones, sugieren que la subunidad IL-12R β 2 está asociada a una respuesta TH1, que correlaciona con la producción de IL-12 en esas células y la IL-12R β 1 está asociada con una respuesta Th2. La IL-12 tiene la habilidad de regular la respuesta TH1 promoviendo la diferenciación de células Th0 o nativas (Figura 2). Además actúa como coestimulador para la secreción máxima de IFN- γ diferenciando las células a TH1 en respuesta a antígenos específicos, activando células T y NK (Gately y col., 1998) (Figura 3).

La importancia de IL-12 en el control de la infección por *M. tuberculosis* se puede observar en ratones deficientes del gene *IL-12p40*, ya que muestran una carga bacteriana importante y una disminución del tiempo de sobrevivencia en relación con los ratones del grupo control, esto se atribuye a una reducción sustancial en la producción de IFN- γ en las células T (Orme y col., 1993; Cooper y col., 1995).

Los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* parecen tener disminuida su capacidad para presentar antígenos a las células T CD4+, lo cual podría contribuir a la incapacidad del huésped para eliminar una infección persistente (Stenger y col., 1998). Otros estudios, demuestran que en ratones infectados con *M. bovis* BCG la actividad biológica de IL-12 depende de la subunidad (p40), ya que ratones deficientes del gen *IL-12p35* producen antígenos específicos para células T, controlando el número de bacterias en diferentes órganos, tales como bazo, hígado y pulmón, contrario a lo que sucede en los ratones que tenían la deficiencia del gen *IL12 p40*. Esto fue corroborado por la introducción de IL-12p40 por vía intraperitoneal, y los ratones mutantes desarrollaron una respuesta similar al grupo control disminuyendo el número de bacterias y restaurando la producción de antígenos específicos. Esto demuestra que la subunidad (p40) es la responsable de inducir la respuesta inmune en una infección experimental causada por *M. bovis* BCG. En ensayos *in vitro* se estimularon células de nódulos linfáticos con *M. bovis* BCG con el propósito de medir la producción de IFN- γ , lo cual confirmó que los mutantes de (p40) tenían una mínima producción de IFN- γ asociado a la producción de IL-18 (Cooper y col., 1995).

En otro estudio, se infectaron ratones deficientes del gen para *IFN- γ R* con *M. tuberculosis* (H37Rv) y estos ratones mostraron menor producción de IL-12 comparado con el grupo control, demostrando el sinergismo del IFN- γ e IL-12 (Ladel y col., 1997). Estudios más recientes, demuestran que ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv carentes del gen *IL-12p40* tienden a morir a las 8 semanas *post* infección, contrario a los carentes del gen para *IL-12p35* que mueren a las 25 semanas igual que el grupo control (Christoph y col., 2001). Otros estudios muestran que ratones carentes del gen para *IL-12p40* después de la infección con *M. tuberculosis* presentan deficiencias en la migración de células dendríticas en el pulmón, con lo cual se afecta la migración y diferenciación celular hacia el sitio de la infección; sin embargo, al ser tratados con IL-12p40 se restablece la migración celular y la producción de antígenos específicos, y frente al

tratamiento con el homodímero IL-12p(40)₂ se propicia la migración celular, pero no la producción de antígenos específicos (Shabaana y col., 2006). Con estos antecedentes, se considera a la subunidad IL-12p40 como regulador fisiológico de la actividad de IL-12.

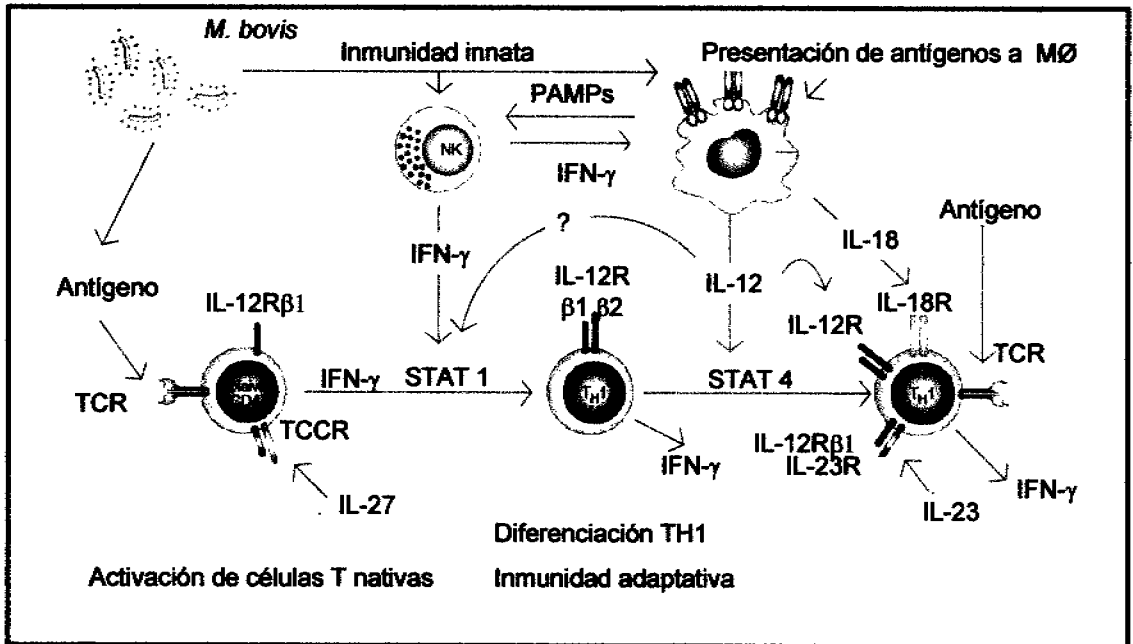


Figura 3. Modelo de diferenciación celular hacia una respuesta Th1. La producción y síntesis de IL-12 se da tras la fagocitosis de patógeno por células presentadoras de antígenos. Tanto *in vivo* como *in vitro* IL-12 es requerida para la diferenciación de T CD4⁺ hacia una respuesta TH1 y la activación de células NK coadyuvando a la producción de IFN- γ . (Modificado de Trinchieri, 2003. Nature Reviews Immunology. 3: 133-146).

1.7 Generalidades de la prolactina

La prolactina (PRL) originalmente se identificó como una hormona secretada por la glándula pituitaria (Bole-Feysot y col., 1998), aislada por primera vez en 1932 a partir de hipófisis de carnero (Riddle y col., 1983). En 1971 fue obtenida de glándulas hipofisarias del humano (Hwang y col., 1972) y hasta 1974 se determinó que era sintetizada y secretada por muchos tejidos extrapituitarios (Nicoll, 1974). La prolactina es una hormona proteínica, secretada principalmente en los lactotrofos hipofisarios (células acidófilas de la hipófisis anterior). El establecimiento de la prolactina como una entidad estructural y funcional diferente a la hormona del crecimiento propició la descripción de nuevas entidades clínicas

secundarias a su secreción inadecuada, así como contribuir, entre otras, al desarrollo de nuevas y revolucionarias disciplinas de la medicina contemporánea (Velásquez, 1998).

Actualmente, se considera que PRL es la hormona más versátil en términos de sus actividades biológicas e inmunológicas y que el número de funciones en las que participa es superior al resto de las hormonas hipofisarias en su conjunto (Cabrera y col., 2000). Se han reportado más de 300 acciones diferentes de la PRL que incluyen no sólo su participación en el área reproductiva o en la lactancia, si no también en la homeostasis del organismo en vertebrados debido a que no posee un órgano blanco específico (Freeman y col., 2000), siendo considerada como una citocina por actuar a nivel endócrino, autócrino y parácrino (Li-Yuan Yulee, 2002).

Las numerosas funciones y efectos de la prolactina en diferentes sistemas vivos, incluyendo al humano, pueden ser clasificadas en las siguientes seis categorías:

1. Reproducción
2. Crecimiento y desarrollo
3. Balance de líquidos y electrolitos
4. Inmuno-regulación
5. Conducta
6. Endocrinología y metabolismo

Durante muchos años se consideró que la PRL era producida exclusivamente por las células lactotróficas que representan cerca del 25 % del total de las células que conforman a la adenohipófisis (Larrea y col., 1997). También es sintetizada y secretada ampliamente en diferentes sitios del organismo: el hipotálamo, el miometrio uterino, la placenta, la glándula mamaria, la glándula adrenal, la próstata, la glándula uretral, los islotes pancreáticos, las

células del sistema inmunológico (Sinha, 1995), corazón, hígado y bazo (Bouchard y col., 1999).

En las últimas décadas se ha demostrado la producción ectópica de PRL, revelando la expresión del transcrito del gen o RNAm de la prolactina en células linfocitarias. En estudios más recientes se ha confirmado que PRL es sintetizada y secretada en diversas células del sistema inmune (linfocitos T y B, así como monocitos de sangre periférica), demostrando la presencia de RNAm de la PRL. Por otra parte los mecanismos que regulan la expresión del gen para *PRL* de origen linfocitario aun no han sido determinados. (Pellegrini y col., 1992).

1.7.1 Composición química

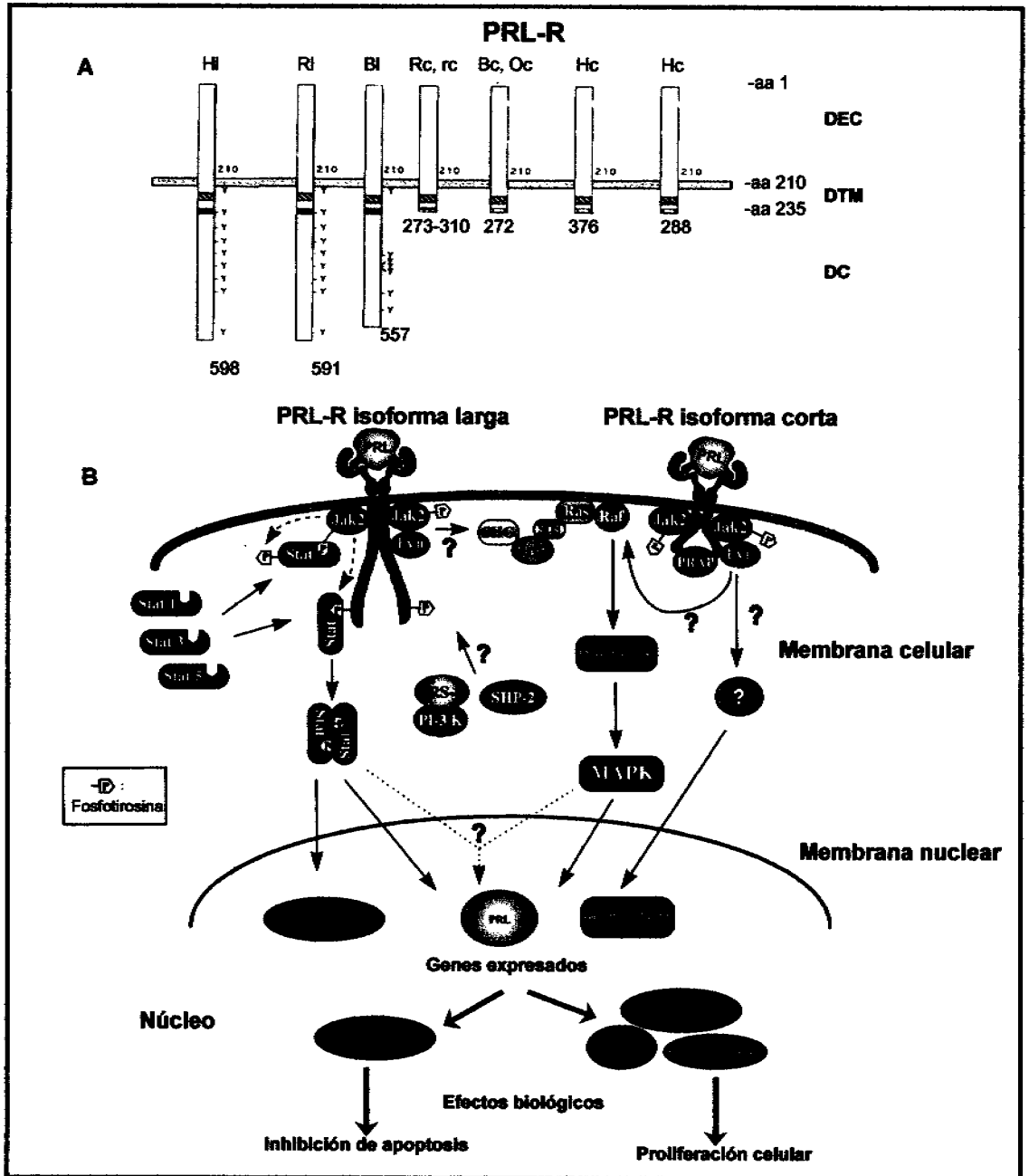
La PRL es un péptido con un peso molecular aproximado de 23 kDa, la secuencia proteínica o del DNA complementario (DNAc) han permitido conocer y establecer la estructura primaria de la PRL de más de 25 especies. A este respecto, en la mayoría de las especies estudiadas, la estructura de la hormona está compuesta de 197-199 residuos de aminoácidos, con 3 puentes disulfuros intracatenarios localizados entre las posiciones 4-11, 58-174 y 191-199 (Sinha, 1995). Es una proteína globular constituida de una alfa hélice en un 25 %, de 33 % de beta plegada y de un 8% de espiral al azar (Chikaza y Panayi, 1991).

Entre las especies se han conservado alrededor de 32 residuos de aminoácidos, los que aparecen formando celdas que están localizadas en 4 regiones distintas de la molécula y situadas en las posiciones 18-32, 58-72, 83-98 y 160-199. Se considera que estas celdas forman dominios en la molécula de la PRL para la unión específica a receptores y que son importantes para la regulación de los múltiples efectos biológicos descritos para esta hormona (Cabrera y col., 2000).

Los efectos de la prolactina en los órganos blanco dependen de su integración con receptores específicos localizados en la superficie de la célula. El

receptor de la prolactina (PRL-R) es una proteína transmembranal que pertenece a la familia de los receptores de citocinas hematopoyéticas, donde encontramos los receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, GM-CSF, GCSF, EPO y hormona del crecimiento. Está compuesto por tres dominios, que participan en la conformación de estos receptores y que han sido denominados de acuerdo a su localización como la región extracelular, transmembranal e intracelular o citoplasmática (Kelly y col., 1991). El dominio extracelular cuenta con 210 aa y está involucrado en la activación del receptor por la dimerización secuencial inducida por su ligando, el transmembranal de 24 aa participa en el proceso de activación y el intracelular tiene una importante participación en el mecanismo de iniciación de las señales de transducción asociadas con el PRL-R (Marc y col., 2000).

La unión de la PRL a su receptor induce la señalización mediante la fosforilación de tirosinas en distintas proteínas intracelulares incluyendo al receptor. Las proteínas de la familia de la señal transductora y activadora de la transcripción (Stat), es la primera señal para el receptor de citocinas. La familia Stat está constituida por 8 miembros, pero sólo Stat1, Stat2, Stat3, y especialmente Stat5a y Stat5b, han sido identificadas como moléculas transductoras del PRL-R Figura 4 (Leaños-Miranda y col., 2001).



1.7.2 Regulación de la prolactina

La regulación neuroendócrina de la síntesis y secreción de la prolactina hipofisaria está fundamentalmente bajo la inhibición tónica hipotalámica, que es ejercida, principalmente por el sistema dopaminérgico tuberoinfundibular, especialmente por la dopamina. A través del sistema portal hipótalamo-hipofisario, la dopamina es transportada para ejercer sus efectos sobre los lactotropos hipofisarios (Demaria y col., 2000). La PRL por sí misma modifica la actividad dopaminérgica del hipotálamo por un mecanismo de retroalimentación. Por otra parte, la PRL regula tanto su síntesis como su liberación por un mecanismo de autorregulación (Devost y Bouting, 1999).

En la adenohipófisis, la dopamina se une a receptores de membrana acoplados a proteínas intracelulares. De esta forma inhibe tanto la síntesis de la prolactina, al reprimir la transcripción de su gen, así como la liberación de ésta, disminuyendo la concentración de AMP cíclico y calcio intracelular. El mecanismo exacto por el cual la dopamina inhibe la síntesis de PRL aún no se ha determinado, sin embargo, en cultivos hipofisarios la adición de la dopamina en los primeros segundos incrementa el cambio de potasio e inactiva los canales de calcio, resultando en una hiperpolarización de la membrana y disminuyendo el calcio libre intracelular. En los siguientes minutos suprime la actividad de adenilato ciclasa, el metabolismo del inositol fosfato, la liberación del ácido araquidónico, y la expresión del gen para *PRL*. Después de días, la dopamina suprime la proliferación celular (Nira, 1985).

Existen otros factores de origen hipotalámico que regulan de manera inhibitoria la síntesis y secreción de prolactina hipofisaria, como es el ácido γ aminobutírico, la hormona liberadora de gonadotropinas y las endotelinas (1 y 2). A su vez el hipotálamo también contiene otros factores que han sido implicados en la estimulación de la secreción de la PRL tales como hormona liberadora de tirotrópina, la colecistoquinina, la oxitocina, el péptido vasoactivo intestinal y la

neurotensina. Dentro de los factores periféricos que modifican la secreción de la PRL están los productos de síntesis de las células esteroideogénicas y glándulas suprarrenales (Larrea y col., 1993). Otros factores externos importantes que alteran la liberación de la PRL son la luz, la audición, el olfato y el estrés (Freeman y col., 2000).

1.7.3 La prolactina en la glándula mamaria

Los efectos de la PRL sobre la glándula mamaria específicamente están relacionados con la estimulación en la producción de leche, ya que interviene en diversos procesos del metabolismo glandular (Velásquez, 1998), siendo responsable de la síntesis de todos los componentes de la leche como son, las proteínas, azúcares y lípidos (Neville y col., 2002) (Tabla 2).

1.7.4 La prolactina y el sistema inmunológico

La relación entre la prolactina y el sistema inmune se evidenció desde 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia (Nagy, 1986). La función inmunomoduladora de la PRL fue descubierta en aves y ratones mediante la manipulación *in vivo* de las concentraciones plasmáticas de esta hormona (Berczi y col., 1981). En años recientes se ha demostrado que la PRL ejerce diversas funciones fisiológicas dentro de las cuales mantiene la regulación del sistema inmunológico. Existen numerosos estudios sobre la relación entre la PRL y el sistema inmunológico que demuestran lo siguiente:

- 1.- La PRL afecta de manera importante la proliferación de linfocitos y la expresión de mediadores inmunológicos como la IL-2 y su receptor (Mukherjee y col., 1990; Viselli y col., 1991).
- 2.- La expresión del RNAm de la prolactina se ha caracterizado en diversos tejidos linfocitarios (timo, bazo, amígdalas, nódulos linfáticos, linfomas y timomas), al parecer interviene en la progresión de tumores (Wu y col., 1996).
- 3.- Los receptores de PRL son expresados en linfocitos B, T y MØ (Figura 2).

4.- La adición de anticuerpos específicos contra la PRL inhibe la proliferación de los linfocitos en cultivo, lo que sugiere que la prolactina puede tener mecanismos autócrinos y parácrinos (Pellegrini y col., 1992).

5.- La hipofisectomía o tratamiento con agente agonista de la dopamina, se acompaña de una deficiente respuesta del sistema inmunológico que puede ser restaurada por la adición de PRL exógena, lo que permite suponer que la PRL hipofisaria modula la función normal de los linfocitos (Pellegrini y col., 1992).

6.- La PRL estimula la producción de timulina (hormona tímica), un importante modulador del crecimiento y diferenciación de timocitos (Dardene y col., 1989) (Tabla 2).

Diversas células del sistema inmunológico como timo y bazo contienen el RNAm de la prolactina y secretan una prolactina bioactiva de tamaño similar a la hipofisaria. Además, se han reportado diversas isoformas como las de 11 kDa en timocitos y linfocitos, las de 60 kDa en células mononucleares (Larrea y col., 1997), con capacidad de estimular la respuesta inmune mediada por células (Bole-Feysot y col., 1998; Yu-Lee, 1997). Por otra parte, las acciones biológicas de la hormona PRL se hallan bajo el control de citocinas capaces de modificar la concentración plasmática de PRL. Estos efectos recíprocos implican la presencia de receptores específicos, los que se han hallado en linfocitos y células accesorias. Desde hace tiempo se sabe que la secreción de PRL por parte de los linfocitos tiene importancia fisiológica, numerosas clases de linfocitos poseen receptores específicos para PRL en la membrana celular, y la ocupación de estos receptores estimula la síntesis y secreción de citocinas linfocitarias (Figura 2). Los efectos protectores y supresores de la prolactina han sido demostrados en modelos experimentales de inflamación e infección (Zellewer y col., 1996; Oberbeck y col., 2003). En la mayoría de los estudios los niveles de PRL circulantes fueron artificialmente manipulados antes de que el estímulo inflamatorio-infeccioso fuera dado. Sin embargo a pesar de todo, los posibles cambios en los niveles de prolactina circulantes, se atribuyen a la presencia del PRL-R en tejidos blanco. La relevancia clínica de la PRL sobre el sistema

inmunológico no se conoce bien en la actualidad, pero existen algunas evidencias que apoyan el probable papel de esta hormona sobre el curso de ciertas enfermedades autoinmunes. La mayoría de pacientes con lupus eritematoso generalizado y artritis reumatoide cursan con incremento en las concentraciones de PRL circulante "hiperprolactinemia". El aumento moderado de estas concentraciones sugiere la participación de tejidos extrahipofisarios de PRL circulante. Además, la secreción de la PRL por los linfocitos de estos pacientes es mayor que en sujetos sanos (Chuang y Molitch, 1988).

Tabla 2. Acciones biológicas de la prolactina

| Órganos blanco | Efectos | Referencias |
|--|--|-----------------------|
| Glándula mamaria | Regula el desarrollo y crecimiento celular, aumenta la síntesis de proteínas y carbohidratos de la leche, regula el tránsito de IgA a través del epitelio celular | (103) |
| Hígado, riñón, piel, páncreas, hipófisis, Sist. inmunológico, líneas celulares tumorales de glándula mamaria y de linfocitos Nb2 | Estimula el desarrollo y crecimiento celular y contribuye a la progresión del cáncer | (31) (76) |
| Gónadas | Regula acciones luteotrópicas y luteolíticas, inhibe la esteroidogénesis, estimula síntesis de receptores para gonadotropinas | (4) |
| Hipotálamo | Estimula el recambio de dopamina, disminuye la secreción de GnRH | (48) |
| Páncreas | Estimula la proliferación, aumenta la actividad de las células β para la secreción de insulina | (81) |
| Próstata | Estimula la proliferación, aumenta IGF-1 y sus receptores y los receptores para andrógenos | (117) |
| Riñón, intestino, placenta | Regula el equilibrio de agua y electrolitos | (101) |
| Sistema inmunológico: Células NK | Contribuye a la proliferación, diferenciación y activación de NK contribuyendo a la síntesis de IFN- γ | (17) |
| Granulocitos | Estimula la expresión del gen de IRF-1 y la síntesis de la iNOS | (16) |
| Linfocitos | Estimula la inmunidad celular, la proliferación, la síntesis de IFN- γ , de IL-2 y sus receptores, inhibe la apoptosis, regula la síntesis de la iNOS, estimula la expresión del gen de IRF-1 | (55) (122) (38) |
| Monocitos | Induce la diferenciación y estimula la efectividad de presentación del antígeno, regula los receptores para GM-CSF | (72) |

(Modificado de Méndez y Col. 2005. Revista de Investigación Clínica. 57(3): 447-456)

1.7.5 Prolactina y su receptor en la tuberculosis bovina

La unión de PRL y su receptor mantiene una marcada interacción bidireccional con el sistema inmunológico: Estimula la proliferación linfocitaria, favoreciendo de este modo la respuesta inmune, mientras que sus propias acciones biológicas se hallan bajo el control de citocinas capaces de modificar la concentración plasmática de PRL (Li-Yuan Yu-lee, 2002).

Estos efectos recíprocos implican la presencia de receptores específicos para PRL, presentes en la membrana celular de numerosas clases de linfocitos y células accesorias. En los bovinos, el PRL-R es un miembro de la superfamilia de receptores de citocinas, es una proteína transmembranal de un sólo paso localizado en el cromosoma 20 específicamente en la banda 20q17 y se expresa en una amplia gama de células y tejidos, incluyendo linfocitos y macrófagos (Figura 2). En la especie bovina se expresan 2 isoformas del PRL-R: una corta de 55 kDa, o menor, y una larga de más de 100 kDa cuyo peso molecular se ve afectado por diversas modificaciones postraduccionales, tales como, la N-glicosilación, la fosforilación y la ubiquitinación que podrían afectar el peso y funcionalidad de la molécula (Schuler y col., 1997).

Se ha determinado su participación en la modulación de la síntesis de diferentes mediadores inflamatorios incluyendo óxido nítrico, prostaglandinas y citocinas, ya que se ha informado que la PRL contribuye a aumentar los niveles del receptor para la IL-2 (Meli y col., 1997). La PRL no posee actividad intrínseca de cinasa, por lo cual, dependiendo del tipo de tejido es la naturaleza de la vía de señalización (Figura 4). Su efecto inmunomodulador está asociado a la interacción de PRL con su receptor mediante la vía de las JAK-Stat1, que estimula la expresión de genes asociados a la respuesta inmune como IRF-1, encargado de mediar la activación de la expresión de genes blanco como IFN- γ , iNOS y NRAMP1 los cuales son determinantes en la actividad antibacterial contra patógenos intracelulares (Figura 4). Éstos juegan un papel importante en la

función de células dendríticas, macrófagos, diferenciación de linfocitos T y NK indispensables en la respuesta TH1 (Taniguchi y col., 2001). Sin embargo, la prolactina también está asociada a la vía JAK-Stat5, la cual determina la supresión transcripcional de IRF-1 coadyuvando a mantener la homeostasis del sistema inmune frente a una respuesta de tipo TH1 (Ramana y col., 2000).

Actualmente, se considera que tanto las hormonas, como las citocinas son moléculas reguladas funcionalmente mediante la expresión específica de tejido de sus receptores. Recientemente, se ha demostrado *in vitro* que una mezcla de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) inducen la expresión del PRL-R en fibroblastos pulmonares desencadenando la respuesta inmune por vía de las JAK-Stat1. También se observó que la fosforilación de Stat5 inhibe la expresión de IRF-1 y por lo tanto, se reduce la expresión de la iNOS y se comprueba el efecto inmunomodulador de la PRL (Corbacho y col., 2003). Con este antecedente, estos mismos autores estudian en un modelo *in vivo* la función de la PRL en una respuesta de fase aguda, utilizando ratones inoculados con lipopolisacárido (LPS). La expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) son características de este modelo, y se demuestra que la expresión del PRL-R es específica de tejido, ya que se observó una baja expresión de PRL-R en órganos internos como hígado, pulmón y una gran expresión en órganos linfoides, como timo y bazo. La regulación específica de tejido del PRL-R durante la inflamación sugiere la existencia de un mecanismo para desviar la señalización de la PRL a los órganos del sistema inmune (Corbacho y col., 2004).

2. JUSTIFICACIÓN

En México, la tuberculosis es un padecimiento grave, tanto en humanos como en el ganado bovino lechero. Existen evidencias de que varios genes participan en la susceptibilidad o en la protección contra la TBB. La defensa montada durante la tuberculosis principalmente es mediada por la respuesta inmune celular, donde es crucial la activación de los macrófagos y linfocitos T. En este aspecto, se sabe que la IL-12 y el IFN- γ son factores determinantes en el desarrollo de una respuesta celular efectiva contra TB, determinando la formación del granuloma y la contención de la infección, ciertas mutaciones en los receptores de estas citocinas han sido asociadas con infecciones diseminadas de TB en humanos.

Al evaluar la frecuencia de excreción de *M. bovis* en leche, calostro, exudados nasales y lavados bronquioalveolares se comprobó que existen variaciones debidas a la capacidad de los macrófagos residentes en distintos órganos para contener la infección. No obstante, se desconoce el control genético de la resistencia a la TBB. Por otro lado, la unión de la PRL con su receptor se asocia con la modulación de la síntesis de mediadores inflamatorios contribuyendo a estimular la expresión de genes asociados a la respuesta inmune mediada por células, por lo que se considera que puede jugar una función importante en el control de la TBB.

Actualmente no existe autorización de vacunas para el control de la TBB por ello es necesario identificar y caracterizar los genes principales que intervienen en el control inmunológico de esta infección. El control de la TBB a nivel celular está determinado por la activación de las funciones de los macrófagos, por lo cual es de importancia analizar la expresión de los genes responsables de dicha activación lo cual puede contribuir a caracterizar el control genético de la TBB.

3. HIPÓTESIS

Durante la infección por *M. bovis* en vacas lecheras, la expresión del receptor de prolactina e IL-12 varía entre células de distintos órganos de animales infectados con tuberculosis bovina.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión del receptor de prolactina e IL-12 en células de distintos órganos obtenidos de bovinos infectados experimental y naturalmente con *M. bovis*, así como en bovinos sanos.

4.1 Objetivos particulares

1. Comparar los niveles de expresión del PRL-R e IL-12 a nivel de RNA y proteína en tejidos linfoides (timo, bazo y nódulos linfáticos) y en órganos internos (pulmón e hígado) de bovinos infectados experimental y naturalmente con *M. bovis*, así como de bovinos sanos.
2. Determinar la expresión del PRL-R e IL-12 a nivel de RNA y proteína en lavados bronquioalveolares obtenidos de bovinos infectados experimental y naturalmente con *M. bovis*, así como de bovinos sanos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias, CICIVET, AA-MVZ, ubicado en Av. Universidad km 1 Ex-hacienda de Aquetzalpa, Tulancingo, México y en las instalaciones del CENID-Microbiología Animal del INIFAP, México D.F.

5.1 Material biológico

5.1.1 Muestras de vacas infectadas con *M. bovis* y controles sanos

En este trabajo se utilizaron tres grupos de vacas Holstein con las siguientes características:

1. Vacas infectadas experimentalmente con *M. bovis*

En este grupo se utilizaron 4 vacas sanas que fueron desafiadas con una cepa silvestre de *M. bovis* previamente aislada y caracterizada, con una dosis de 5×10^4 UFC vía intra-traqueal. Los tejidos de estos animales fueron amablemente donados por el Dr. Fernando Díaz Otero (INIFAP, México D.F). Para mostrar la infección por *M. bovis* antes del sacrificio, se les realizó la prueba de la tuberculina o intradermorreacción doble comparativa inoculando PPD bovina 0.1 ml (1 mg proteína/ml de la cepa AN5 de *M. bovis*) o PPD aviar 0.1 ml (0.5 mg proteína/ml de la cepa D4 de *M. bovis*)*. La reacción se midió a las 72 horas considerándose positivas las que mostraron incremento en el grosor de piel mayor a 12 mm. También se les realizó la prueba del IFN- γ , se obtuvo sangre con heparina (20 unidades de heparina/ml) y se estimuló con 100 μ l de (PPD-aviar 300 mg/ml) y (PPD bovino 300 mg/ml)**. Se consideró positivo cuando el estímulo de PPD-bovino excedió 100 unidades de OD₄₅₀ y con PPD aviar 50 unidades OD₄₅₀. A la necropsia, tres de ellas mostraron granulomas principalmente en nódulos linfáticos y por Zhiel-Neelsen todas resultaron positivas. La infección fue corroborada al aislar *M. bovis* de diferentes órganos de las vacas.

2. Vacas infectadas naturalmente con *M. bovis*

Este grupo está compuesto por cuatro vacas Holstein infectadas con *M. bovis* de manera natural. Dos de ellas fueron obtenidas de un hato de alta prevalencia con pruebas de tuberculina e IFN- γ positivas. Los tejidos de estos animales fueron amablemente donados por el **Dr. Ciro Estrada Chávez** (CIATEJ, Guadalajara, México). La necropsia sólo mostró granulomas principalmente en nódulos linfáticos. Las otras 2 vacas fueron obtenidas del Rastro Municipal de Tulancingo, México identificadas por lesiones sugestivas a tuberculosis y por Zhiel-Neelsen todas resultaron positivas.

3. Controles sanos

Este grupo constó de 2 vacas Holstein provenientes de un hato libre de tuberculosis y brucelosis perteneciente al Rancho Universitario de la UAEH (PROUNILAC), siendo negativas a la prueba de la tuberculina e IFN- γ . La necropsia no mostró lesiones en ningún órgano y por Zhiel-Neelsen resultaron negativas. En este estudio también se utilizó una vaca que estaba en el pico de producción láctea (3 meses *post* parto) y una vaca al inicio de la lactancia (4 días *post* parto), de ambas vacas sólo se colectó tejido mamario utilizado para estandarizar la expresión del PRL-R.

De todos los bovinos mencionados anteriormente, se obtuvieron muestras de aproximadamente 2 cm² de tejidos linfoides (timo, bazo y nódulos linfáticos retrofaríngeo, traqueobronquial y mediastínico), órganos internos (pulmón e hígado) y LBA que posteriormente fueron conservadas a -80 °C.

* Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, México D.F, México

** BOVIGAM, CSL, Parkville, Australia

5.1.2 Obtención de los lavados bronquioalveolares

Para obtener las células de los LBA los pulmones fueron transportados en frío al laboratorio, luego se lavaron con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7.2)*, dando ligeros masajes y con una bomba de vacío se recolectaron las células, depositándolas en tubos falcon de 50 ml. Posteriormente, se centrifugaron por 15 minutos a 5,000 gravedades y el *pellet* fue resuspendido en 3 ml de (PBS*/glicerol 50%) o en 500 µl de trizol** y luego se conservaron a -80°C.

5.2 Extracción de RNA

El RNA total de las células de los diferentes tejidos y LBA de las vacas utilizadas en este trabajo se extrajo por medio de la técnica de Trizol**. Se tomaron 50 mg de tejido de cada una de las muestras y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 ml, al cual se le agregaron 500 µl de trizol y sin que la muestra se descongelara se homogeneizaron con un politrón PT 1200 E***. Después de triturar el tejido se agregó 0.1 ml de cloroformo agitando suavemente por 15 segundos, se dejó incubar la suspensión 5 minutos a 4°C en cama de hielo. Se centrifugó la suspensión a 4°C durante 15 minutos a 5,000 gravedades, se recuperó el sobrenadante (fase incolora) en la que se encuentra el RNA y se transfirió a un tubo eppendorf limpio de 1.7 ml (0.5 ml de la fase acuosa por cada tubo).

Luego se le adicionó 0.5 ml de isopropanol (vol/vol), para precipitar el RNA y se dejó incubando durante 15 minutos a 4°C, se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 5,000 gravedades, se eliminó el sobrenadante para lavar el botón de RNA con 800 µl de etanol al 75 % previamente enfriado a -20°C. Se mezcló la suspensión por 15 segundos y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 5,000 gravedades, se eliminó el sobrenadante hasta la última gota. Una vez obtenido el botón de RNA, se realizó una purificación del RNA por el método de DNasa I, para lo cual se agregó 190 µl de buffer para DNasa 1X, al botón de RNA y 4 µl de la enzima DNasa 50 U/µl†, y se incubó en baño maría a 37°C durante 15 minutos. Se

agregaron 0.2 ml de fenol saturado a cada muestra (vol/vol), se agitó por 15 segundos y se centrifugó 3 minutos a 5,000 gravedades, se transfirió la fase superior (incolora) a otro tubo sin tocar y sin llevarse nada de la fase inferior.

Se le adicionó 0.2 ml de cloroformo/alcohol-Isoamílico (24:1) (vol/vol) agitando 15 segundos y se centrifugó 3 minutos a 5,000 gravedades. Se recupera el sobrenadante para agregar 500 µl de etanol al 100%, recién sacado del congelador y 70 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.3. Se agitó suavemente, se centrifugó a 4°C por 15 minutos, se decantó y se dejó secar el *pellet*, para luego resuspenderlo en 50 µl agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

EL RNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 1000[‡] a densidad óptica de 260 y 280 nm colocando 2 µl de muestra.

*Santa Cruz Biotechnology, Inc

**Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

***KINEMATICA, AG

† InvitrogenLife Technologies, Carlsbad, CA

‡ NanoDrop Technologies, Inc.

5.3 Electroforesis en geles de agarosa con formaldehído

La calidad y cantidad del RNA se estimó en geles de agarosa al 1% en TBE 1X con 2% de formaldehído al 37 %. La agarosa se fundió, se le agregó 1.5 µl de bromuro de Etidio (5mg/ml) por cada 15 ml de agarosa y se colocó en una cámara de electroforesis horizontal dejándose solidificar. Se mezclaron 2 µg de RNA con 3 µl de buffer de carga (azul de bromofenol, xilencianol, 10% glicerol, 2% formaldehído, 15% de formamida) y se colocaron en cada pozo del gel, la electroforesis se realizó a 100 volts durante 30 minutos y se observaron los geles con radiación UV en un transiluminador.

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 2% durante 50 minutos, el tamaño de los fragmentos fue determinado en un fotodocumentador Gel Logic 1500* con un marcador de peso molecular de 201 a 622 pb (pBR322/Mspl) **.

5.4 Síntesis de DNA complementario

La reacción de retrotranscripción (RT) para generar DNAc se realizó a partir de RNA total. La mezcla de reacción por muestra para la RT se realizó en un volumen de 20 µl, utilizando los siguientes reactivos: 2 µl de buffer 10x 1.5 mM, 2 µl de DTT 0.1M, 2 µl de dNTP's 2 mM, 3 µg random primers, 2 µl de RNase OUT 40 U/ µl y 2 µl de enzima RT Superscript III 200 U/ µl***, 2 µg de RNA y se ajustó con agua DEPC. La reacción de RT se realizó usando un termociclador GeneAmp 9700 Sequence Detector†. La mezcla fue incubada durante 60 minutos a 37°C y la enzima inactivada a 95°C durante 5 minutos, almacenado a -80°C hasta su uso.

5.5 Análisis de la expresión del PRL-R por RT-PCR

Para la detección de PRL-R se utilizaron los *primers* sentido 5'-CCA GAG AGC TCC ATC CAG ATA CCT A-3' y antisentido 3'-CAA GTC CTC GCA GTC AGA AGT GG-5' amplificando un producto de 302 (pb) y para control interno β-actina sentido 5'-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG-3' y antisentido 3'-GCA TTT GCG TGG ACA ATG GGA -5' amplificando un producto de 890 (pb) (Shoda y col. 2000)‡.

El PCR se realizó usando un termociclador GeneAmp 9700 Sequence Detector[†]. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, en la cual se utilizaron 1 μ l de buffer 10x 1.5mM, 0.8 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1 μ l de dNTP's 2 mM, 100 pmol del *primer* de β -Actina y del PRL-R*, 1 unidad de taq Gold (50 U/ μ l)[†], 2 μ l de cDNA y se ajustó con agua DEPC. La activación de la enzima a 94°C por 12 minutos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 60°C por 1 minuto, extensión 72°C por 1 minuto; al final de los 40 ciclos se dio una extensión de 10 minutos a 72°C.

* Kodak molecular Imaging Systems

** Sigma Chemical Co

*** Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA

† Applied Biosystems, CA, USA

‡ Gibco, Grand Island, NY

5.6 Análisis de la expresión del PRL-R e IL-12 por *Western blot*

Para extraer las proteínas totales de las células de los tejidos y LBA fueron homogeneizados en buffer RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, y 0.1% dodecilsulfato sódico [SDS])* , conteniendo un mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina, pepstatina, quimostatina, antipaina y fluoruro de fenilmetil sulfonilo [PMSF]) e inhibidores de fosfatasa (ortovanadato de sodio NA3VO41 mM y NAF 50 mM).

El lisado celular se obtuvo por centrifugación durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry** y observadas en geles teñidos con azul de *Coomassie*. Aproximadamente, 100 µg de proteínas totales fueron cargadas en geles de poliacrilamida de 7.5 a 10% y transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF)**.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% toda la noche y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-PRL-R (Sc-20992) (2.5 µg/ml)*** y anti-IL-12p70 (MCA2137Z) (2 µg/ml)† por 5 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas con PBS se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 1 hora, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia‡. Como control fue utilizado el anticuerpo monoclonal anti-actina (MCA1964) (1:1000)°. El tamaño de los fragmentos fue determinado en un fotodocumentador Gel Logic 1500** con los marcadores de peso molecular que van de 29-100kDa (161-0305) y de 31-196 kDa (16-0318) **.

* Sigma-Aldrich Co.

** Bio-Rad, Hercules, CA)

*** Santa Cruz Biotechnology, Inc

† Serotec, Oxford, United Kingdom

‡ Pierce Chemical, Rockford, Illinois

° Chemicon, Temecula, California, USA

** Kodak molecular Imaging Systems

6. RESULTADOS

6.1 Pruebas inmunológicas y patológicas

Las pruebas realizadas a ocho de los bovinos utilizados en este trabajo antes del sacrificio, fueron la intradermorreacción e IFN- γ . Los cuatro bovinos del grupo de los infectados experimentalmente con *M. bovis* fueron positivos para ambas pruebas, la infección se corroboró al aislar *M. bovis* de diferentes órganos de las vacas. Sólo a dos de los cuatro animales del grupo de los infectados de manera natural se les realizaron ambas pruebas, resultando positivos a tuberculosis. El diagnóstico para los otros dos se basó en la observación de lesiones macroscópicas a la necropsia, sugestivas a la infección.

La histopatología confirmó lesiones granulomatosas sugestivas a tuberculosis en aquellos animales positivos a pruebas inmunológicas y macroscópicas. También se les realizó la prueba de Zhiel-Neelsen para identificar bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) en los granulomas de los diferentes órganos. Todos los animales infectados, excepto uno, mostraron (BAAR). Dos de los bovinos infectados de manera natural mostraron gran cantidad de bacilos en los granulomas de órganos internos y linfoides (Figuras 10 y 12 B). Los 2 controles sanos incluidos en este estudio resultaron negativos a todas las pruebas (Tabla 3).

La necropsia mostró lesiones moderadas en nódulos linfáticos retrofaríngeo y mediastínico en 2 de los bovinos infectados experimentalmente (vaca 1 y 2; Tabla 4) y el bovino 1 además presentó múltiples lesiones en hígado. Otro de los bovinos (vaca 3) de este grupo sólo presentó una lesión pequeña en pulmón, y el otro bovino (vaca 4) no mostró lesiones en ninguno de los órganos (Tabla 4). En los bovinos infectados de manera natural se observaron múltiples lesiones y granulomas. En los nódulos linfáticos retrofaríngeo, mediastínico, traqueobronquial, en pulmón e hígado de 2 de ellos (vaca 5 y 6; Tabla 4) presentaron múltiples lesiones y granulomas calcificados. En los otros 2 bovinos

de este grupo (vaca 7 y 8) sólo se observaron lesiones moderadas en nódulos linfáticos retrofaríngeo y traqueobronquial (Tabla 4).

Tabla 3. Diagnóstico inmunopatológico de bovinos infectados experimental y naturalmente con *M. bovis*

| No. del animal | PPD Tuberculina | INF γ Bovigam | Granulomas Necropsia | Zhiel-Neelsen |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| Infectedas experimentalmente | | | | |
| Vaca 1 | √ | √ | Rf, M | √ |
| Vaca 2 | √ | √ | Rf, M | √ |
| Vaca 3 | √ | √ | PL | √ |
| Vaca 4 | √ | √ | - | √ |
| Infectedas naturalmente | | | | |
| Vaca 5 | ● | ● | Rf, T, M, PL, Hg | √ |
| Vaca 6 | ● | ● | Rf, T, M, PL, Hg | √ |
| Vaca 7 | √ | √ | Rf | √ |
| Vaca 8 | √ | √ | - | - |
| Controles | | | | |
| Vaca 9 | - | - | - | - |
| Vaca 10 | - | - | - | - |

PPD=Derivado proteico purificado, INF- γ =Interferón gamma, √=Positivo, - =Negativo, ●=Sin pruebas diagnosticas, T=Traqueobronquial, Rf=Retrofaríngeo, M=Mediastínico, PL=Pulmón, Hg=Hígado.

Tabla 4. Resultados macroscópicos de bovinos infectados experimental y naturalmente con *M. bovis*

| Órgano | LN Rf | LN M | LN Tb | Timo | Pulmón | Bazo | Hígado |
|--------|--|---------|---------|------|---------|------|---------|
| No. | <i>Infectadas experimentalmente</i> | | | | | | |
| Vaca 1 | ++ A/P | ++ A/P | - | - | - | - | +++M |
| Vaca 2 | ++ A/P | ++ A/P | - | - | - | - | - |
| Vaca 3 | - | - | - | - | +P | - | - |
| Vaca 4 | - | - | - | - | - | - | - |
| Vaca 5 | +++ A/G | +++ A/G | +++ A/G | + | +++ A/G | - | +++ A/G |
| Vaca 6 | +++ A/G | +++ A/G | +++ A/G | + | +++ A/G | - | +++ A/G |
| Vaca 7 | ++ A/G | - | - | - | - | - | - |
| Vaca 8 | ++ | - | ++ | - | - | - | - |

A=Aumentado de tamaño, P=Piogranulomatoso, G=Granuloma calcificado, +=Ligeramente lesionados, +=Moderadamente lesionados, +++=Muy lesionados, -=Sin cambio aparente, M= Lesiones multifocales.

6.2 Observación de la integridad de las proteínas por electroforesis en geles de acrilamida

Para determinar la expresión del PRL-R e IL-12 en las células de órganos linfoides (timo, bazo, nódulos linfáticos retrofaríngeo, traqueobronquial y mediastínico), de órganos internos (pulmón e hígado) y en LBA se extrajeron proteínas totales a partir de lisis celular con el buffer RIPA. La integridad fue evaluada en geles de poliacrilamida al 10 % teñidos con azul de *Coommassie* (Figura 5).

El patrón de bandas observado en la Figura 5 nos demuestra una buena cantidad y calidad de proteínas en todos los tejidos, las cuáles se utilizaron para medir la expresión de una proteína determinada, por el método de *Western blot*.

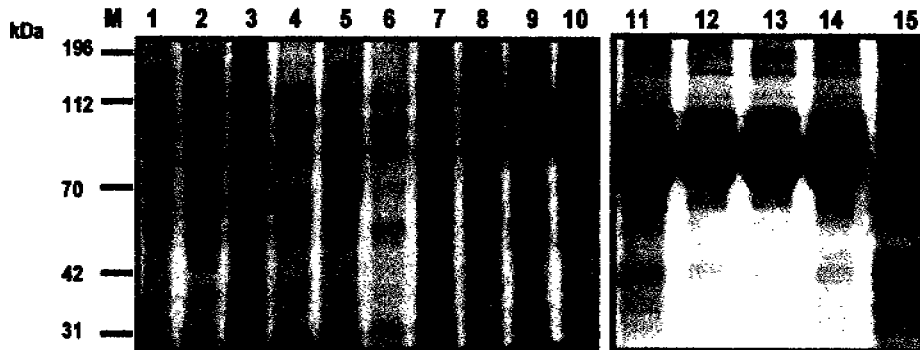


Figura 5. Integridad de proteínas totales de tejidos y de LBA. Línea 1 timo, 3 hígado, 5 bazo, 7 pulmón, 9 nódulo linfático traqueobronquial de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, 2 timo, 4 hígado, 6 bazo, 8 pulmón y 10 nódulo linfático traqueobronquial de bovinos libres TBB, 11, 12, 13 y 14 LBA de bovinos infectados experimentalmente y naturalmente con *M. bovis* y 15 LBA de bovinos libres de TBB.

6.3 Análisis de la expresión del PRL-R en bovinos sanos e infectados con *M. bovis* por Western blot

Para demostrar el funcionamiento del anticuerpo anti PRL-R utilizado en este estudio, se extrajeron proteínas totales de tejido de glándula mamaria de bovinos en diferentes períodos de producción láctea. Una de las muestras en el pico de producción (3 meses *post* parto) que utilizamos como control positivo del experimento y la otra vaca en período de *post* parto (4 días) con la finalidad de obtener un control negativo.

En este análisis se identificaron 2 proteínas con peso similar a las diferentes isoformas de la proteína del PRL-R en las células de glándula mamaria del bovino que estaba en el pico de producción láctea, una de 75 kDa, asociada a la isoforma larga y otra de 55 kDa asociada a la forma corta del receptor (Figura 6, línea 1). Sin embargo, en las células de glándula mamaria del bovino en período *post* parto, al inicio de la lactancia no se observa la expresión del PRL-R (Figura 6, línea 2).

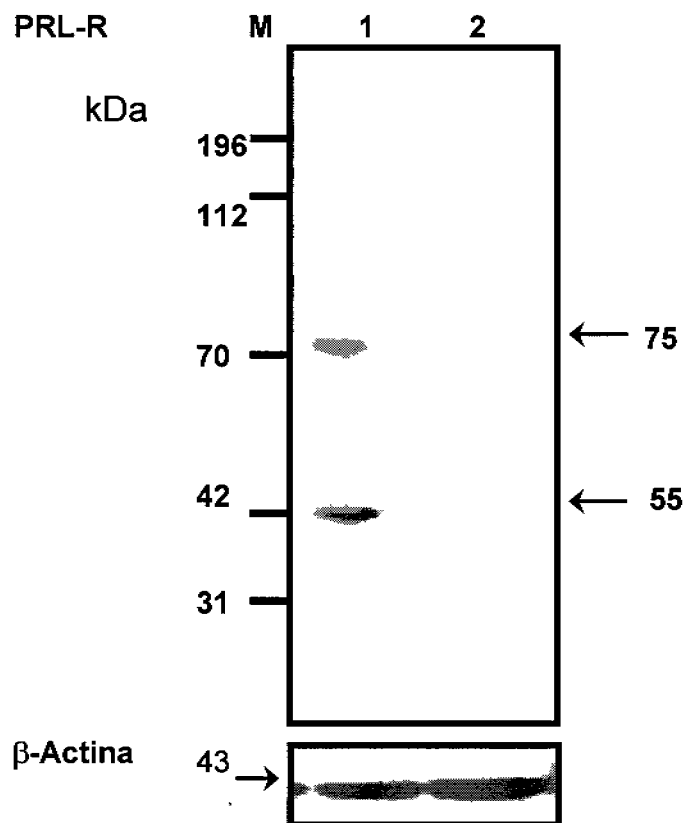


Figura 6. *Western blot* con anti-PRL-R en tejido de glándula mamaria de bovinos libres de TBB. Línea 1, células de tejido de glándula mamaria de 3 meses *post parto*, línea 2, células de tejido de glándula mamaria de un bovino de 4 días *post parto*. Las proteínas totales fueron separadas en geles de poliacrilamida al 7.5%, transferidas a una membrana de PVDF, incubadas con anti-PRL-R, más un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, y reveladas por quimioluminiscencia. La expresión de β -actina fue usada como control interno. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 31-196 (kDa).

6.3.1 Expresión del PRL-R en timo y bazo de bovinos sanos e infectados con *M. bovis*

Al evaluar la expresión del PRL-R en tejidos de timo y bazo de los bovinos infectados con *M. bovis*, se observó la expresión de 6 isoformas diferentes del receptor, 4 de ellas asociadas a la forma larga (120, 110, 90 y 75 kDa) y 2 asociadas a la isoforma corta (55 y 40 kDa). En contraste, en los dos bovinos libres de tuberculosis no se observó la expresión del PRL-R (Figura 7, A línea 5 y 6; Figura 7, B línea 11 y 12).

PRL-R

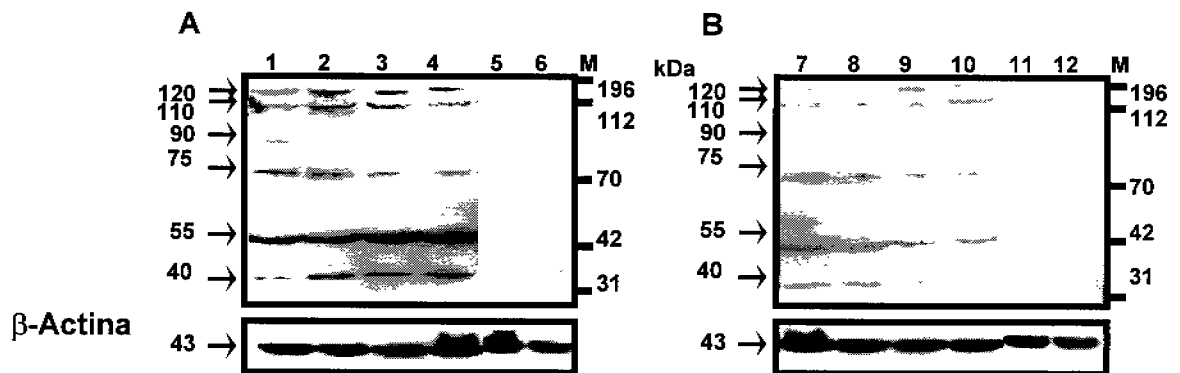


Figura 7. Expresión del PRL-R en células de timo y bazo de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis* por *Western blot*. **A)** Línea 1, 2, 3 y 4 timo de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, 5 y 6 timo de bovinos libres de TBB. **B)** Línea 7, 8, 9 y 10 bazo de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, 11 y 12 bazo de bovinos libres de TBB. Expresión de β -actina usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 31-196 (kDa).

6.3.2 Expresión del PRL-R en nódulos linfáticos de bovinos sanos e infectados con *M. bovis*

En los nódulos linfáticos traqueobronquial, retrofaringeo y mediastínico de los bovinos infectados natural o experimentalmente con *M. bovis*, que no presentaron lesión en dichos órganos se observó la expresión de una isoforma del PRL-R de 75 kDa (Figura 8, A y B, línea 1-3; Figura 8, C línea 1-2; Figura 9, línea 1-3). Sin embargo, en aquellos animales infectados natural y experimentalmente, que presentaron lesiones en estos nódulos linfáticos se observaron diferentes isoformas del PRL-R de 75, 65 y 45 kDa (Figura 8, A y B, línea 4; Figura 9, línea 4-6). En los dos animales sanos no se detectó expresión de la proteína, al igual que en timo y bazo. (Figura 8, A, B y C, línea 5 y 6).

PRL-R

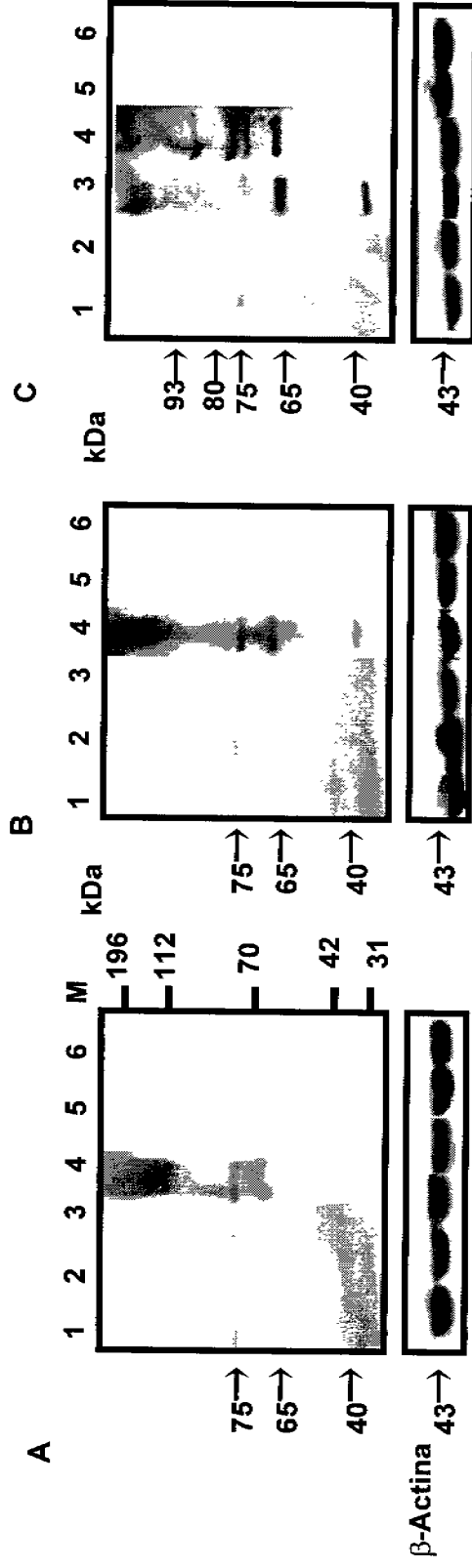


Figura 8. Expresión del PRL-R en muestras de nódulos linfáticos de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*. **A)** Nódulo linfático traqueobronquial (1, 2, 3) positivos a TB, sin lesiones, (4) con múltiples lesiones, (5 y 6) bovinos libres de TB. **B)** Nódulo linfático mediastínico, (1, 2, 3) positivos a TB, sin lesiones, (4) con múltiples lesiones, (5 y 6) bovinos libres de TB. **C)** Nódulo linfático retrofaringeo (1, 2) positivos a TB sin lesiones, (3 y 4) con múltiples lesiones, (5 y 6) bovinos libres de TB. La expresión de β -actina usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 31-196 (kDa).

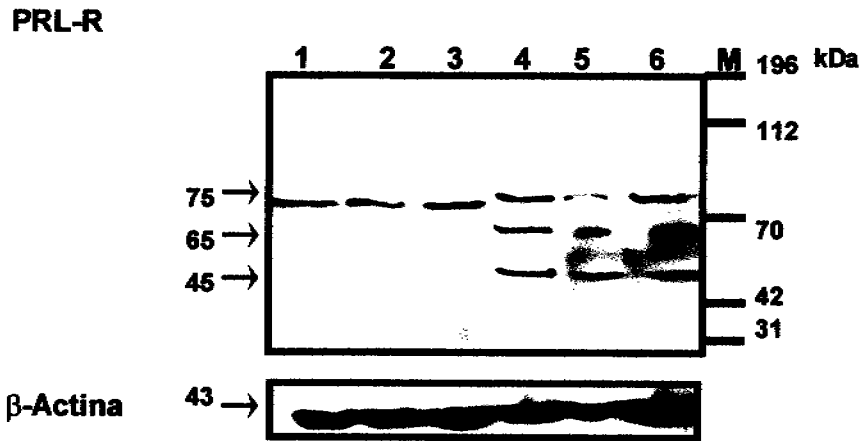


Figura 9 Expresión del PRL-R en nódulos linfáticos de bovinos infectados de manera natural con *M. bovis* por *Western blot*. (1 y 4) nódulo linfático traqueobronquial, (2 y 5) retrofaríngeo (3 y 6) mediastínico (1-3) bovinos infectados naturalmente con *M. bovis* que no presentaban lesiones, (4-6) bovinos infectados naturalmente con *M. bovis* con lesiones sugestivas a tuberculosis. La expresión de β -actina usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 31-196 (kDa).

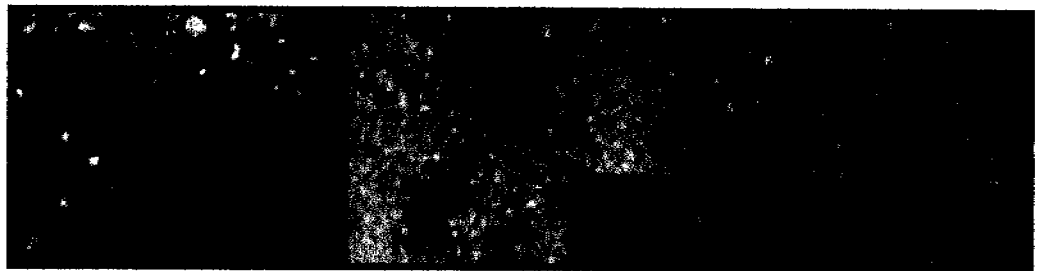


Figura 10. Identificación de BAAR por Zhiel-Neelsen. Las células fueron obtenidas por impronta de tejido de nódulos linfáticos traqueobronquial, mediastínico y retrofaríngeo de los bovinos infectados naturalmente con *M. bovis* con lesiones sugestivas a tuberculosis. Barra=50 μ m.

6.3.3 Expresión del PRL-R en pulmón e hígado de animales sanos e infectados con *M. bovis*

En hígado de animales infectados, ya sea de manera natural o experimental con *M. bovis*, observamos 2 isoformas del PRL-R, una de 100 y otra de 90 kDa (Figura 11, línea 1-4; Figura 12, A línea 2). En los tejidos de pulmón de estos mismos animales detectamos la expresión de 3 isoformas del PRL-R de 140, 75 y 55 kDa (Figura 11, línea 1- 4; Figura 12, B línea 1). En hígado y pulmón de los bovinos sanos no se apreció ninguna banda (Figura 11, A y B línea 5 y 6).

En ambos órganos de los bovinos infectados naturalmente que tenían una tuberculosis diseminada (Tabla 4: vaca 5 y 6) se observaron grandes cantidades de BAAR (Figura 12 B).

PRL-R

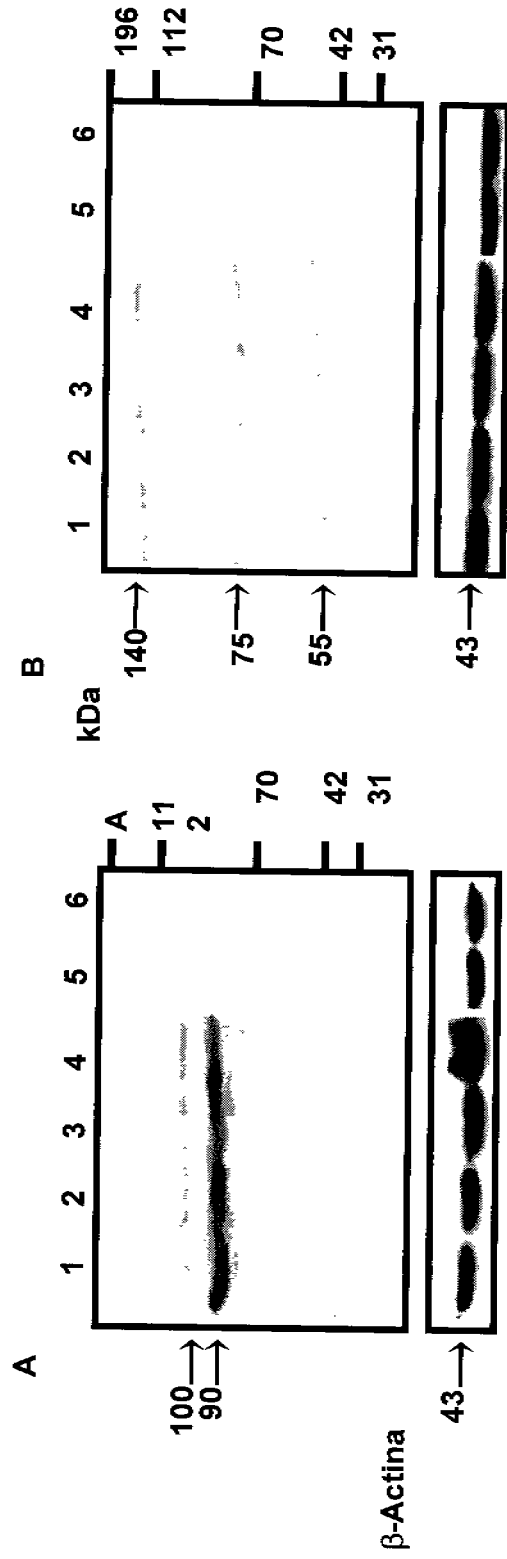
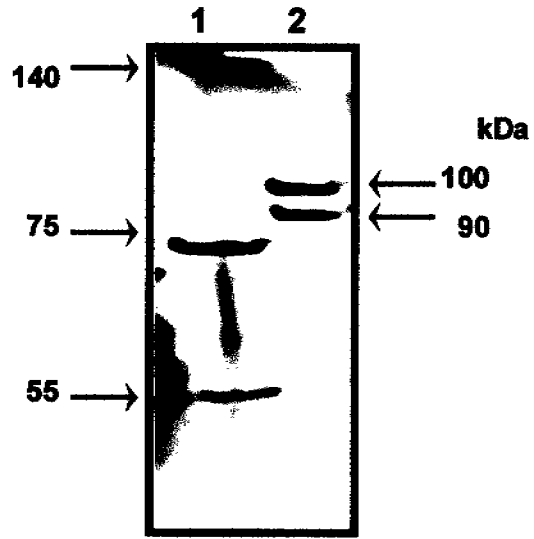


Figura 11. Expresión del PRL-R en células de pulmón e hígado de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis* por Western blot. **A)** Muestras de hígado de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, línea 1-4, línea 5 y 6 de bovinos libres de TBB. **B)** Muestras de pulmón de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, línea 1-4, línea 5 y 6 pulmón de bovinos libres de TBB. La expresión de β -actina usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 31-196 (kDa).

PRL-R

A



β -Actina

B

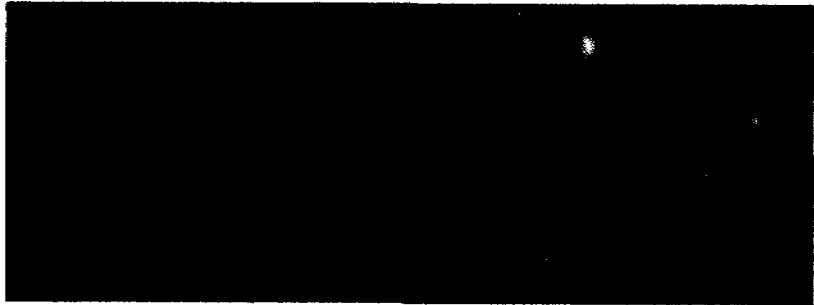


Figura 12. Expresión del PRL-R en células de pulmón e hígado de bovinos infectados naturalmente con *M. bovis* por *Western blot*. A) Línea 1 pulmón, línea 2 hígado de bovinos infectados naturalmente con *M. bovis*. Expresión de β - actina usada como control. B) Zhiel-Neelsen de células obtenidas por impronta del mismo pulmón e hígado del panel A. Barra=50 μ m.

6.3.4 Expresión del PRL-R en lavados bronquioalveolares de bovinos sanos e infectados con *M. bovis*

La expresión del PRL-R en células de lavados bronquioalveolares obtenidos de bovinos infectados experimental y naturalmente con *M. bovis*. Se analizó por la técnica de *Western blot*, de igual manera que en los de tejidos. Este estudio nos permitió observar en LBA de bovinos infectados con *M. bovis* la presencia de dos isoformas del PRL-R de 75 y 55 kDa (Figura 13, línea 2-5), mientras que en LBA obtenidos de bovinos sanos no se observó expresión del PRL-R (Figura 13, línea 1).

Las diferentes isoformas caracterizadas en bovinos infectados con *M. bovis* en timo, bazo, nódulos linfáticos traqueobronquial, retrofaríngeo, mediastínico, pulmón, hígado y lavados bronquioalveolares se presentan de forma sintetizada en la Tabla 5.

PRL-R

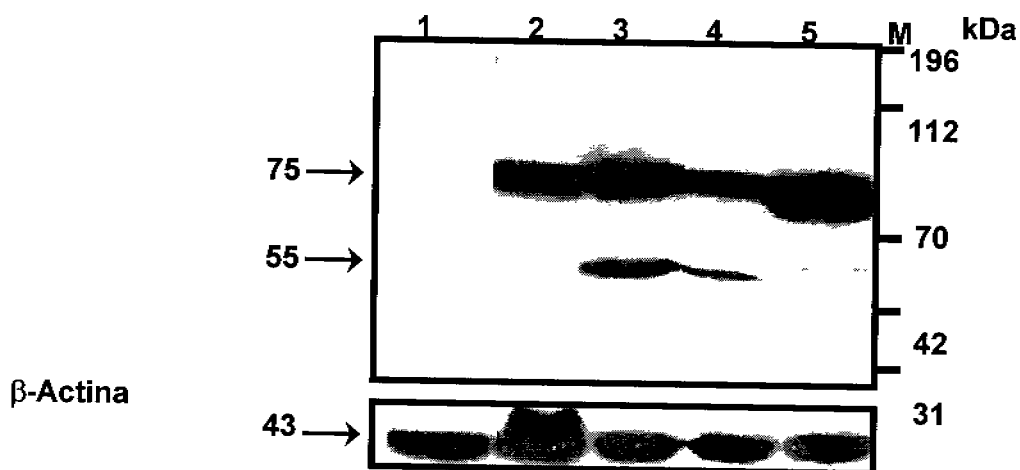


Figura 13. Expresión del PRL-R en células de LBA de bovinos infectados natural y experimentalmente con *M. bovis*. Línea 1 LBA de bovino libre de TBB, línea 2 y 3 LBA de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, línea 4 y 5 LBA de bovinos infectados de manera natural con *M. bovis*. Expresión de β- actina usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 31-196 (kDa).

Tabla 5. Isoformas del PRL-R en diferentes tejidos y LBA de bovinos infectados con *M. bovis*

| NL Rf | NL M | NL Tb | Tm | Bz | Hg | PI | LBA |
|-------|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | - | - | - |
| - | - | - | 55 | 55 | - | 55 | 55 |
| 65 | 65 | 65 | - | - | - | - | - |
| 75 | 75 | 75 | 75 | 75 | - | 75 | 75 |
| 80 | | | - | - | - | - | - |
| - | | | 90 | 90 | 90 | - | - |
| 93 | | | - | - | 100 | - | - |
| | | | 110 | 110 | | - | - |
| | | | 120 | 120 | | - | - |
| | | | | | | 140 | - |

NL Rf=Nódulo linfático retrofaríngeo, NL M=Nódulo linfático mediastínico, NL Tb=Nódulo linfático traqueobronquial, Tm=Timo, Bz=Bazo, Hg=Hígado, PI=Pulmón y LBA=Lavados bronquioalveolares.

6.4 Expresión de IL-12 en tejidos y LBA de bovinos infectados con *M. bovis*

La expresión de IL-12 en órganos linfoides, hígado, pulmón y LBA de bovinos infectados natural y experimentalmente con *M. bovis* se realizó por la técnica de *Western blot*. Este estudio permitió identificar la expresión de proteínas con peso similar a la subunidad IL-12p35, IL-12p40, heterodímeros (IL-12p70) y homodímeros IL-12(p40)₂ en órganos internos y linfoides de bovinos con TBB (Figura 14, A línea 1-6). En células de LBA de bovinos infectados con *M. bovis* sólo se observó la expresión de homodímeros (IL12 p40₂) (Figura 14, A línea 7 y 8). En muestras de tejidos o de LBA de bovinos libres de TBB no se observó la expresión de ninguna subunidad de IL-12 (Figura 14, B línea 9-16).

IL-12

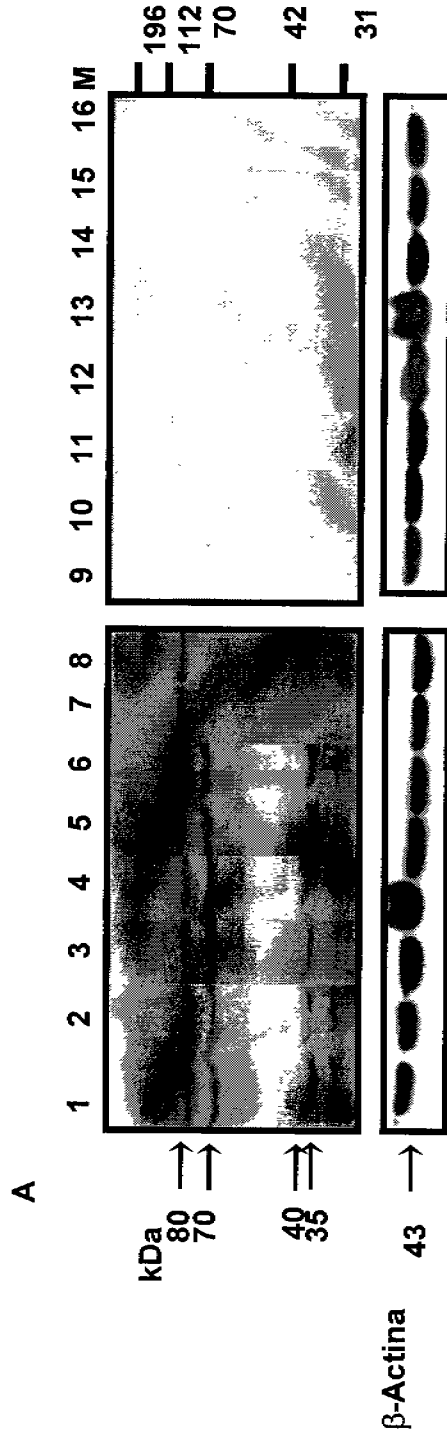


Figura 14. Expresión de IL-12 en tejidos y lavados bronquioalveolares de bovinos con TBB y sanos. **A)** (Línea 1-8) corresponden a proteínas totales de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*. **B)** (Línea 9-16) proteínas de bovinos sanos. Línea 1 y 9 pulmón, 2 y 10 hígado, 3 y 11 bazo, 4 y 12 timo, 5 y 13 nódulo linfático traqueobronquial, 6 y 14 mediastínico. La línea 7 y 8 células LBA de bovinos con TB, 15 y 16 células de LBA de bovinos sanos. La expresión de β -actina fue usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 31-196 (kDa).

6.5 RT-PCR para el PRL-R utilizando RNA total de tejidos y LBA de bovinos infectados con *M. bovis* y sanos

En las mismas muestras de bovinos infectados con *M. bovis* y sanos analizamos la expresión transcripcional de PRL-R a nivel de RNA por RT-PCR. El RNA total se aisló por la técnica de trizol y la integridad fue evaluada en geles de agarosa al 1% en TBE 1X con 2% de formaldehído al 37 % (Figura 15). En esta figura podemos apreciar las dos subunidades ribosomales 28s y 18s que nos indican una integridad apta para la síntesis de DNAc.

La expresión del PRL-R en muestras de órganos internos y linfoides de bovinos infectados natural y experimentalmente con *M. bovis* se analizó usando el método de RT-PCR. En todas las muestras de tejido de bovinos infectados con *M. bovis* se pudo observar la expresión de RNA detectando 2 transcritos del PRL-R, con tamaños de entre 302 pb y otro de 290 pb (Figura 16, A). En las muestras de bovinos libres de TBB no observamos expresión de RNA del PRL-R (Figura 16, B).

La expresión del PRL-R en células obtenidas de LBA de bovinos infectados con *M. bovis* se determinó por RT-PCR. El análisis con RNA en las células de LBA permitió observar la expresión de 2 transcritos del PRL-R con tamaños de entre 302 pb y 290 pb (Figura 17, línea 3 y 4). Sin embargo, en células de LBA de los bovinos libres de TB observamos bandas de distinto tamaño (Figura 17, línea 1 y 2), de entre 200 y 220 pb.

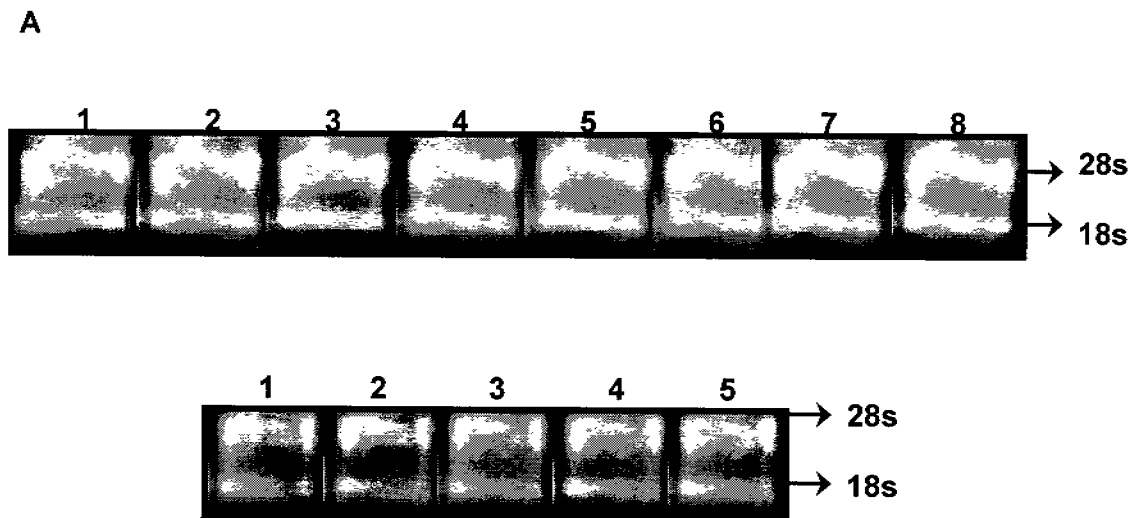


Figura 15. Integridad del RNA en tejidos y LBA de bovinos infectados con *M. bovis*. **Panel A)** Línea 1 y 2 timo, 3 y 4 hígado, 5 y 6 bazo, 7 y 8 pulmón. Los carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a muestras de bovinos infectados con *M. bovis*, los carriles 2, 4, 6 y 8 a bovinos libres TB. **Panel B)** Se muestra el RNA de LBA de bovinos infectados con *M. bovis* (1-4) y línea 5 corresponde a LBA de bovino libre de TB.

PRL-R

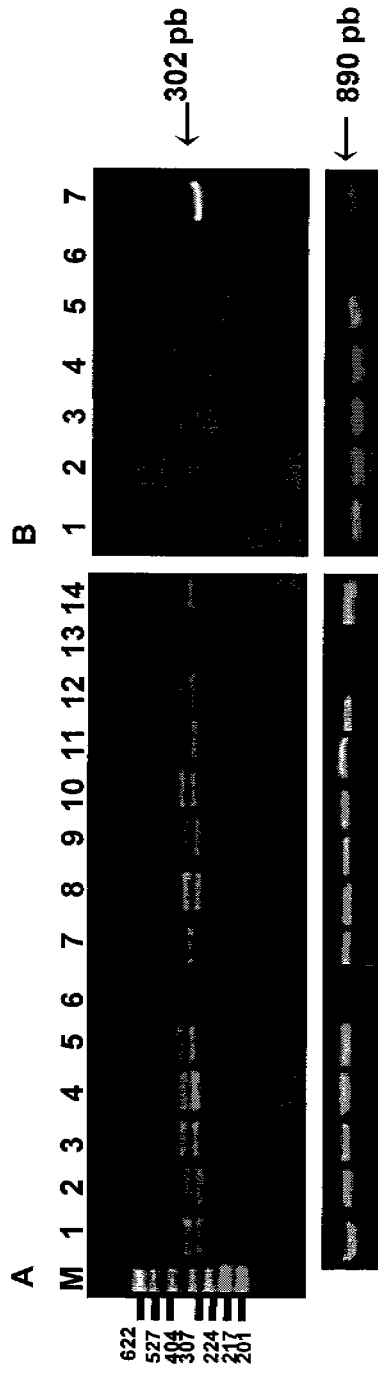
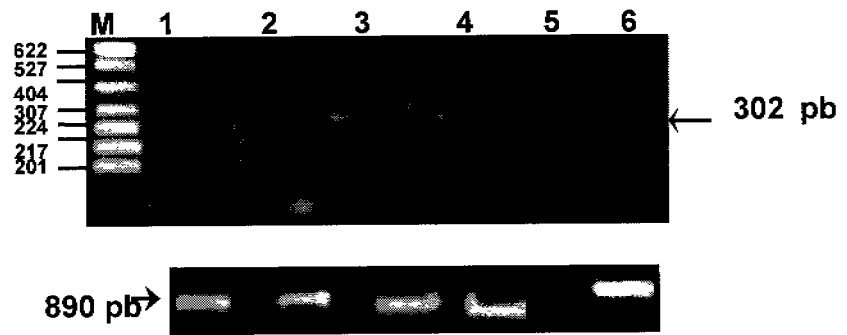


Figura 16. Expresión del PRL-R en células de tejidos de bovinos infectados con *M. bovis* por RT-PCR. **Panel A)** Línea 1 y 8 pulmón, 2 y 9 hígado, 3 y 10 bazo, 4 y 11 timo, 5 y 12 nódulo linfático traqueobronquial de bovinos infectados con *M. bovis*, 6 y 13 control negativo (H₂O), 7 y 14 control positivo. **Panel B)** Línea 1 pulmón, 2 hígado, 3 bazo, 4 timo, 5 nódulo linfático traqueobronquial de bovinos libres TB, 6 control negativo (H₂O) y 7 DNA de bazo control positivo. La expresión de β-actina fue usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 201-622 (pb).

PRL-R



β-Actina

Figura 17. Expresión del PRL-R en células de LBA de bovinos infectados con *M. bovis* y libres de TB por RT-PCR. Línea 1 y 2 LBA de animales sanos, 3 y 4 LBA de bovinos infectados con *M. bovis*, línea 5 control negativo (H₂O) y 6 DNA de bazo control positivo. La expresión de β-actina fue usada como control. El carril M corresponde al marcador de peso molecular que es de 201-622 (pb).

6.5.1 Gen del PRL-R bovino empleado en el análisis de RT-PCR

Los *primers* utilizados para el análisis de la expresión del PRL-R por medio de la técnica de RT-PCR se diseñaron a partir de la secuencia completa del gen de la isoforma larga del PRL-R del bovino, la cual se obtuvo del GenBank (L02549) Figura 18.

1 CGGGCAAATG CTGAGGATAC TTTCCAAGTG AACCTGAGT GAACCTCTAA TATATTTATT
GCCCGTTTAC GACTCCTATG AAAGGTTTAC TTGGGACTCA CTTGGAGATT ATATAAATAA
61 TCCTGTGGAA AGAGGAAGGA GCCAACATGA AGGAAAATGC AGCATAGTACA GTGGTTTTCA
AGGACACCTT TCTCCTTCC TCGTTGTACT TCCTTTTACG CACCAAAAAGT
121 TTTTGCTACT TTTTCTCAGT GTCAGCCTTC TGAATGGACA GTCACCTCCT GAAAAACCCA
AAAACGATGA AAAAGAGTCA CAGTCGGAAG ACTTACCTGT CAGTGGAGGA CTTTTTGGGT
181 AGCTCGTTAA ATGTCGGTCT CCTGGAAAGG AAACATTCAC CTGCTGGTGG GAGCCTGGGG
TCGAGCAATT TACAGCCAGA GGACCTTTCC TTTGTAAGTG GACGACCACC CTCGGACCCC
241 CAGATGGAGG ACTTCCCTACC AATTACACGC TGACTTACCA CAAGGAAGGA GAAACACTCA
GTCTACCTCC TGAAGGATGG TTAATGTGCG ACTGAATGGT GTTCCCTCCT CTTTGTGAGT
301 TCCATGAATG TCCAGACTAC AAAACCGGGG GCCCCAACCTC CTGCTACTTT AGCAAGAAGC
AGGTACTTAC AGGTCTGATG TTTTGGCCCA CGGGGTGAG GACCATGAAA TCGTCTTTCG
361 ACACCTCCAT ATGGAAGATG TACGTCATCA CAGTAAACGC CATCAACCAG ATGGGAATCA
TGTGGAGGTA TACCTTCTAC ATGCAGTAGT GTCATTTGCG GTAGTTGGTC TACCCTTAGT
421 GTTCCCTCGGA TCCACTTTAT GTGCACGTGA CTTACATAGT TGAACCAGAG CCTCCTGCAA
CAAGGAGCCT AGGTGAAATA CACGTGCACT GAATGTATCA ACTTGGTCTC GGAGGACGTT
481 ACCTGACTTT GGAATTAATA CATCCAGAAG ATAGAAAACC ATATCTATGG ATAAAATGGT
TGGACTGAAA CCTTAATTTT GTAGGTCTTC TATCTTTGG TATAGATACC TATTTTACCA
541 CTCCACCCAC CATGACTGAT GTAAAATCTG GTTGGTTCAT TATCCAGTAC GAAATTCGAT
GAGGTGGGTG GTACTGACTA CATTTTAGAC CAACCAAGTA ATAGGTCTAG CTTAAGCTA
601 TAAAACCTGA GAAAGCAACT GATTGGGAGA CTCATTTTAC TCTGAAGCAA ACTCAGCTTA
ATTTTGGACT CTTTCTGTTGA CTAACCTCT GAGTAAAATG AGACTTCGTT TGAGTCGAAT
661 AGATTTTCAA CTTATATCCA GGACAAAAAT ACCTTGTGCA GATTCGCTGC AAGCCAGACC
TCTAAAAGTT GAATATAGGT CCTGTTTTTA TGGAACACGT CTAAGCGACG TTCGGTCTGG
721 ATGGATACTG GAGTGAGTGG AGC-CCAGAGA GCTCCATCCA GATACCTAAT GACTTCCCAG
TACCTATGAC CTCACTCACC TCGGGTCTCT CGAGGTAGGT CTATGGATTA CTGAAGGGTC
781 TGAAGGACAC AAGCATGTGG ATCTTTGTGG CCATCCTTC TGCTGTCATC TGTTTGATTA
ACTTCTGTG TTCGTACACC TAGAAACACC GGTAGGAAAG ACGACAGTAG ACAAATAAT
841 TGGTCTGGGC AGTGGCTTTG AAGGGCTATA GCATGGTGAC CTGCATCCTC CCACCAGTTC
ACCAGACCCG TCACCGAAAC TTCCCATAT CGTACCCTG GACGTAGGAG GGTGGTCAAG
901 CAGGGCCAAA AATAAAAGGA TTTGATGTT ATCTGCTGGA GAAGGGCAAG TCCGAAGAAC
GTCCCGGTTT TTATTTTCCCT AAACCTACAAG TAGACGACCT CTTCCCGTTC AGGCTTCTTG
961 TTCTGCGAGC TCTGGAAGC CAAGACTTCC CCCCCTCTC TGACTGCGAG GACTGCTGA
AAGACGCTCG AGACCTTTCG GTTCTGAAG GGG-GGTGAAG ACTGACGCTC CTGAACGACT
1021 TGGAGTTCAT AGAGGTAGAT GACTGTGAG ACCAGCAGCT GATGCCACGC CCTCCAAAG
ACCTACAAGTA TCTCCATCTA CTGACACTCC TGGTCTGCG CTACGGTTCG GGGAGTTTC
1081 AACACACGGA GCAAGGCGTG AAGCCCATGC ACCTGGATCT TGACAGTGAC TCTGGCCGGG
TTGTGTGCT CGTTCCGCAC TTCGGGTACG TGGACCTAGA ACTGTCACTG AGACCGGCCC
1141 GCAGCTGCGA CAGCCCTTCG CTCTTGTCTG AAAAGTGTGA TGAACCTCAG GCCCATCCCT
CGTCGACGCT GTCGGGAAGC GAGAACAGAC TTTTCACACT ACTTGGAGTC CGGGTAGGGA
1201 CCAAGTTCCA TACTCCCAG GGCCCTGAGA AGCTGGAGAA TCCGGAAACA AACCTTACAT
GGTTCAAGGT ATGAGGGCTC CCGGGACTCT TCGACCTCTT AGGCCTTTGT TTGGAATGTA
1261 GTCTCCAGGC CCCTCAGAGC ACAAGCGTGG AAGGCAAAAT CCCCTATTTT CTGGCCAATG
CAGAGGTCCG GGGAGTCTCG TGTTTCGACC TTCCGTTTTA GGGGATAAAA SACCAGTTAC
1321 GACCCAAATC TTCCACATGG CCTTCCCAG AGCCCCACG CCTATACAG CCCAGATAT
CTGGGTTTAG AAGGTGTACC GGAAGGGCG TCGGGGGGTC GGATATGTCG GGGTCTATAA
1381 CTTACCACAA CATTGCTGAC GTGTGTGAGC TGGCCCTGGG CATGGCCGGC ACCACAGCCA
GAATGGTGT GTAACGACTG CACACACTCG ACCGGGACCC GTACCGCCG TGGTGTCCGT
1441 CTTCGCTGGA CCAAACAGAC CAACATGCTT TAAAAGCCTC AAAAACCATT GAACTGGCA
GAAGCGACCT GGTGTGTCTG GTTGTACGAA ATTTTCCGGAG TTTTGGTAA CTTTGACCGT
1501 GGAAGGAAA GGCAACCAAG CAGAGGGAGT CAGAAGGCTG CAGTTCCAAG CCTGACCAAG
CCCTTCCCTT CCGTTGGTTC GTCTCCCTCA GTCTCCGAC GTCAAGGTTT GACTGGTTC
1561 ACACGGTGTG GCCACGACCC CAAGACAAA CCCCCTGAT CTCTGTAA CCCTGGAAAT
TGTGCCACAC CGGTGCTGGG GTTCTGTTTT GGGGGAACATA GAGACGATTT GGAACCTTA
1621 ACGTGGAGAT CCACAAGGTC AGCCAAGATG GAGTGTGGC TCTGTTCCCA AAACAAAACG
TGCACCTCTA GGTGTCCAG TCGGTTCTAC CTCACGACCG AGACAAGGGT TTTGTTTTGC

```

1681 AGAAGTTTGG CGCCCTGAA GCCAGCAAGG AGTACTCAA GGTGTCCCGG GTGACAGATA
TCTTCAAACC GCGGGGACTT CGGTCGTTCC TCATGAGTTT CCACAGGGCC CACTGTCTAT
1741 GCAACATCCT GGTATTGGTG CCGGATCCGC AAGCGCAAAA CCTGACTCTG TTAGAAGAAC
CGTTGTAGGA CCATAACCAC GGCCTAGGCG TTCGCGTTTT GGACTGAGAC AATCTTCTTG
1801 CAGCCAAGAA GGCCCCGCA GCCCTGCCAT AGAATCCAGC CAAGGCCGAC CTGGCTATCT
GTCGGTTCTT CCGGGGCGGT CGGGACGGTA TCTTAGGTCG GTTCCGGCTG GACCGATAGA
1861 CCCCCACAAC CCCAGGCAAC TGCAGACTCC AGTTGGGCTG GGGACTGGGT CCCGCAGGTT
GGGGGTGTTG GGGTCCGTTG ACGTCTGAGG TCAACCCGAC CCCTGACCCA GGGCGTCCAA
1921 TTATGCACTC TTGCAGTGAG AGTTATGGAA GGATGGGTTT AATGTGATT TTCCTCAGG
AATACGTGAG AACGTCACTC TCAATACCTT CCTACCCAAG TTAACACTAA AAGGAAGTCC
1981 GAACACTACA GAGTACGTGA AATGCACTCT ACCAGAGAGG GCTCAAGAAC AGGGTTAGAA
CTTGTGATGT CTCATGCACT TTACGTGAGA TGGTCTCTCC CGAGTTCTTG TCCCAATCTT
2041 TGACACTACC CAACTCCCAG TTCACTCTTA ATTCTCTATT TTCAACCAGT TGCCCTCTTG
ACTGTGATGG GTTGAGGGTC AAGTGAGAAT TAAGAGATAA AAGTTGGTCA ACGGAGAAAC
2101 TCCAACAGCT GATTCCAGAA CAAATCGTTC CATCTTGTGT GATTTGTAGA TTTACTTTTT
AGGTTGTCTGA CTAAGGTCTT GTTAGCAAG GTAGAACACA CTAAACATCT AAATGAAAAA
2161 TGCTATTAGT TGTCAGATTA TATGTTCAA GATATAAAAG CACATTGCCT AGTATTCTTA
ACGATAATCA ACAGTCTAAT ATACAAGTTT CTATATTTTC GTGTAACGGA TCATAAGAAT
2221 AGAGACAGTG CCAATAGGTA TATAATCTGG AAAAGGCCTT CATGGTTTCG TATGTGACAG
TCTCTGTCAC GGTTATCCAT ATATTAGACC TTTTCCGGAA GTACCAAAGC ATACACTGTC
2281 AGGGGTATAA GTCAGTCAA ATTGTTTACC ATGGGAAGAT GGTAGATAGG AGAGAAATGC
TCCCCATATT CAGTCAGTTT TAACAAATGG TACCCTTCTA CCATCTATCC TCTCTTTACG
2341 CATGAAAACC ACTTTGAAGA CCAGTTGCTT AACCTTTGCA CTCCTCTTT
GTACTTTTGG TGAAACTTCT GGTCAACGAA TTGGAAACGT GAGGAGAAA

```

Figura 18. Gen de la isoforma larga del PRL-R de bovino. El gen del PRL-R está compuesto por 2389 pb. Los *primers* utilizados para el análisis por RT-PCR hibridan con la región comprendida entre 744 a 1018 pb, recuadro amarillo.

7. Discusión

Las diversas funciones fisiológicas de la PRL son mediadas por la interacción con su receptor, el cual se expresa en muchos tipos celulares. Estudios previos a PRL, le atribuyen diversas funciones en el desarrollo de inmunidad (Goffin y Kelly, 1997). Por otra parte, la IL-12 es una citocina que juega una función importante en la polarización de una respuesta inmune mediada por células ante la infección de patógenos intracelulares (Cooper y col., 1997). Hasta el momento no hay estudios que demuestren el estado de estas proteínas en una infección natural por *M. bovis* y la evaluación de la expresión de estas proteínas que puedan ayudarnos a entender más sobre la patogénesis de la tuberculosis bovina. En este trabajo se caracterizó la expresión del PRL-R e IL-12, en la infección por *M. bovis* en vacas lecheras.

En primer término se confirmó la expresión del PRL-R en tejidos linfoides (nódulos linfáticos retrofaríngeo, mediastínico, traqueobronquial, timo y bazo), tejidos internos (hígado y pulmón) y LBA de bovinos infectados con *M. bovis* por *Western blot* y RT-PCR. En timo y bazo se detectaron seis proteínas con peso similar al de las diferentes isoformas de la proteína del PRL-R, tres asociadas a la isoforma larga 90, 110 y 120 kDa, una intermedia de 75 kDa y dos cortas de 55 y 40 kDa, cuatro de ellas (120, 110, 75 y 55 kDa) coinciden con las reportadas en timo y bazo provenientes de vacas en diferentes periodos de gestación, sugiriendo que la expresión del PRL-R puede ser heterogénea en órganos del sistema inmune (Schuler y col., 1997). Otros estudios en vaca y oveja reportan la expresión de dos isoformas del PRL-R, una larga de más de 100 kDa y una corta de 55 kDa truncada en el dominio citoplasmático (Bignon y col., 1997; Shirota y col., 1990; Linzer y Davis, 1989; Anthony y col., 1995). Sin embargo, las proteínas de 90 y 40 kDa observadas en este estudio al parecer no han sido reportadas en tejidos bovinos, aunque en tejido mamario y próstata de pacientes humanos se han identificado isoformas muy similares del PRL-R incluyendo una larga de 80-90 kDa, una corta de 42 kDa y una intermedia de 65 kDa, debido a ajuste alternativo

del gen (Goffin y col., 1999). Sin embargo, las numerosas diferencias en el tamaño aparente de la proteína se han atribuido, además del ajuste alternativo, a la N-glicosilación en diversos grados y ha cambios postraduccionales como la fosforilación y la ubiquitinación (Strous y col., 1996).

Por lo tanto, la expresión de diferentes proteínas del PRL-R observadas en este trabajo permite sugerir que la expresión del PRL-R en células de timo y bazo de vacas infectadas con *M. bovis* es heterogénea y que la existencia de diferentes isoformas del PRL-R puede ser consecuencia del estado patológico de la vaca que implique la presencia de una u otra forma que responda a las necesidades fisiológicas del medio en un determinado momento, ya que en los mismos tejidos provenientes de vacas sanas se observó la ausencia de la expresión del PRL-R.

En todos los tejidos analizados de vacas con TBB, excepto en hígado, detectamos una isoforma intermedia de 75 kDa muy común. Sin embargo, en aquellos nódulos linfáticos analizados (traqueobronquial, retrofaríngeo y mediastínico) con lesiones se identificaron isoformas del PRL-R de 65 y 40 kDa, al parecer no existen reportes previos de la expresión de PRL-R en nódulos linfáticos. La expresión de diferentes proteínas similares a las isoformas del PRL-R en tejido dañado refuerza la hipótesis que la variabilidad de la expresión del PRL-R puede ser consecuencia del estado patológico de las vacas, lo que determinaría diferentes respuestas fisiológicas en los diversos tejidos, ya que la isoforma larga y corta del PRL-R inducen diferentes vías de señalización que podrían estar estimulando la expresión de genes encargados de mantener la homeostasis del sistema inmune frente a una infección causada por *M. bovis* en vacas lecheras. De esta manera la expresión de diferentes isoformas del PRL-R en tejido dañado se podría relacionar con lo reportado en tejidos humanos de pacientes con fibrosis y cirrosis, en los cuales hepatocitos y células epiteliales de conductos biliares expresan una acumulación del PRL-R, contrario a los pacientes sanos donde se observa una expresión y distribución uniforme del PRL-R. Estos resultados muestran que la interacción de PRL y su receptor puede tener una función

metabólica en hígado sano y ser un factor regenerador de tejidos en cirrosis, ya que el RNAm del PRL-R se sobreexpresa comparado con los hígados sanos (Simon-Holtorf y col., 2006, Kloehn y col., 2001).

En hígado proveniente de vacas infectadas con *M. bovis* se observó la expresión de diferentes isoformas del PRL-R (90 y 100 kDa), siendo de menor tamaño a las reportadas en hígado proveniente de vacas en diferentes periodos de gestación donde se observó la expresión de isoformas de 110 y 120 kDa (Schuler y col., 1997). Estos resultados muestran que la variabilidad de las isoformas del PRL-R también puede ser consecuencia del estado fisiológico de la vaca. Así mismo, no se descarta que la variabilidad sea consecuencia del estado patológico inducido por *M. bovis* ya que en vacas sanas se observó la ausencia del PRL-R.

En pulmón se observó la expresión de diferentes proteínas similares a las isoformas del PRL-R (55, 75 y 140 kDa), dos de ellas la 55 y 75 kDa también fueron identificadas en células provenientes de LBA de los mismos animales. En pulmón y LBA al parecer no existen reportes previos de la expresión del PRL-R en bovinos. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo donde se utilizaron dos modelos de infección por *M. bovis*, la infección natural y una experimental, permite sugerir que la expresión de diferentes isoformas de PRL-R es inducida por la infección de *M. bovis* ya que en ambos casos se detectaron las mismas proteínas del PRL-R en los diferentes tejidos analizados, incluyendo LBA. En contraste a lo observado en tejidos provenientes de vacas libres de TBB donde se observa la ausencia del PRL-R.

El análisis de los transcritos mediante RT-PCR en muestras de RNA total obtenido de los diferentes tejidos de las vacas infectadas con *M. bovis* de manera natural y experimentalmente permitió observar la expresión de dos isoformas del PRL-R con tamaños de 302 y 290 pb, contrario a lo observado en los tejidos de las vacas sanas donde se observó la ausencia del PRL-R. Esto nos permite suponer que con los *primers* utilizados se pueden detectar 2 isoformas del PRL-R que regularían a nivel transcripcional. Sin embargo, las proteínas, una vez sintetizadas,

pueden ser modificadas por la unión de otras moléculas, de manera estable o inestable, que permiten obtener proteínas de actividad biológica muy diversa partiendo de un mismo gen. Con base en esto se puede especular que la variabilidad de isoformas del PRL-R en tejidos de vacas infectadas con *M. bovis* puede contribuir a modular la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune.

Por lo tanto, el PRL-R en vacas lecheras podría tener una función muy importante en la modulación de la respuesta inmune contra *M. bovis* a través de la vía de las JAK-Stat1, que se asocia con la estimulación de la expresión de genes que favorecen la respuesta inmune, como el factor transcripcional de respuesta al IFN- γ (IRF-1) cuya función es mediar la activación de la expresión de genes blanco tales como IFN- γ , iNOS y NRAMP1, determinantes en la actividad antibacteriana contra *M. bovis* (Taniguchi y col., 2001). Sin embargo, las funciones de PRL y su receptor también están asociadas a la vía JAK-Stat5, la cual determina la supresión transcripcional de IRF-1, con lo cual coadyuvaría a mantener la homeostasis del sistema inmune frente a una respuesta de tipo TH1 (Ramana y col., 2000). Por lo tanto, la caracterización del PRL-R en los diferentes tejidos provenientes de vacas con TBB puede ayudar a entender mejor la fisiopatología de la tuberculosis en vacas lecheras, las cuales se encuentran en producción 305 días del año donde los niveles de PRL son altos debido a su requerimiento en la producción de láctea.

La relación entre PRL y el sistema inmunológico ha sido estudiada en la última década abriendo nuevos horizontes en el campo de la neuroinmunología. El modelo más estudiado es el murino, en el se ha documentado el papel de PRL y su receptor en la inmunomodulación (Bignon y col., 1999, Berlanga y col., 1997, Chang y Clevenger 1996). Estudios *in vivo* con ratones inoculados con LPS muestran expresión diferencial del RNAm del PRL-R, en timo y bazo se mantiene e incrementa, mientras que en hígado y pulmón disminuyen dramáticamente después de la estimulación, demostrando una regulación tejido específica

(Corbacho, 2004). Al parecer este efecto se asocia con la activación de una vía de señalización específica de PRL en los órganos del sistema inmune, y su inhibición en la mayoría de los otros tejidos. Por lo tanto, no podemos descartar que este efecto pueda estar pasando en vacas con TBB ya que hay una sobreexpresión del PRL-R en tejidos linfoides comparado con animales sanos.

En otros estudios, se demuestra que ratones tratados con bromocriptina para inhibir la secreción de PRL, mostraron incapacidad de montar una respuesta inmune contra *L. monocitogenes*. El tratamiento con PRL exógena en estos ratones revirtió el efecto, reduciendo el número de ratones muertos por este patógeno. Estudios *in vitro* de la proliferación de linfocitos de bazo de los ratones tratados con bromocriptina también estaba disminuída y la administración de prolactina revirtió el efecto (Bernton y col., 1988).

En otro estudio, se muestran que ratones tratados con dopamina y glucocorticoides muestran inhibición en la respuesta inmune, después del desafío con *L. monocitogenes* y *M. bovis*, incluyendo: disminución en la activación de macrófagos, producción de anticuerpos primarios y como resultado deficiencias en el mecanismo de hipersensibilidad retardada. La adición de PRL exógena revirtió el efecto inhibitorio (Bernton y col., 1992, Cincotta y col., 1995). Un trabajo realizado *in vitro*, con macrófagos peritoneales de ratones BALB/C incubados con concentraciones altas de PRL, demuestra que la PRL estimula la función fagocítica, confirmando el papel inmunomodulatorio de esta hormona (Ortega y col., 1996). También se ha documentado que la PRL regula, la expresión de IL-6 e IL-3 en microglia infectada con *T. gondii*, induciendo la muerte intracelular del parásito (Benedetto y col., 2001). Así mismo, estudios más recientes muestran que citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) inducen la expresión del PRL-R en fibroblastos pulmonares de ratón, inhibiendo la síntesis de óxido nítrico a través de la vía Jak-Stat5b (Corbacho, 2003). Estos datos sugieren que PRL y su receptor en el pulmón regulan la síntesis de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), enzima que cataliza la producción del óxido nítrico, que a su vez, media

efectos bactericidas de la respuesta inmunológica y la inflamación (Dogusan y col., 2001). La PRL también estimula la síntesis de la IL-2 y de su receptor en esplenocitos y timocitos (Mukherjee y col., 1990; Visell y col., 1991), además de colaborar en las acciones de la IL-2 e IL-12 estimulando la síntesis de IFN- γ en los linfocitos T y en las células NK (Matera y Mori, 2000). Con base en los resultados obtenidos en ratones desafiados con diferentes patógenos intracelulares se intuye que la prolactina y su receptor pueden ser claves en la modulación de los eventos inmunológicos en una infección causada por *M. bovis* en vacas lecheras. Sin embargo, las propiedades inmunológicas atribuidas a la PRL y su receptor son también controversiales, ya que no siempre han sido consistentes. En algunos modelos "knockout" a la PRL o su receptor se ha observado que la funcionalidad de las células inmunológicas no está alterada en presencia de estímulos mitogénicos *in vitro*. Este comportamiento se puede explicar por la redundancia funcional que tienen las citocinas, ya que las acciones redundantes de la PRL pueden ser sustituidas por otras citocinas, sin ser afectadas por la ausencia de esta molécula o de su receptor. Sin embargo, se ha documentado que la PRL tiene una función determinante en la inmunomodulación ya que previene la apoptosis inducida por el óxido nítrico y la dexametasona en la línea celular Nb2 y modula de manera negativa la expresión de genes implicados en la apoptosis (bax y bcl-2), así como la activación de la caspasa-3 (Tessier y col., 2001; Fernández y col., 2003; Buckley y Buckley, 2000; Peirce y Chen, 2004). Además, promueve la expresión de genes implicados en proliferación celular (IRF-1, ciclina B y H3).

Por lo tanto, PRL y su receptor también se han involucrado en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. En cáncer de mama se han identificado seis isoformas diferentes del PRL-R, a diferencia del tejido normal (Clevenger, 2003). La isoforma larga del PRL-R se expresa en mayor proporción en carcinoma mamario, y al parecer se asocia con la progresión del tumor (Jianping y col., 2004). En carcinomas de tiroides también se observa una sobreexpresión del PRL-R (Costa y col., 2006). En contraste, en la patogénesis de enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso y artritis reumatoide) parece que juega un papel

determinante, ya que concentraciones elevadas de esta hormona predisponen a la enfermedad (Ellie y Mark, 2007; Matera y col., 2001; De Bellis y col., 2005). Por lo tanto, la versatilidad de prolactina y su receptor en diversos modelos inmunopatológicos podría ayudarnos a entender el papel de la sobreexpresión de su receptor en una infección causada por *M. bovis*, lo cual nos permitiría explorar nuevas hipótesis en el campo de la inmunoendocrinología, que puedan ayudarnos a establecer un mejor control de esta importante y muy antigua zoonosis.

Por otra parte, en el presente trabajo también se evaluó la expresión de IL-12 en ambos modelos de infección con *M. bovis*, en vacas lecheras al parecer no existen estudios previos que determinen la participación de IL-12 en el control de la tuberculosis bovina. En modelo murino la expresión de IL-12 es crucial en la defensa del huésped ante la micobacteria (Cooper y col., 1997). Ratones *knockout* al gen *IL-12p35^{-/-}p40^{-/-}* mostraron ser susceptibles a micobacteriosis, desarrollando una infección crónica al ser desafiados por *M. bovis* BCG y 100% de mortalidad después de ser desafiados con *M. tuberculosis*, la muerte de los animales fue atribuida a la incapacidad de producir IFN- γ y TNF- α , así como la subsecuente ausencia de activación de macrófagos, apreciándose una evidente reducción del RNAm de la iNOS (Christoph y col., 2001). La terapia *in vivo* con el homodímero de IL-12p(40)₂ restauró la respuesta inmunológica ante *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* (Christoph y col., 2001; Ordway y col., 2005, Ordway y col., 2006).

Otros estudios *in vitro* demuestran que, al infectar macrófagos de ratón con *M. tuberculosis* se estimula la producción de IL-12 y TNF- α favoreciendo la respuesta inmune contra el patógeno (Cachón-Salinas y col., 2005; Endsley y col., 2006). En este trabajo se demuestra una alta expresión de IL-12p35 e IL-12p40, así como de heterodímeros de 70 kDa y de homodímeros de 80 kDa en tejidos linfoides e internos de vacas lecheras infectadas natural y experimentalmente con *M. bovis*. En contraste, en LBA sólo se identificaron homodímeros IL-12p(40)₂ al observar únicamente una banda de 80 kDa. Este resultado lo podemos asociar con lo descrito en un modelo de tuberculosis pulmonar en ratón, donde el

homodímero IL-12p(40)₂, regula la actividad funcional de la subunidad IL-12p40 en una infección por *M. tuberculosis* (Leemans, 2005). Por lo tanto, la expresión elevada del homodímero de IL-12p(40)₂ en granulomas pulmonares reduce el reclutamiento celular de macrófagos y neutrófilos, sugiriendo que la concentración elevada del homodímero, reduce los efectos quimiotácticos de la IL-12p40. Esto demuestra su participación en la modulación de la respuesta inflamatoria restableciendo la homeostasis en los pulmones después de la infección por *M. tuberculosis*. Sin embargo, en consecuencia permite un ligero aumento de la carga bacteriana (Leemans y col., 2005). En base a los resultados obtenidos se puede sugerir que la expresión de IL-12 en tejidos provenientes de vacas con *M. bovis* juega un importante papel en la modulación de la respuesta inmune frente a la micobacteria.

8. CONCLUSIONES

La infección por *M. bovis* induce una sobreexpresión del PRL-R e IL-12 en células de timo, bazo, nódulos linfáticos traqueobronquial, retrofaríngeo, mediastínico, pulmón e hígado de vacas infectadas experimentalmente o naturalmente, comparado con las vacas sanas.

En tejido linfoide de timo y bazo se detectaron seis proteínas similares a las isoformas del PRL-R, cuatro de ellas asociadas a la forma larga y dos a la forma corta. Sin embargo, en nódulos linfáticos que no presentaron lesión se observó una proteína de 75 Kda del PRL-R, mientras que en aquellos que presentaban lesión se detectaron diferentes proteínas del PRL-R.

En tejido pulmonar se detectaron tres proteínas asociadas con las isoformas del PRL-R, dos de ellas coincidieron con las observadas en lavados bronquioalveolares, mientras que en hígado sólo se detectaron dos proteínas asociadas a la isoforma larga del PRL-R.

En los diferentes tejidos analizados se observó la expresión de la subunidad IL - 12p35, IL-12p40, homodímeros y heterodímeros de IL-12. Sin embargo, en células obtenidas de LBA sólo se detectaron homodímeros de esta citocina.

A nivel RNA en los diferentes tejidos provenientes de las vacas infectadas con *M. bovis* se observó la expresión de dos transcritos del PRL-R con tamaños de entre 302 y 290 pb, contrario a las vacas control.

Con base en los resultados obtenidos se sugiere que la expresión de PRL-R e IL-12 pueden estar implicadas en la defensa del huésped contra *M. bovis*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Anthony RV, Smith GW, Duong A, Pratt SL, Smith MF. 1995. Two forms of the prolactin receptor messenger ribonucleic acid are present in ovine fetal liver and adult ovary. *Endocrine*. 3:291–295.
- 2.- Balandrano CS, Anzaldo FG, Peña FGP, Betancurt MX. 1996. Tuberculosis. 1996. *Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR*. 2:15.
- 3.- Benedetto N, Folgore A, Romano Carratelli C, Galdiero F. 2001. Effects of cytokines and prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in murine microglia. *Eur Cytokine Netw*. 2001. 12(2):348-58.
- 4.- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrahypophysial prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*. 17:639-669.
- 5.- Berczi L, Nagy E, Kovacs K, Horvath E. 1981. Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. *Acta Endocrinológica*. 98(4):506-513.
- 6.- Berlanga JJ, Garcia-Ruiz JP, Perrot-Appianat M, Kelly PA, and Ederly M. 1997. The short form of the prolactin (PRL) receptor silences PRL induction of the beta-casein gene promoter. *Mol Endocrinol* 11:1449–1457.
- 7.- Bernton E, Bryant H, Holaday J, Dave J. 1992. Prolactin and prolactin secretagogues reverse immunosuppression in mice treated with cysteamine, glucocorticoids, or cyclosporin-A. *Brain Behav Immun*. 6(4):394-408.
- 8.- Berton, E.W., Meltzer, M.S., Holaday, J.W. 1988. Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science*. 239(48-38):401-404.
- 9.- Betancourt MX, Robles PM, Borja PJ, Yela M. 2001. Tuberculosis bovina, con referencia a la tipificación de bacterias de muestras de bovinos, cerdos, y otras especies de la fauna silvestre. *Memorias 2º Congreso internacional de Epidemiología*. Asociación mexicana de Epidemiología Veterinaria, A.C. 361-364.
- 10.- Bignon C, Daniel N, Belair L, and Djiane J. 1999. *In vitro* expression of long and short ovine prolactin receptors: activation of Jak2/STAT5 pathway is not sufficient to account for prolactin signal transduction to the ovine beta-lactoglobulin gene promoter. *J Mol Endocrinol* 23: 125–136.
- 11.- Bignon C, Daniel N, Binart N, Hayes H, Schuler LA, Kelly PA, Djiane J. 1997. Long and short prolactin receptors in the ovine: cDNA cloning and genomic analysis of the alternative splicing region mechanisms in ruminants and in rodents. *Journal of Molecular Endocrinology*. 19: 109–120

- 12.- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA.1998. Prolactin (PRL) and its receptor:actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.*19(3):225-268.
- 13.- Bouchard B, Ormandy CJ, Di Santo J.P, Nelly PA. 1999. Immune system development and function in prolactin-receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 163(10):576-582.
- 14.- Buckley AR and Buckley DJ. 2000. Prolactin regulation of apoptosis-associated gene expression in T cells. *Ann NY Acad Sci* 917: 522-533.
- 15.- Cabrera OV, Rodríguez GJ, Méndez I, Larrea GF, Chape PA. 2000. Caracterización bioquímica de prolactina de diferentes especies. *Rev Cubana Endocrinol.* 11(2):78-89.
- 16.- Carreno PC, Jimenez E, Sacedon R, Vicente A, Zapata AG. 2004. Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. *J Neuroimmunol.*153:83-90.
- 17.- Cesano A, Oberholtzer E, Contarini M, Geuna M, Bellone G, Matera L. 1994. Independent and synergistic effect of interleukin-2 and prolactin on development of T- and NK-derived LAK effectors. *Immunopharmacology.* 28:67-75.
- 18.- Chacón-Salinas R, Serafin-López J, Ramos-Payán R, Méndez-Aragón P, Hernández-Pando R, Van Soolingen D, Flores-Romo L, Estrada-Parra S and Estrada-García I. 2005. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected *in vitro* with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology.* 140: 443–449.
- 19.- Chang WP and Clevenger CV. 1996. Modulation of growth factor receptor function by isoform heterodimerization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:5947–5952.
- 20.- Chikaza C and Panayi GS. 1991. Hypothalamic-pituitary mediated modulation of immune fuction: prolactin as a neuroimmune peptide. *J. Rheumatol* 30(3):203-207.
- 21.- Christoph H, Atkinson AT, Arendse B, Brown N, Myburgh E, alber G, and Brombacher F. 2001. A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *The journal of immunology,* 167:6957-6966.
- 22.- Chuang E and Molitch ME. 2007. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *ACTA BIOMED.* 78; Suppl 1: 255-261
- 23.- Cincotta AH, Knisely TL, Landry RJ, Miers WR, Gutierrez PJ, Esperanza P, Meier AH. 1995. The immunoregulatory effects of prolactin in mice are time of day dependent. *Endocrinology.* 136(5):2163-2171.
- 24.- Clevenger CV. 2003. Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. *Breast Dis.*18:75-86.
- 25.- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaida F, Badcock k, Basham D, Brown D, Chillingworth T,

- Connor R, Davies R, Devlin k, Feltwell T, Gentles S, Hamun N, Holdroy S, Homsby T. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. *Nature*. 393:537-544.
- 26.- Cooper AM, Magram J, Ferrante J, and Orme IM. 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 186:39.
- 27.- Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. 1995. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*. 84:423-432.
- 28.- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2003. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS. Lett.* 544(1-3):171-175.
- 29.- Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, Olano-Martin E, Schock BC, Kenny TP, Cross CE. 2004. Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287(4):750-757.
- 30.- Costa P, Catarino AL, Silva F, Sobrinho LG, Bugalho MJ. 2006. Expression of prolactin receptor and prolactin in normal and malignant thyroid: a tissue microarray study. *Endocr Pathol. Winter.* 17(4):377-86.
- 31.- Croze F, Walker A, Friesen HG. 1988. Stimulation of growth of Nb2 lymphoma cells by interleukin-2 in serum-free and serum-containing media. *Mol Cell Endocrinol.* 55:253-259.
- 32.- Dankner WM and Davis CE. 2000. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics.* 105:1-5.
- 33.- Dardene M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T, Bach JF. 1989. Neuroendocrine control of thymic hormonal production: Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cell. *Endocrinology.* 129(3):983-990.
- 34.- De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. .2005. Prolactin and autoimmunity. *Pituitary.* 8(1):25-30.
- 35.- De Kantor IN and Ritacco V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* 112: 111-118.
- 36.- Demaria JE, Nagy GM, Lerant AA, Fekete MI, Levenson CW, Freeman ME. 2000. Dopamine transporters participate in the physiological regulation of prolactin. *Endocrinology.* 141(1):366-374.
- 37.- Devost D and Boutin JM. 1999. Autorregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol.* 158(2):99-109.

- 38.- Dogusan Z, Hooghe R, Verdood P, Hooghe-Peters EL. 2001. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J Neuroimmunol.*120: 58-66.
- 39.- Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Horsburgh CR Jr, Salfinger M, Simone PM. American Thoracic Society. 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.*161:1376-1395.
- 40.- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. 1999. Consensus statement global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA.* 282(7):677-686.
- 41.- Ellie C, and Mark EM. 2007. Prolactin and autoimmune diseases in humans. *ACTA BIOMED.* 78; Suppl 1: 255-261.
- 42.- Endsley JJ, Endsley MA, Estes DM. 2006. Bovine natural killer cells acquire cytotoxic/effecter activity following activation with IL-12/15 and reduce *Mycobacterium bovis* BCG in infected macrophages. *J Leukocyte Biology.* 79: 1-9.
- 43.- Fernández ML, Iglesias MM, Biron VA, Wolfenstein TC. 2003. Protective effect of prolactin and placental lactogen on NO-induced Nb2 lymphoma cell apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 416: 249-56.
- 44.- Flynn JL and Chan J. 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*19:93-129.
- 45.- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80(4):1523-1631.
- 46.- García-García ML, Small PM, García-Sancho C, Mayar-Maya ME, Ferreyra Reyes L, Palacios-Martínez M, Jiménez S, Canales G, Quiroz G, Yáñez L, Valdespino-Gómez JL. 1999. Tuberculosis epidemiology and control in Veracruz, Mexico. *Int J Epidemiol.* 28:135-140.
- 47.- Gately KM, Rezzetti ML, Magram J, Stern SM, Adorini L, Gubler U, and Presky H. 1998. The interleukin-12/interleukin-12 receptor system: role in normal and Pathologic Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:495-521.
- 48.- Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, Bohnet HG. 1989. Regulation of prolactin secretion in the human B-lymphoblastoid cell line IM-9-P3 by dexamethasone but not other regulators of pituitary prolactin secretion. *Endocrinology.*125: 2853-2861.
- 49.- Goffin V and Kelly PA. 1997. The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 2:7-17.
- 50.- Goffin V, Binart N, Clement-Lacroix P, Bouchard B, Bole-Feysot C, Edery M, Lucas BK, Touraine P, Pezet A, Maaskant R, Pichard C, Helloco C, Baran N, Favre H,

- Bernichtein S, Allamando A, Ormandy C, Kelly PA. 1999. From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genet Anal Biomol Engin* 15:189–201.
- 51.- Grange JM and Yates MD. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol.* 40 (1-2): 137-151.
- 52.- Guevara GA, Juárez HA, Zenteno CR. 2003. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas tecnologías diagnósticas. *MEDUNAB* 6(16):46–51.
- 53.- Gurria TF. 1994. Situación actual de la campaña contra tuberculosis y brucelosis en México. *México ganadero* 285: 21-28.
- 54.- Hwang P, Guyda H, Friesen H. 1972. Purification of human prolactin. *J. Biol chem.* 247(7):1955-1958.
- 55.- Jabbour HN, Critchley HO, Yu-Lee LY, Boddy SC. 1999. Localization of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in nonpregnant human endometrium: expression of IRF-1 is up-regulated by prolactin during the secretory phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 4260-4265.
- 56.- Jianping Meng, Chon-Hwa Tsai-Morris, and Maria L. Dufau. 2004. Human Prolactin Receptor Variants in Breast Cancer: Low Ratio of Short Forms to the Long-Form Human Prolactin Receptor Associated with Mammary Carcinoma. *Cancer Research.* 64: 5677–5682.
- 57.- Kaufmann SH, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *J Exp Med.* 201(11):1693-1697.
- 58.- Kelly PA, Djiane J, Postel MC, Edery M. 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev.* 12(1):235-251.
- 59.- Kloehn S, Otte C, Korsanke M, Arendt T, Clemens A, Glasow A, Bornstein SR, Fölsch UR, Mönig H. 2001. Expression and distribution of the prolactin receptor in normal rat liver and in experimental liver cirrhosis. *Horm Metab Res.* 33(7):394-401.
- 60.- Kremer L. and Besra GS. 2005. A waxy tale, by *Mycobacteriu tuberculosis*, pp. 287-305. In S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs, Jr. (Eds). *Tuberculosis and the tubercle bacillus*, American Society for Microbiology, Washington D. C.
- 61.- Ladel Hc, szalay G, Riedel D, Kaufmann EHS. 1997. interleukin-12 by *Mycobacterioum tuberculosis*-infected Macrophages. *Infect Immun.* 1936-1938.
- 62.- Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. 2001. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:807-808.

- 63.- Larrea F, Martínez-Castillo A, Cabrera, Alcocer-verela VJ, Queipo G. 1997. A bioactive 60 kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cell from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metabol* 82(11):3664-3669.
- 64.- Larrea F, Mendez I, Cariño C, Díaz L. 1993. Conceptos actuales sobre fisiología de la prolactina: variantes moleculares y mecanismos de acción. *Rev Invest Clin*. 45(4):375-386.
- 65.- Leañós-Miranda A, Pascoe D, Chavez RK, Blanco F. 2001. Antiprolactin autoantibodies in systemic lupus Erythematosus: frequency and correlation with prolactinemia and disease activity. *J Rheumatol*. 28(7):1546-1553.
- 66.- Leemans C, Wieland WC, Florquin S, Poll T and Vervoordeldonk JBM. 2005. Mice overexpressing p40 in lungs have reduced leucocyte influx and slightly impaired resistance during tuberculosis. *Immunology*. 117, 409–418.
- 67.- Linzer and Davis DIH JA. 1989. Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Mol Endocrinol* 3:674–680.
- 68.- Li-Yuan Yu-Lee. 2002. Prolactin Modulation of Immune and Inflammatory Responses. *The Endocrine Society All rights of reproduction in any form reserved*: 435-454.
- 69.- Maher D, Floyd K, Raviglione M. A strategic framework to decrease the burden of 2002. *TB/HIV.WHO/CDS/TB/2002.296*.
- 70.- Marc E, Freeman BK, Anna L, Gyorgy N. 2000. PRL. *Phys Rev*. 80(7):1523-1631.
- 71.- Matera L and Mori M. 2000. Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 917: 505-13.
- 72.- Matera L, Galetto A, Geuna M, Vekemans K, Ricotti E, Contarini M, Moro F, Basso G. 2000. Individual and combined effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prolactin on maturation of dendritic cells from blood monocytes under serum-free conditions. *Immunology*. 100: 29-36.
- 73.- Matera L, Mori M, Galetto A. 2001. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus*. 10(10):728-734.
- 74.- Meli R, Raso GM, Gualillo O, Pacilio M, Di Carlo R. 1997. Prolactin modulation of nitric oxide and TNF-alpha production by peripheral neutrophils in rats. *Life Sci*. 61(14):1395-1403.
- 75.- Méndez I, Cariño C, Díaz Lorenza. 2005. La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Revista de Investigación Clínica*. 57(3): 447-456

- 76.- Meng J, Tsai-Morris CH, Dufau ML. 2004. Human prolactin receptor variants in breast cancer: low ratio of short forms to the longform human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Res.* 64: 5677-56782.
- 77.- Milián SF y Gallegos TRM. 2001. La vacunación con *M. bovis* BCG, posible alternativa para el control de la tuberculosis bovina en México. *Memorias 20 congreso internacional de epidemiología. Asociación mexicana de epidemiología veterinaria A.C.*63-69.
- 78.- Morán LE and Lozano AY. 2001. Tuberculosis. *Rev Cubana Estomatol.* 38(1):33-51.
- 79.- Mukherjee P, Marstro AM, Hymer WC. 1990. Prolactin induction of interleukin -2 receptors a rat splenic lymphocytes. *Endocrinology.* 126(4): 88-94.
- 80.- Nagy E and Berczi I. 1986. The pituitary gland; en: *Pituitary fuction and immunity.* CRC PRESS. Cap. II USA.
- 81.- Naylor MJ, Lockefer JA, Horseman ND, Ormandy CJ. 2003. Prolactin regulates mammary epithelial cell proliferation via autocrine/paracrine mechanism. *Endocrine.* 20:111-114.
- 82.- Nelly SD, Bryson DG, Pollock JM. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis.* 81(1/2):79-86.
- 83.- Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7(1): 49-66.
- 84.- Nicoll CS. 1974. Physiological actions of Prolactin. *Handbook of Physiology*; edn 7: 253-291. Washington DC: American Physiological Society.
- 85.- Nira BJ. 1985. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrin Rev.* 6(4):564-589.
- 86.- North JR, and Yu-Jin Jung. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. immunol.* 22: 599-623.
- 87.- Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schuler M, Biskup C, Schedlowski M, Nast-Kolb D, Exton MS. 2003. Prolactin modulates survival and cellular immune functions in septic mice. *J Surg Res.* 113(2):248-256.
- 88.- Ordway D, Harton M, Henao-TM, Montoya R, Orme M, and Gonzalez-Juarrero M. 2006. Enhanced Macrophage Activity in Granulomatous Lesions of Immune Mice Challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology.* 176: 4931–4939.
- 89.- Ordway D, Henao-TM, Orme M, and Gonzalez-Juarrero M. 2005. Foamy Macrophages within Lung Granulomas of Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis* Express Molecules Characteristic of Dendritic Cells and Antiapoptotic Markers of the TNF Receptor-Associated Factor Family. *The Journal of Immunology.* 175:3873–3881.

- 90.- Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. 1993. Cytokine secretion by CD4+ T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol. 151: 518-25.
- 91.- Ortega E, Forner M. A and Barriga C. 1996. Effect of prolactin on the in vitro phagocytic capacity of macrophages. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 19(2):139-146.
- 92.- Pan H, Yan BS, Rojas M, Shebzukhov YV, Zhou H, Kobzik L, Higgins DE, Daly MJ, Bloom BR, Kramnik I. 2005. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. Nature. 434:767-772.
- 93.- Peirce SK and Chen WY. 2004. Human prolactin and its antagonist, hPRL-G129R, regulate bax and bcl-2 gene expression in human breast cancer cells and transgenic mice. Oncogene.23: 1248-55.
- 94.- Pellegrini I, Lebrun J, Ali S, Kely PA. 1992. Expression of prolactin and its receptors in human lymphoid cell. Mol Cell Endocrinol. 6(7):1023-1031.
- 95.- Pfyffer GE, Auckenthaler R, Van Embden JDA, Van sooling. 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from Swiss patient exposed in Africa. Emerg infect Dis. 4:632-634.
- 96.- Pollock JM and Neill SD. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet. J. 163, 115–127.
- 97.- Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. Tuberculosis. 81(1/2):103-107.
- 98.- Pollock JM, Welsh MD, Mc Nair J. 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. Veterinary Immunology and Immunopathology. 108. 37–43.
- 99.- Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. Indian J Med Res 120: 213-232.
- 100.- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. 2000. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. Oncogene. 19:2619–2627
101. Richardson BP. 1973. Evidence for a physiological role of prolactin in osmoregulation in the rat after its inhibition by 2-bromo aergokryptine. Br J Pharmacol. 47:623–624
- 102.- Riddle O, Bates WR, Dykshorn WS. 1983. A new hormone of the anterior pituitary. Proc Soc Exp Biol Med. 129(6):454-456.
- 103.- Rincheval-Arnold A, Belair L, Cencic A, Djiane J. 2002. Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor mRNA in mammary epithelial cells by IFN-gamma. Mol Cell Endocrinol.194: 95-105.
- 104.- Ritacco V, de Kantor IN. 1992. Zoonotic tuberculosis in Latina America. J Clin Microbiol. 30(12):3299-3300.

- 105.- Schuler LA, Nagel RJ, Gao J, Horseman ND, And Kessler MA .1997. Prolactin Receptor Heterogeneity in Bovine Fetal and Maternal Tissues. *Endocrinology* 138: 3187–3194.
- 106.- Shabaana A. Khader, Santiago Partida-Sanchez, Guy Bell, Dawn M. Jelley-Gibbs, Susan Swain, John E. Pearl, Nico Ghilardi, Frederic J. deSavauge, Frances E. Lund, and Andrea M. Cooper. 2006. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 203:1805-1815.
- 107.- Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin J-M, Edery M, Djiane J, Kelly PA. 1990. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Mol Endocrinol*. 4:1136–1143.
- 108.- Shoda LKM, Palmer GH, Christensen JF, Christensen MF, Godson DL and Brown WC. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infection and immunity*. 68 (9): 5139-5141.
- 109.- Simon-Holtorf J, Mönig H, Klomp HJ, Reinecke-Lüthge A, Fölsch UR, Kloehn S. 2006. Expression and distribution of prolactin receptor in normal, fibrotic, and cirrhotic human liver. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 114(10):584-589.
- 110.- Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*. 16(3):354-359.
- 111.- Stenger S, Niazi KR, Modlin RL.1998. Down-regulation of CD1 on antigen presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 161:3582-3588.
- 112.- Strous GJ, Van Kerkhof P, Govers R, Ciechanover A, Schwartz AL .1996. The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *EMBO J*. 15:3806–3812.
- 113.- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*. 19:623–655.
- 114.- Tapia R, Ruiz C, Ferreira E. 1995. Epidemiología de la tuberculosis en México. En: Sada E, Sifuentes J eds. *Tuberculosis*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, México: 761-788. (Ramiro HM, Saita OK, eds. *Temas de Medicina Interna*; vol. 3.
- 115.- Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y, Gibori G. 2001. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology*. 142: 4086-4094.
- 116.- Trinchieri G. 2007. Interleukin-12 And The Regulation Of Innate Resistance And Adaptive Immunity. *Nature Reviews, Immunology*. 3: 133-146.

- 117.- Van Coppenolle F, Skryma R, Ouadid-Ahidouch H, Slomianny C, Roudbaraki M, Delcourt P, Dewailly E, Humez S, Crepin A, Gourdou I, Djiane J, Bonnal JL, Mauroy B, Prevarskaya N. 2004. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem J.* 377: 569-578.
- 118.- Velásquez MJ. 1998. *Biología de la reproducción*. Departamento de biología de la reproducción. UAM-I, México D.F.
- 119.- Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Castro AM. 1991. Prolactin induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 129(2):983-990.
- 120.- Wu H, Devi R and Malarkey WB. 1996. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology.* 137(5):349-353.
- 121.- Yu-Lee LY. 1997. Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp. Biol Med.* 215(1): 35-52.
- 122.- Yu-Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res.* 57: 435-455.
- 123.- Zellewer R, Zhu XH, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. 1996. Prolactin administration following hemorrhagic shock improves macrophage cytokine release capacity and decreases mortality from subsequent sepsis. *J Immunol.* 157(12): 5748-5754.