

The seal of the University of Zaragoza is a circular emblem with intricate details. It features a central figure, possibly a saint or a historical figure, surrounded by various symbols and text. The outer ring of the seal contains the Latin inscription "UNIVERSITAS CAESARIS ARAGONENSIS" in capital letters.

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal

**Estudio de un nuevo tratamiento de la leishmaniosis canina.
Valoración del efecto inmunomodulador de la domperidona.**

TESIS DOCTORAL
Pablo Gómez Ochoa
Zaragoza, 2004



Departamento de Patología Animal
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

D. MANUEL GASCON PEREZ y D. JUAN ANTONIO CASTILLO HERNANDEZ

Profesores Titulares del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN:

Que la presente memoria titulada **“ESTUDIO DE UN NUEVO TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA. VALORACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DE LA DOMPERIDONA”** de la que es autor el licenciado en Veterinaria D. Pablo Gómez Ochoa, ha sido realizada bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas para ser presentada y defendida como Tesis Doctoral.

Zaragoza, febrero de 2004

Fdo: Prof. Dr. D. Manuel Gascón Pérez

Fdo: Prof. Dr. D. Juan Antonio Castillo Hernández

A mis padres, por todo

Agradecimientos

A mis directores Manolo y Juan Antonio, muchas gracias por vuestra confianza y amistad, siempre me he sentido escuchado y valorado por vosotros.

A Javier Lucientes, has sido mi tercer director además de un amigo; muchas gracias por haber compartido estos cuatro años y tu despacho conmigo.

A Pepín y Tere, muchas gracias, muchas gracias. Me habéis ayudado en todos los ámbitos, estaría contento de haberos aportado la décima parte de lo que me habéis dado.

A Vicente Larraga, a Chus y a Tobías, gracias por vuestra amabilidad, por abrirme las puertas del C.I.B. y por vuestra comprensión con un lego en técnicas moleculares.

A Chusa y a Miguel Angel Peribañez muchas gracias por animarme y por vuestro cariño.

A mis compadres Juan Zárate e Iñaki Arbea, por todo lo que me habéis enseñado de las ponzoñosas leishmanias; espero que todo lo que os ocurra sea tan bueno como fueron para mi los tres años que estuve con vosotros.

A Marta, si se pudiera bautizar el gen de la prolactina canina debería llevar su nombre; gracias por el trabajo que has aportado a esta Tesis.

A Amaia muchas gracias por tu ayuda, has sido un amiga durante cada día de estos cuatro años; en el ámbito profesional y personal gracias.

A Montse, gracias por ayudarme con la captación de casos para la prueba clínica y apoyarme en todo momento.

A Mamen, a Silvia y a Carmen. Muchas gracias, siempre me habéis ayudado, me habéis tratado con cariño y con una sonrisa en la boca.

A Maite. Muchas gracias por tu energía, es contagiosa, y tus enseñanzas en leishmaniosis.

A todos los compañeros del HCV, y muy especialmente a Laura Ibarra y a Adolfo, muchas gracias amigos, aunque sean palabras que no consiguen reflejar fielmente todo lo que representáis para mi.

A Jose y a Ramón, gracias por haberme enseñado la pasión por la clínica de pequeños animales; seguramente sin los dos años que estuve con vosotros nada de esto hubiera ocurrido.

A Imanol y a Nacho, muchas gracias por todo lo que hemos compartido y por arroparme siempre que os he necesitado.

A María Angeles Lostao, gracias por todos los proteinogramas, los perfiles bioquímicos, y por tu paciencia y amabilidad conmigo.

A Encarna, muchas gracias por tu mano con los cultivos; cualquier célula crecería con una citoquina como tú.

A María Jesús, por todas tus buenas ideas y por tu buen hacer con los animales de laboratorio.

A todos los propietarios que confiaron en mí y probaron el nuevo tratamiento, muchas gracias a vosotros y a vuestras magníficas mascotas

A Javi Miñana y a Joaquín Medina, espero estar a vuestra altura y demostraros día a día lo agradecido que estoy de haberos conocido.

A mis padres, Paco y Lourdes y a mi hermano Nacho, gracias, gracias y mil gracias, ojalá estéis la mitad de orgullosos de mí de lo que yo lo estoy de tener una familia así. Además gracias por apoyarme en **todo** y por soportar estoicamente el desorden y la continúa invasión de artículos y revistas que ha sufrido la casa "últimamente".

A Cristina; esta Tesis es de los dos, has estado en cada palabra de estas páginas. No puedo concebir otra motivación que no seas tú.



Indice

INDICE

	Página
I. REVISION BIBLIOGRAFICA	1
1.- Prolactina	3
1.1.- Estructura y función	3
1.1.1- Biología molecular	3
1.1.2.- Lugares de síntesis y secreción	4
1.1.3.- Receptores de la prolactina	6
1.1.4.- Actividad biológica de la prolactina	7
1.1.5.- Patrones de liberación	9
1.1.6.- Regulación de la secreción de prolactina hipofisaria	11
1.2.- La prolactina y el sistema inmune	17
1.2.1.- Relación con el sistema inmune e implicación en diversas patologías	17
1.2.2.- Mecanismos de actuación	20
1.2.3.- Macrófagos, NK y linfocitos T citotóxicos	21
1.2.4.- Interleucinas	26
1.2.5.- El fenómeno de la autoinmunidad	27
1.3.- La hematopoyesis y la prolactina	30
1.4.- Utilidad clínica de la hormona y de los fármacos relacionados	32
2.- Leishmaniosis	33
2.1.- Biología	33
2.1.1- El género Leishmania	33
2.1.2.- El papel de los Phlebotomos y Lutzomyias	37
2.1.3.- Ciclo biológico	39
2.1.4.- Modelos experimentales	40
2.2.- Leishmaniasis canina	45
2.2.1.- Respuesta inmune	45
2.2.2.- Infección clínica	53
2.2.3.- Diagnóstico	55
2.2.4.- Tratamiento	59

II. MATERIAL Y METODOS	61
1.- Introducción y descripción de los ensayos	63
2.- Influencia de la lactación en la infección por <i>Leishmania infantum</i>.	
Estudio experimental en un modelo criceto (<i>Mesocricetus auratus</i>)	65
3.- Estudio preliminar de la relación entre la domperidona,	
la inmunidad y la hematopoyesis en Beagles sanos	69
4.- Estudio de la eficacia terapéutica de la domperidona	
en perros enfermos de leishmaniosis	70
5.- Amplificación y secuenciación del gen de la prolactina canina	74
5.1.- Extracción del RNA del tejido	74
5.2.- Síntesis de cDNA	76
5.3.- Síntesis de los oligos	77
6.- Métodos de evaluación	82
6.1.- Parámetros clínicos y analíticos	82
6.2.- Pruebas diagnósticas directas	87
6.3.- Pruebas diagnósticas indirectas	90
6.4- Valoración de la respuesta inmune celular	93
6.5.- Cultivos de progenitores hematopoyéticos	98
6.6.- Análisis estadístico	102

III. RESULTADOS	105
1.- Estructura de los resultados	107
2.- Validación de la técnica de elaboración del antígeno EasyDAT	108
3.- Estandarización del cultivo de progenitores hematopoyéticos en diferentes especies animales	109
3.1.- Especie canina	109
3.2.- Rata, hámster, ratón, conejo, cerdo y gato	114
4.- Relación entre lactación y leishmaniosis en la infección experimental con un modelo criceto	118
4.1.- Peso	118
4.2.- Serología	119
4.3.- Valoración de la respuesta inmune	119
4.4.- Necropsia	121
5.- Relación de la hiperprolactinemia inducida por Domperidona con la hematopoyesis y la funcionalidad leucocitaria en Beagles sanos	125
5.1.- Niveles séricos de prolactina	125
5.2.- Cultivos de progenitores hematopoyéticos en medio semisólido y líquido	126
5.3.- Test de reducción del nitroazul de tetrazolio	129
6.- Estudio de la eficacia terapéutica de la domperidona en perros enfermos de leishmaniosis	131
6.1.- Grupo A	131
6.2.- Grupo B	134
7.- Amplificación y secuenciación del gen de la prolactina canina	136
7.1.- Aislamiento de DNA de un gel de agarosa	138
7.2.- Secuenciación del DNA	139

IV. DISCUSION	141
1.- Validación de la técnica de elaboración del antígeno EasyDAT	143
2.- Estandarización del cultivo de progenitores hematopoyéticos en diferentes especies animales	144
3.- Relación entre lactación y leishmaniosis en la infección experimental con un modelo criceto	146
4.- Relación de la hiperprolactinemia inducida por Domperidona con la hematopoyesis y la funcionalidad leucocitaria en Beagles sanos	149
5.- Estudio de la eficacia terapéutica de la domperidona en perros enfermos de leishmaniosis	151
6.- Clonaje y secuenciación del gen de la prolactina canina	155
V. CONCLUSIONES	157
VI. BIBLIOGRAFIA	161
1.- Leishmaniosis	163
2.- Prolactina, domperidona y pruebas complementarias	187



Revisión Bibliográfica

1.- PROLACTINA

1.1.- Estructura y función

La prolactina es una hormona proteica sintetizada y secretada por células especializadas en el lóbulo anterior de la hipófisis (Riskind y cols. 1991; Draca 1995), que debe su nombre a la capacidad de inducir la lactación ante el estímulo de succión de las crías hambrientas de los mamíferos. Sin embargo en estos momentos son más de 300 funciones diferentes, no relacionadas con la lactación, las que se le atribuyen a esta hormona (Bole-Feysot y cols. 1998), estando implicada en la reproducción, en la homeostasis y en la inmunidad entre otras. Además de las múltiples funciones se han encontrado diversas fuentes celulares productoras de prolactina, sobre todo en células del sistema inmune (Dardenne y Savino 1996; Oberholtzer y cols. 1996).

1.1.1.- Biología molecular

La prolactina de acuerdo a su secuencia genética, estructura y función, se engloba en el grupo I de las hormonas proteicas de hélice envuelta junto con la hormona del crecimiento y los lactógenos placentarios (Boulay y Paul 1992). Los genes que codifican estas tres hormonas han evolucionado desde uno común, mediante duplicación. La divergencia de la prolactina y la hormona del crecimiento se produjo en la especie humana hace aproximadamente 400 millones de años (Cooke y cols. 1981).

La característica común en la prolactina de todas las especies es la presencia de tres puentes disulfuro intramoleculares entre residuos de cisteína (Cooke y cols. 1981). La homología encontrada entre las diferentes especies es elevada, variando desde el 97% entre mamíferos y primates hasta el 56% entre primates y roedores (Sinha 1995). En la rata y en el ratón la prolactina hipofisaria consta de 197 aminoácidos (Cooke y cols. 1980), siendo de 199 en la oveja, en el cerdo, en los bóvidos y en los humanos (Freeman y cols. 2000), con una peso molecular aproximado de 23000 Daltons.

La estructura secundaria y terciaria de la prolactina ha sido muy estudiada. En la primera (estructura secundaria) el 50% de la cadena aminoacídica está dispuesta en α -hélices, mientras el resto de la molécula se dispone en forma de lazos. La estructura terciaria no se conoce, pero se ha inferido mediante un modelo de homología respecto a la hormona del crecimiento (Goffin y cols. 1995). De acuerdo a este modelo la estructura tridimensional

estaría compuesta por 4 largas α -hélices den un patrón antiparalelo (Abdel-Meguid y cols. 1987).

Aunque la forma más común de esta hormona es la procedente de la hipófisis, en los últimos años se han caracterizado variantes, seguramente derivadas de un splicing alternativo del transcrito primario, del cleavage proteolítico y/o de otras modificaciones post-traducción de la cadena aminoacídica. El splicing alternativo, implicado en la retención de intrones, no parece ser la mayor fuente de variantes de la prolactina. El cleavage proteolítico, se ha comprobado como fuente de variabilidad, dando lugar a varios fragmentos con actividad biológica descritos en ratones, ratas y en humanos (Sinha y Gilligan 1984). Las modificaciones post-traducción producen la mayor parte de las variantes de la prolactina (Sun y cols. 1996). Dentro de éstas las más importantes son: la dimerización y la polimerización (macroprolactina) de reducida actividad biológica (Sinha 1995), la fosforilación (prolactina fosforilada) que representa aproximadamente el 80% de la prolactina hipofisaria en el bovino (Kim y Brooks 1993) con poco valor biológico, para actuar únicamente como regulador autocrino de la liberación de prolactina no fosforilada (Ho y cols. 1989), y la glucosilación (prolactina glucosilada) encontrada en un gran número de mamíferos, anfibios y aves (Sinha 1995), regula el clearance de la molécula, aunque al igual que el resto de variantes, tiene poca actividad biológica.

1.1.2.- Lugares de síntesis y secreción

Los principales lugares o células productoras de prolactina se encuentran en el lóbulo anterior de la hipófisis, el cerebro, la placenta la decidua y el útero, la glándula mamaria y las células del sistema inmune.

En el **lóbulo anterior hipofisario** las células productoras de prolactina son las lactótropas o mamótropas, que representan entre el 20 y el 50% de la población celular del lóbulo anterior. Estas células se han reconocido y tipificado usando tinciones inmunohistoquímicas específicas en el ratón, en la rata y en el hombre. En la rata, especie en la que están especialmente estudiadas estas células, se distribuyen en la porción lateroventral del lóbulo anterior y en una banda en adyacente al lóbulo intermedio. Los contornos son heterogéneos y se describen como poliédricos, aunque a veces se presentan redondas u ovaladas (De Paul y cols. 1997). La tipificación de estas células lactótropas se realiza en función de los gránulos y de la cantidad de RNAm usando la velocidad de sedimentación y los gradientes discontinuos de Percoll. Por tanto las células lactótropas son heterogéneas en su morfología, en su fenotipo hormonal, en su distribución y en su función.

La primera cita de la presencia de prolactina en el **cerebro** data de 1977 (Fuxe y cols. 1977) cuando se encontró inmunorreactividad frente a anticuerpos anti-prolactina en los axones terminales del hipotálamo. Posteriormente se halló también en el cortex (telencéfalo), en el hipocampo, en los núcleos de la amígdala, putamen y caudado, en el cerebelo, en la médula espinal, en los plexos coroideos y en los órganos circumventriculares (DeVito 1988). Transcurrió una década hasta que pudo probarse de una manera contundente, con ratas hipofisectomizadas, que la prolactina encontrada en el hipotálamo era de producción local independiente (DeVito 1988). La función de esta prolactina sobre el sistema nervioso central no está demostrada, y aunque se ha sugerido cierto papel como neurotransmisor central neuromodulador o como citoquina reguladora de las funciones de la glía, resulta complejo distinguir entre los efectos de esta prolactina de origen hipotalámico y los procedentes de la hipofisaria.

La **placenta** además del transporte metabólico materno-fetal y feto-materno posee un amplio espectro de funciones endocrinas, y una de ellas es la secreción de lactógenos placentarios, hormonas de la familia de la prolactina descritos en rata, ratón, hámster, vaca, cerda y humano (Robertson y cols. 1991; Shida y cols. 1992; Soares y cols. 1983; Southard y cols. 1987; Yamaguchi y cols. 1994). También la **decidua** produce la prolactina J en las primeras etapas de la gestación (Toft y Linzer 1999) y una molécula similar a la prolactina que resulta indistinguible de esta última. La liberación de estas dos moléculas es estimulada por la progesterona (Maslar y Ansbacher 1986). Incluso el **útero** no gestante se considera una fuente productora de prolactina miometrial de la que se desconoce su función específica (Gellersen y cols. 1991).

En la **glándula mamaria** también se ha detectado la producción de prolactina en las células epiteliales, aunque se le ha asignado un papel de procesado post-traducción al observarse tanto en la rata como en el humano más variantes en la leche que en el suero (Kacsoh y cols. 1991). La función que cumplen estos péptidos producidos en la glándula mamaria, y presentes en la leche es crucial en la rata, ya que el neonato de esta especie es bastante inmaduro, con escaso desarrollo del sistema neuroendocrino, y el 20% de la prolactina que ingiere con la leche pasa directamente a la circulación (Grosvenor y Whitworth 1983) ayudando a madurar tanto el sistema neuroendocrino como el inmune (Shah y cols. 1988).

Aunque la relación entre el **sistema inmune** y la prolactina será tratada en profundidad en el apartado 2.2. es importante subrayar la producción de prolactina en las células del

sistema inmune (Gala y Shevach 1994), como demuestra la liberación de prolactina bioactiva y la presencia de RNAm en el interior de linfocitos tomados de sangre periférica (DiMattia y cols. 1988; Gellersen y cols. 1989). A partir de este descubrimiento la prolactina pasó a considerarse como un puente entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune; además la presencia de receptores para la dopamina en los linfocitos, imbrica aún más a las células del sistema inmune con el metabolismo de la prolactina (Devins y cols. 1992).

1.1.3.- Receptores de la prolactina

Los receptores de la prolactina son proteínas simples de membrana clasificados dentro de la superfamilia de los receptores clase 1 de las citoquinas (Agnati y cols. 1985). Desempeñan un importante papel en la transducción de la señal al interior de la célula, desde el dominio extracelular al intracelular (Yamashita y cols. 1996). Se han descrito numerosas isoformas de este receptor en distintos tejidos (Lesueur y cols. 1991) como consecuencia de transcripciones alternativas (Hu y Dufau 1991), en las que el dominio intracelular varía en longitud y composición, siendo idéntico el dominio extracelular (Bole-Feysot y cols. 1998).

La vía de activación del receptor y la transducción de la señal es compleja. En el primer paso la molécula de prolactina se une al receptor induciendo una dimerización secuencial del receptor (Bole-Feysot y cols. 1998). La formación de este complejo hormona-receptor es el prerrequisito para la interacción de un segundo sitio de unión de la hormona con otro receptor adyacente (Bole-Feysot y cols. 1998). Acto seguido se produce la transducción de la señal mediante la activación de un Jak2 y la fosforilación del dominio intracelular. Algunas funciones celulares, como la proliferación, en las que está implicada la prolactina y su receptor no requieren de la fosforilación del dominio intracelular (Yao y cols. 1996).

En la transmisión de la señal intracelular están implicadas 4 moléculas de la familia STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción), muy relacionada con la transducción de la señal en las citoquinas (Ihle y cols. 1994), y específicamente la STAT1, STAT3, STAT5a y la STAT5b han sido identificadas como los transductores de señal para el receptor de la prolactina (Goffin y cols. 1998). En primer lugar una proteína STAT se une al dominio intracelular del receptor, mientras se mantiene unida es fosforilada por la proteína Jak kinasa asociada al receptor. La STAT fosforilada se disocia del receptor y forma un hetero u homodímero, mediante un puente disulfuro con otra proteína STAT (Bole-Feysot y cols. 1998). Este dímero de STAT se transloca al núcleo y activa, en un sitio de unión con el DNA, la región promotora en el gen diana (Carter-Su y Smit 1998). La secuencia consenso reconocida por las STAT dimerizadas se denomina GAS (secuencia activadora del γ -

interferón) (Horseman y Yu-Lee 1994). Muchas regiones promotoras contienen esta secuencia, y se ha comprobado in vitro que numerosas citoquinas la activan (Horseman y Yu-Lee 1994). Se ha propuesto que esta secuencia de actuación de las STAT está implicada en la iniciación de la respuesta inmune celular (Stoecklin y cols. 1997), y también se ha comprobado la internalización nuclear del propio receptor, sin conocerse a día de hoy ni las implicaciones biológicas, ni las funciones que desempeña (Rao y cols. 1995).

Aunque el sistema Jak/STAT es la vía más importante de activación del receptor de la prolactina, hay otros sistemas implicados como el MAP (mitógeno activado proteico) y otras kinasas como el Src y el Fyn también relacionadas con la activación del receptor (Sorensen y Sheffield 1997).

Entre las diversas localizaciones en las que se han descrito y caracterizado los receptores de la prolactina, no sorprende su presencia en la glándula mamaria y en el ovario (Nagano y Kelly 1994), pero resulto un hallazgo imprevisto la detección de RNAm de estos receptores en el sistema nervioso central (plexos coroideos, amígdala, tálamo, hipotálamo, córtex y en el bulbo olfatorio) (Freemark y cols. 1995), y recientemente también se han caracterizado en infinidad de órganos y tejidos (corazón, pulmón, timo, bazo, hígado, páncreas, riñón, adrenales, músculo esquelético, piel ...) (Nagano y Kelly 1994).

1.1.4.- Actividad biológica de la prolactina

Las acciones en las que está implicada la prolactina son innumerables, y aunque todas ellas están en mayor o en menor medida imbricadas, pueden desglosarse en reproductivas (lactación, función luteínica y comportamiento) y homeostáticas (osmorregulación, angiogénesis y sistema inmune).

Dentro de los efectos producidos por la hormona que atañen al aparato reproductor, el más conocido y estudiado es la **lactación**. Ayuda al crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria (mamogénesis), a la síntesis de leche (lactogénesis) y al mantenimiento de la secreción de leche (galactopoyesis). La mamogénesis siempre se consideró relacionada con esta hormona, pero no se demostró hasta fechas recientes, en un estudio con ratones knockout (Ormandy y cols. 1997), la influencia de la prolactina en el tamaño y en las ramificaciones de los conductos mamaros, así como en el desarrollo del patrón lóbuloalveolar durante la gestación (Briskin y cols. 1999). La relación entre la lactogénesis y la prolactina siempre ha sido clara y usando ratas hipofisectomizadas se comprueba la incapacidad que tenían para producir leche. Recientemente con ratones knockout para el gen y los receptores de la prolactina se ha demostrado la misma incapacidad para la

actación (Horseman y cols. 1997). Aunque la prolactina resulta imprescindible para la lactación son necesarias otras hormonas para la perfecta sincronía y funcionamiento de la glándula mamaria, requiriendo la acción de estrógenos, progesterona y glucocorticoides. Además, se han encontrado evidencias de un relevante papel por parte de la hormona del crecimiento, de la insulina, de la hormona tiroidea y paratiroidea, de la calcitonina y de la oxitocina en la galactopoyesis. En algunos mamíferos se ha comprobado que la prolactina influye sobre el **cuerpo lúteo**. Un claro ejemplo son los roedores, en los que puede ser luteotrófica o luteolítica dependiendo del estímulo que se produzca. La acción luteotrófica descrita en la rata se manifiesta con un incremento de los niveles de progesterona, lo que resulta esencial para la implantación del óvulo fecundado, el mantenimiento de la gestación y la inhibición de la ovulación (Freeman y cols. 2000). El estímulo sobre la progesterona se induce por dos vías: potenciando el efecto esteroidogénico de la hormona luteinizante sobre las células de la granulosa e inhibiendo la 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que inactiva la progesterona. En los hámsters la prolactina es parte de un complejo luteotrófico formado por la hormona luteinizante, la hormona folículoestimulante y la prolactina. Hay evidencias de que este complejo luteotrófico puede existir en perros y en primates. Además del marcado carácter luteotrófico de la prolactina, también se ha demostrado un efecto contrario, luteolítico, induciendo apoptosis de las células del cuerpo lúteo (Matsuyama y cols. 1996) que parece estar mediado por linfocitos CD3+. El mecanismo por el que la prolactina puede ser a la vez una hormona luteotrófica y luteolítica se desconoce. El último efecto de la prolactina sobre la reproducción es la influencia sobre el **comportamiento reproductivo** (Dutt y cols. 1994). En las hembras está ligado a la receptividad, habiéndose encontrado receptores para la prolactina en el núcleo ventromedial del hipotálamo que controlan el comportamiento sexual (Crumevolle-Arias y cols. 1993); sin embargo se han obtenido datos contradictorios que no acaban de dilucidar el papel de la prolactina en el comportamiento sexual de la hembra (Witcher and Freeman 1985). En otro período del comportamiento reproductivo, el comportamiento parental, que engloba pautas como la construcción del nido y el lavado y acicalado de las crías entre otras, si que se ha establecido una relación clara con la prolactina, en la rata, en el hámster, en el ratón y en la oveja (Lucas y cols. 1998). Hay que subrayar que la prolactina por si sola, no inicia el comportamiento maternal, pero si que acorta el tiempo de latencia hasta su presentación (Bridges y cols. 1990). El contacto con las crías induce la transcripción de receptores de prolactina en el cerebro de las ratas (Sugiyama y cols. 1996). Este efecto no es género dependiente, observándose también en ratas machos (Sakaguchi y cols. 1996). Se comprobó que el comportamiento parental

dependiente de la prolactina es más marcado en los peces y en las aves, que en los mamíferos (Schradin y Anzenberger 1999).

Además de los efectos descritos sobre el aparato reproductor, la prolactina también influye en el mantenimiento del medio interno regulando la homeostasis. La **osmoregulación** ha sido una de las últimas funciones de la prolactina en ser descubierta. Regula el transporte de agua y solutos a través de las membranas celulares de los mamíferos (Shennan 1994) aumentando el transporte de potasio en las células epiteliales de la glándula mamaria (Falconer y cols. 1983), y además estimula la captación de aminoácidos en la mama de la rata y ejerce un cierto control en la osmoregulación de las membranas amnióticas y en las células epiteliales intestinales.

Otro apartado importante controlado por la prolactina es el desarrollo de vasos sanguíneos o **angiogénesis**. La acción fundamental de esta variante de prolactina de 16000 daltons es inhibitoria, impidiendo el desarrollo de estos. También se ha demostrado recientemente que tanto la prolactina intacta, como la hormona del crecimiento y los lactógenos placentarios presentan acción angiogénica (Struman y cols. 1999) aunque todavía no se ha encontrado el significado fisiológico de estos efectos opuestos.

La modulación de la **respuesta inmune** por la prolactina es quizá la función más interesante y desde luego la más relacionada con este trabajo, por lo que será analizada en profundidad en el apartado 2.2.

1.1.5.- Patrones de liberación

La secreción de la prolactina está influida por factores tales como el ritmo circadiano, el estado reproductivo y algunos estímulos esteroceptivos que determinan patrones de liberación específicos.

El ritmo circadiano. Se ha comprobado en varias especies y en los humanos que los niveles de prolactina se encuentran elevados en las horas de sueño y disminuidos en la vigilia. Estudios recientes han clasificado al patrón de la liberación de la prolactina como un ritmo circadiano verdadero, ya que se mantiene en pacientes voluntarios independientemente del estado (sueño o vigilia) relacionándose con el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Así mismo en ratas hay una amplia base bibliográfica que evidencia este patrón (Freeman y cols. 2000). Uno de los moduladores es la dopamina, que inhibe la secreción, y está fuertemente influenciada a su vez por las horas de luz (Ben-Jonathan 1985). A partir de estos resultados se están postulando muchos candidatos en la regulación de la prolactina y la oxitocina es quizá el que parece tener una relación más clara con el mantenimiento del ritmo circadiano de la hormona (Arey y Freeman 1992).

Este patrón base se ve alterado según los diferentes **estados reproductivos** de la hembra y la lactación, mediante el estímulo de succión de los neonatos, es el mejor conocido. Se ha caracterizado clásicamente como un reflejo neuroendocrino, en el que una contracción muscular provocada por un estímulo electromecánico induce la liberación de la hormona (McNeilly 1997). El cese en el estímulo de succión conlleva una disminución gradual de los niveles de la hormona (Nagy y Halasz 1983). La cantidad de prolactina liberada es proporcional al estímulo, y un mayor número de crías mamando inducen niveles más elevados de hormona circulante. Esta afirmación se evidencia en casi todos los mamíferos en los que este patrón se solapa con el circadiano, encontrando mayores niveles circulantes dependiendo de la hora a la que se produzca el estímulo (Arey y cols. 1991).

Otros estados reproductivos en los que los patrones de liberación de la prolactina han sido estudiados son el estro, la cópula y la gestación, aunque los mecanismos de liberación y las interacciones entre las diferentes hormonas resultan complejos y todavía poco conocidos.

Además del ritmo circadiano y de los estados reproductivos, los **estímulos estereoceptivos**, también influyen en el patrón de liberación de la hormona. La luz y en concreto el fotoperíodo, a través del núcleo supraquiasmático, es un regulador fundamental en la secreción de la prolactina, como demuestran hallazgos recientes que evidencian la influencia de las estaciones en el patrón de la liberación de la hormona al comprobar la disminución de los niveles de prolactina con el acortamiento de los días (otoño, invierno) en la oveja y en otros mamíferos estacionales.

El sonido es quizá el menos estudiado de los estímulos estereoceptivos. Se comprobó que los ultrasonidos generados por los cachorros lactantes inducen la liberación de la hormona, que prepara a la glándula mamaria antes de cada toma y favorece la presencia de la hormona en la leche que luego ingerirán.

Los estímulos olfatorios también desempeñan un importante papel en la liberación de prolactina, hasta el punto de que las feromonas secretadas por un macho no conocido en presencia de una ratona gestante pueden producir abortos tempranos debido a la supresión de la prolactina mediada por la dopamina, inhibiendo el estímulo luteotrófico (Rosser y cols. 1989). En ratas lactantes el olor de sus crías estimula la elevación en los niveles de la hormona.

El último estímulo estereoceptivo por analizar, quizá el más controvertido y el más específico de cada especie, es el estrés (Castanon y cols. 1992). Se han empleado incontables estímulos para caracterizar su patrón de liberación, incluyendo variaciones térmicas, hemorragias e incluso el estrés académico en personas (Malarkey y cols. 1991). Como en muchos de los casos el patrón difiere dependiendo del estímulo utilizado no se ha

podido concretar un único mecanismo de liberación. Quizá el hecho más aceptado es que la liberación de prolactina en situaciones de estrés actúa como inmunomodulador, preparando al organismo para afrontar dicho estímulo (Gala 1990).

1.1.6.- Regulación de la secreción de prolactina hipofisaria

Aunque recientemente se ha demostrado que la prolactina se produce en gran cantidad de células, es en la hipófisis donde se centraliza su control y liberación. La secreción de la hormona está influenciada por muchos estímulos, ya tratados en el apartado anterior y como resumen se pueden citar el estrés, el estímulo de succión, los esteroides ováricos y los estrógenos como los principales causantes de la elevación de la prolactina. Todos ellos son valorados por el hipotálamo, que elabora una respuesta en forma de PRF (factores estimulantes de la prolactina) o de PIF (factores inhibidores de la prolactina), que actúan en el lóbulo anterior de la hipófisis a través de la eminencia media o del lóbulo neuro-intermedio. Además existe un control paracrino de otras células hipofisarias sobre los lactótrofos y un control autocrino de los propios lactótrofos, tal como refleja la **Figura I.1**.

Todos los órganos secretores de prolactina están imbricados en su regulación, aunque para su estudio pueden diferenciarse tres apartados: regulación en el sistema nervioso central, regulación intrahipofisaria y regulación en órganos periféricos.

Regulación a nivel del Sistema Nervioso Central: Los mecanismos que controlan esta regulación son quizá los más complejos, ya que dependen del status fisiológico del animal (gestante, no gestante, pseudogestante, en lactación, en un estado de estrés...). Las sustancias encargadas de regular esta secreción se pueden clasificar, en función de su estructura química, en aminas biógenas, neuropéptidos, aminoácidos, transmisores gaseosos y acetilcolina.

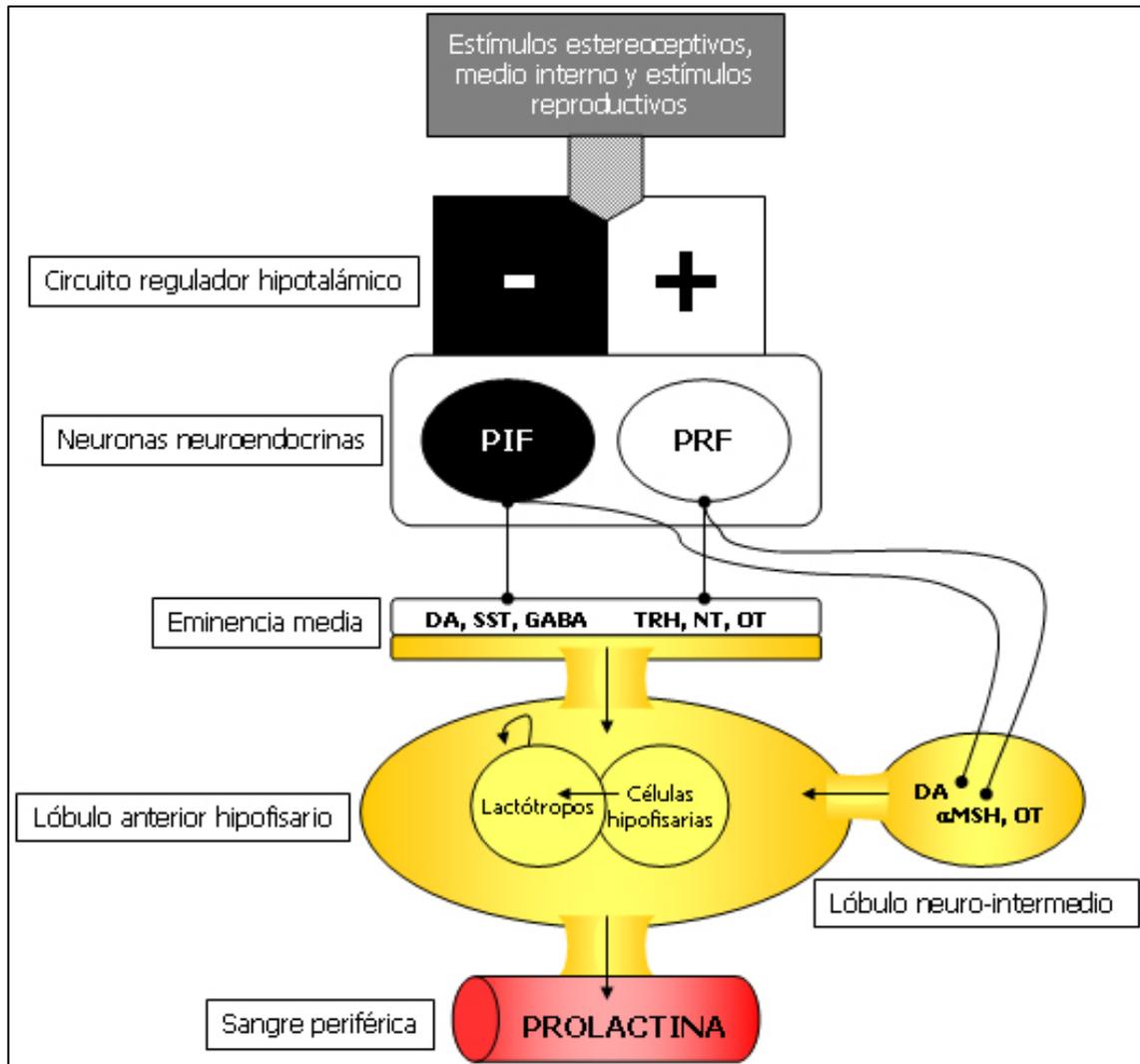


Figura I.1.

Regulación de la secreción de prolactina. DA: dopamina, SST: somatostatina, GABA: ácido γ -amino butírico, TRH: hormona liberadora de tiotropina, NT: neurotensina, OT: oxitocina, α MSH: hormona estimulante α -melanocítica.

En el primer grupo de aminas biógenas se encuentran la dopamina, la norepinefrina, la epinefrina, la serotonina y la histamina. La primera de ellas, la dopamina, es la que tiene mayor relevancia y la más claramente relacionada con este trabajo. Esta amina es el principal factor inhibitorio de la prolactina y se observó que fármacos que afectaban a su metabolismo también alteraban el de la hormona. La dopamina inhibe la liberación hipofisaria de prolactina tanto in vivo como in vitro y por lo tanto resulta obvio que se hayan identificado receptores para la dopamina en las membranas de las células lactótropas, que pertenecen a la subclase D_2 de la familia de los receptores de la dopamina. La relación que se establece entre estas dos sustancias no parece ser un feed-back, sino una desinhibición (Freeman y cols. 2000). La tendencia natural de las células lactótropas es la

producción continua de prolactina en grandes cantidades y el tono dopaminérgico hipotalámico hace que se frene esta producción, de tal forma que cuando la dopamina disminuye los niveles de prolactina en sangre aumentan (Freeman y cols. 2000).

Las otras aminas biógenas tienen acciones opuestas, y mientras la norepinefrina y la epinefrina inhiben la liberación de prolactina, la serotonina in vivo y la histamina la estimulan (Tuomisto y Mannisto 1985). El efecto inhibitorio de la norepinefrina está mediado por los receptores α_1 -adrenérgicos que desempeñan un importante papel en los patrones de liberación mediados por estrés. La serotonina, que estimula in vivo mediante inyección intracerebroventricular o intravenosa en ratas y en humanos, no induce ninguna reacción in vitro (Freeman y cols. 2000).

El segundo grupo de sustancias implicadas en la regulación hipofisaria tras las aminas biógenas son los neuropéptidos. Es una amplia familia que engloba a la TRH, a la oxitocina, a la vasopresina, al VIP, a los opioides, a la angiotensina II, a la sustancia P, a la galanina, a la neurotensina, al neuropéptido Y, a la somatostatina, a la calcitonina, a los péptidos de la familia de la bombesina, a la colecistoquinina, a los péptidos atriales natriuréticos, a las endotelinas y a unos nuevos péptidos liberadores de prolactina. La imbricación exacta de cada una de estas sustancias no es del todo conocida, pero se puede afirmar que la TRH, la oxitocina (Samson y cols. 1986), la vasopresina, el PHI y el PACAP (dentro de la familia del VIP), los opiodes (Sagrillo y Voogt 1991), la angiotensina II (Aguilera y cols. 1982), la sustancia P, la galanina (Guerineau y cols. 1990), la colecistoquinina (Matsumura y cols. 1985) y el nuevo péptido liberador de la prolactina hGR₃ (Hinuma y col. 1998), son fundamentalmente estimuladores de la liberación de la hormona, mientras que la acción provocada por el VIP o por las endotelinas (Kanyicska y cols. 1991) depende del tipo de estímulo o del estado fisiológico, respectivamente. En el caso del neuropéptido Y, de la neurotensina y de la bombesina está implicado el sitio de inyección (Chabot y cols. 1988). El resto de sustancias del grupo de los neuropéptidos, la somatostatina (Patel y Srikant 1986), la calcitonina y los péptido atriales natriuréticos (Duvilanski y cols. 1995) son inhibidores de la hormona.

El tercer grupo son los aminoácidos, que engloban al glutámico, al aspartato, a la glicina, al GABA, al ácido homocisteínico y a la taurina, constituyendo la familia de neurotransmisores más común en los mamíferos (Dingledine y cols. 1990). El glutámico es el principal aminoácido estimulante del hipotálamo neuroendocrino, en concreto del núcleo arcuado y provoca la liberación de la hormona a nivel hipotalámico in vivo (Brann y Mahesh 1997) aunque también se ha demostrado in vitro su actuación sobre células hipofisarias (Login 1990). La relación existente entre el glutámico y la prolactina varía en función de la

preponderancia del PRF sobre el PIF y viceversa (Arslan y cols. 1992), estando por tanto completamente ligado al estado reproductivo del animal (Brann y Mahesh 1997). En el polo opuesto se encuentra el GABA, principal aminoácido del sistema nervioso central que inicialmente al encontrarse receptores en las células del lóbulo anterior de la hipófisis se consideró que tenía actuaciones estimuladoras e inhibitorias, sin embargo sólo ha podido demostrarse la función inhibitoria del aminoácido. Además del bloqueo en la liberación también es capaz de inhibir la síntesis actuando sobre la expresión genómica en los lactótopos (Loeffler y cols. 1985). Descubrimientos recientes ponen en entredicho el papel totalmente inhibitor del GABA sobre el sistema nerviosos central (Wagner y cols. 1997); quizá esta nueva realidad haga cambiar la relación entre el neurotransmisor y la hormona.

Dentro del cuarto grupo, los transmisores gaseosos, se encuadran el óxido nítrico y el monóxido de carbono, que parecen regular en cierta manera la función neuroendocrina y la secreción de prolactina (Brann y cols. 1997). El óxido nítrico es el más estudiado de los dos, y desempeña un papel estimulador sobre el hipotálamo, aumentando la secreción de prolactina (Gonzalez y cols. 1996). A nivel hipofisario sus efectos son controvertidos, (Brunetti y cols. 1995) predominando la función inhibitoria.

La última sustancia, que constituye un grupo ella sola, es la acetilcolina. Una estimulación colinérgica mediante administración sistémica o intracerebroventricular de agonistas, produce una disminución en los niveles de prolactina. El modo de acción de la acetilcolina está relacionado con la estimulación de las neuronas TIDA (tuberoinfundibulares, en la parte dorsomedial del núcleo arcuado) (Haskins y cols. 1981).

Regulación intra hipofisaria: Además de la intrincada regulación hipotálamo-hipófisis, existe una regulación local. Se ha demostrado que en el lóbulo anterior hay mecanismos autocrinos y paracrinos que afectan a la liberación de la prolactina (Schwartz y Cherny 1992). Junto a la regulación paracrina se puede hablar también de regulación yuxtacrina, por las células no lactótopas que ejercen el control sobre las lactótopas y están en contacto íntimo. Los grupos celulares considerados potencialmente en este mecanismo son las células gonadótropas, las corticotropas y las foliculoestrelladas. Han sido innumerables los péptidos relacionados con este mecanismo, desde el VIP, la galanina, la angiotensina II, hasta las endotelinas y el péptido P. Es importante subrayar la función de los factores de crecimiento (TGF- β , EFG, NGF) y de las citoquinas (IL-6 e IL-1). La administración intrahipofisaria de TGF- β suprime la proliferación celular y disminuye el contenido de prolactina y la concentración plasmática de la hormona (Minami y Sarkar 1997). La IL-6, producida por las

células foliculoestrelladas parecen estimular la producción de prolactina tanto in vivo como in vitro (Lyson y McCann 1991).

Incluso se ha comprobado, que la prolactina ejerce un efecto inhibitorio sobre su secreción, activando neuronas dopaminérgicas del hipotálamo (Selmanoff 1985) y actuando sobre las células lactótropas tanto en humanos como en ratas (Kadowaki y cols. 1984). Curiosamente esta capacidad de autorregulación se pierde en la lactación y en los prolactinomas (Freeman y cols. 2000).

Además del lóbulo anterior, la regulación paracrina se desarrolla también en los lóbulos central e intermedio. Las sustancias como el α -MSH, la vasopresina, la oxitocina y la dopamina producidas en estos lóbulos llegan a los lactótrofos a través de los vasos portales cortos, participando así en la regulación de la prolactina. Es reseñable la potente capacidad liberadora de prolactina del α -MSH (hormona estimulante de los melanocitos) que actúa como un PRF puro, considerándolo el responsable de la respuesta ante el estímulo de succión y de la liberación inducida por estrógenos (Hill y cols. 1991).

Regulación en los órganos periféricos: La última parte de la regulación de la liberación hipofisaria de la prolactina es la llevada a cabo por los órganos periféricos, los ovarios, la corteza adrenal, la placenta, el útero no gestante y la grasa.

En los ovarios son fundamentalmente el estradiol, la progesterona y el ratio entre estas dos hormonas los responsables de la liberación de la prolactina. En ratas ovariectomizadas (sin estrógenos), se produce una drástica disminución en el tamaño y número de las células lactótropas y de granulos con prolactina (De Paul y cols. 1997). En estos animales tras la administración de estradiol se recupera el patrón circadiano de liberación de prolactina. Esta hormona actúa sobre la liberación de prolactina en dos niveles, directamente sobre los lactótrofos de la hipófisis y sobre el hipotálamo en las neuronas neuroendocrinas. En el primer nivel resulta crucial el efecto antidopaminérgico (West y Dannies 1980), reduciendo el número de receptores D_2 haciendo de la dopamina un inhibidor mucho menos potente de la prolactina. También se cree que incrementa la sensibilidad de los lactótrofos hacia la TRH (Giguere y cols. 1982).

Sin embargo no resulta tan claro el papel de la progesterona porque investigaciones recientes la señalan como una de las principales sustancias estimulantes de las neuronas THDA (dopaminérgicas tuberohipofisarias), lo que la colocaría en el lado de las inhibidoras de la liberación de la prolactina (Arbogast y Voogt 1993).

La función de la corteza adrenal sobre la secreción hipofisaria de prolactina es discutida. Parece demostrado el hecho del incremento de los niveles de prolactina en ratas

adrenalectomizadas. Efectos similares a la adrenalectomía se obtienen suministrando RU486 (mifepristone), un bloqueante de los receptores de los glucocorticoides (Van der Schoot y cols. 1990). Además de regular la secreción, los corticoides también influyen en la diferenciación y la morfología de los lactótrofos (Carretero y cols. 1997) hacia somatotrofos, suprimiendo los lactótrofos en hipófisis de fetos de rata (Sato y Watanabe 1998).

La placenta de las ratas genera un lactógeno de actividad biológica similar a la de la prolactina hipofisaria y además de mantener la gestación y preparar la glándula mamaria, también interviene en el proceso de liberación de la prolactina hipofisaria. En humanos este lactógeno se ha asociado a la activación de las neuronas TH, provocando la liberación de dopamina y suprimiendo consecuentemente la secreción de prolactina durante las primeras etapas de la gestación (Grattan y Averill 1991).

El útero no gestante es la fuente de una sustancia todavía no tipificada que actúa directamente sobre los lactótrofos inhibiendo la liberación de prolactina (Kanyicska y cols. 1990). Este factor se ha aislado de células epiteliales, del estroma y del miometrio.

El tejido adiposo, es el último tejido implicado en la regulación de la secreción de prolactina. Se ha comprobado desde hace tiempo la relación existente entre el status nutricional y la capacidad reproductiva (Cunningham y cols. 1999). La leptina es un producto generado por este tejido que actuó en el sistema nervioso central regulando la ingesta y el peso (Houseknecht y cols. 1998). Esta sustancia estimula la liberación de prolactina in vitro en células de la hipófisis (Yu y cols. 1997). In vivo se ha demostrado que la inyección de prolactina eleva los niveles de leptina (Gualillo y cols. 1999), estando ambas imbricadas en el control del balance energético y reproductivo (Cincotta y Meier 1989).

1.2.- La prolactina y el sistema inmune

1.2.1.- Relación con el sistema inmune e implicación en diversas patologías

La colaboración en los fenómenos inmunitarios es otra de las numerosas funciones de la hormona; por su relevancia y la relación con este trabajo se revisan en un apartado ad hoc.

Tradicionalmente se había considerado al sistema inmune un ente autónomo sin influencia por parte de las hormonas sexuales, tiroideas, suprarrenales o hipofisarias (Duran Chavez y Diaz Cristerna 1993). Hace unos años se demostró la función inmunorreguladora de la prolactina en mamíferos y aves, observando una relación recíproca entre la secreción de la hormona y la adecuada ontogenia, el perfecto desarrollo y funcionamiento, así como la correcta maduración de los tejidos del sistema inmune (Skwarlo-Sonta 1992). Estos hallazgos se realizaron casualmente, cuando se estaban desarrollando estudios con ratas hipofisectomizadas en las que se observaron numerosos desórdenes inmunitarios, linfopenia, atrofia del timo . . . , que no eran explicables con el paradigma del sistema endocrino y el sistema inmune como elementos independientes (Bouchard y cols. 1999). También se observaron en enanos hipofisarios estas deficiencias de la inmunidad celular y humoral, que se corregían al administrar GH y prolactina (Gala 1991). A partir de estos hechos se empezaron a investigar las imbricaciones entre el sistema inmune y el neuroendocrino (Berczi 1994; Dardenne y Savino 1996) considerándo a la prolactina como la llave entre ambos (Matera y cols. 2001). En la actualidad la prolactina no se considera un péptido mamotrópico, si no una citoquina pro-inflamatoria con efecto inmunomodulador (Hinterberger-Fischer 2000), muy semejante a la eritropoyetina, al GM-CSF, a la IL-2 y a la IL7 (familia citoquinas/células hematopoyéticas) (Oberholtzer y cols. 1996). Los trabajos relacionando esta hormona con el sistema inmune en mamíferos son numerosos (Gala 1991; Kelley y cols. 1992; Lavallo 1992; Di Carlo y cols. 1992; Berczi 1994; Murphy y cols. 1995; Hooghe-Peters y Hooghe 1998; Neidhart 1998; Walker y cols. 1998; Buckley y Buckley 2000; Dorshkind y Horseman 2000; Montero y cols. 2000), e incluso se ha observado esta relación en aves y en peces teleosteos (Skwarlo-Sonta 1990; Skwarlo-Sonta 1992; Narnaware y cols. 1998; Nevid y Meier 1995).

Prácticamente todas las investigaciones referentes a la hormona, llevadas a cabo en la actualidad, están encaminadas a dilucidar el papel de esta en el sistema inmune. Aun quedan muchos puntos que aclarar y en otros muchos hay resultados contradictorios. Un hecho comprobado es el hallazgo de RNAm de la hormona en un gran número de líneas celulares inmunitarias y tejido hematopoyético, con mayor concentración en médula ósea

que en timo. Se demostró la presencia en neutrófilos, fibroblastos, macrófagos y linfocitos B y T de sangre periférica de ratón y rata (Gagnerault y cols. 1993). Kooijman y cols. en el 2000 también evidenciaron la producción de hormona, así como de variantes en peso molecular (isoformas), pero bioactivas por todas estas células, encontrando además receptores ubicados en stem cell medulares, en linfocitos B y T, sobre todo en T, en monocitos, en NK y en neutrófilos, lo que sugiere la función paracrina o autocrina de la prolactina en los órganos linfoides periféricos y centrales (Kiess and Belohradsky 1986; Gala 1991 Dardenne y cols. 1994; Draca 1995; Bouchard y cols. 1999; Montero y cols. 2000; Vera-Lastra y cols. 2002). La gran cantidad de células secretoras, y la existencia de receptores en estas mismas podría hacernos pensar en un cierto descontrol e inespecificidad, que no es tal, ya que la existencia a su vez de múltiples subunidades en los receptores y la complejidad en la transmisión intracelular de la señal garantizan una alta especificidad en cada tipo de las diferentes células del sistema inmune (Matera 1997).

También es un hecho demostrado la función que desempeña la hormona junto a la GH en la organogénesis, relacionándose directamente con el desarrollo de los órganos linfoides primarios (médula ósea, bolsa de Fabricio en aves y timo) y secundarios (bazo, linfonodos y MALT), con la regeneración tisular, (Skwarlo-Sonta 1992; Draca 1995; Murphy y cols. 1995; Anisman y cols. 1996; Karabulut y Pratten 1998; Vera-Lastra y cols. 2002), con la maduración de los linfocitos (Matera y cols. 2000) y junto con el GM-CSF regulando la maduración de las células dendríticas (Matera y cols. 2001), cada vez más relevantes dentro de la respuesta inmune. De acuerdo con estos datos se ha evidenciado el importantísimo papel del condicionante genético en los niveles de expresión del gen de la prolactina así como en el grado de desarrollo de todos estos tejidos (Grossman 1989). Además de coadyuvar en el desarrollo tisular, regula la proliferación y la función de los linfocitos y la producción de inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas (Kiess y Belohradsky 1986; Giusti y cols. 1999), modifica la diferenciación, proliferación y supervivencia celular, y modula la respuesta inmune e inflamatoria (Yu-Lee 2002). Dicha acción inmunomoduladora se concreta en su capacidad para reconstituir el status inmune en ratas hipofisectomizadas o estimularlo mediante un patrón bifásico en animales con niveles bajos de hormona, en los que la inmunidad está totalmente alterada (Spangelo y cols. 1987; Cesario y cols. 1994). También en ratones enanos hipofisarios restaura la inmunocompetencia al ser administrada (Russell 1989; Gala 1991). La inmunomodulación que produce la hormona es positiva, estimulando la respuesta inmune frente a mitógenos (in vitro) y frente a antígenos (in vivo) (Leanos Miranda y cols. 1997; Montero y cols. 2000). Dos ensayos demostraron este papel inmunoestimulante de la prolactina: Meli y cols. en 1996 redujeron la mortalidad de ratones

infectados con *Salmonella typhimurium* administrándoles prolactina ovina, y anteriormente Di Carlo y cols. en 1993 habían demostrado un cierto grado de protección frente a *Salmonella typhimurium* en ratón usando prolactina recombinante humana.

Las características de dicha estimulación son básicamente dos: sigue un patrón circadiano y presenta dimorfismo sexual. El ritmo circadiano de la hormona existe en todas las especies, incluso en los peces (Nevid y Meier 1995), estando influenciado por las horas de luz y por otros factores como el estrés, que aumenta los niveles de la hormona en algunas especies y en otras como en los hámsters sirios, sobre todo en los machos subordinados, los disminuye (Huhman y cols. 1995). El fotoperíodo, además de elevar los niveles de prolactina, actúa sobre la inmunidad mediante los corticoides y la melatonina (Nelson y Demas 1996). Los niveles bajos de la hormona se dan sobre todo en los días cortos (otoño e invierno), habiéndose demostrado una correlación entre este hecho y la presencia de infecciones oportunistas y de ciertos tipos de cáncer (Nelson y Demas 1996). La asociación entre la prolactina, fotoperíodo e inmunidad es patente por ejemplo en los hámsters en los que la estimulación linfóide producida por la hormona es mucho mayor a las 10 horas después amanecer que a las 15 horas; incluso la prolactina puede llegar a inhibir esta estimulación entre las 18 y las 23 horas (Cincotta y cols. 1995). También se ha demostrado en los monos *rhesus*, portadores del *campilobacter*, una sintomatología intestinal estacional dependiente de la bajada en los niveles de prolactina (Mann y cols. 2000).

La segunda característica de la estimulación producida por la prolactina es la existencia de un marcado dimorfismo sexual. La respuesta inmune difiere en machos y en hembras, estas últimas parecen tener una mayor capacidad defensiva, dependiente de la concentración de esteroides sexuales, de GH y de prolactina (Grossman y cols. 1991). Tanto la inmunidad humoral como la celular son más activas en hembras; este mecanismo puede resultar compensatorio al estrés producido por la reproducción (Grossman 1989). Un hecho que demuestra esta hipótesis es la menor resistencia y la predisposición a sufrir complicaciones por sepsis tras un trauma hemorrágico en los varones (Angele y cols. 2000). La prolactina contrarresta la inmunodepresión producida por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en ratones hembra sometidos a sangrado severo, restaurando los niveles de linfoproliferación de los esplenocitos 2 horas después del sangrado (Zellweger y cols. 1996), y para demostrarlo definitivamente, Nickel y cols. en 2002 usaron ratones machos y hembras a los que se les provocó un trauma hemorrágico. La administración de prolactina en ratones machos tras la hemorragia previno la inmunodepresión de la respuesta inmune celular, que no llegó a producirse en los ratones hembra. Por lo tanto la hipoprolactinemia daña el sistema inmune mientras que una hiperprolactinemia crónica puede inducir autoinmunidad (Chikanza 1999),

así el exacerbamiento de la respuesta inmune celular en las hembras tiene la contrapartida de predisponerlas a padecer enfermedades autoinmunes como el lupus sistémico, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple, con mayor frecuencia que los varones (Grossman y cols. 1991).

Otra de las consecuencias de la estimulación de la inmunidad retardada por parte de la prolactina es la activación de las reacciones de rechazo de trasplantes e injertos (Shen y cols. 1992) y para contrarrestar este efecto ya se está usando una droga, la bromocriptina, que produce una hipoprolactinemia que induce inmunosupresión y mejora la tolerancia al trasplante (Compton y cols. 1994; Martinelli y cols. 1996).

En contraposición a estos "efectos adversos" de la prolactina, se vislumbran varios posibles usos terapéuticos basados en el incremento de la respuesta antiinflamatoria y antitumoral que la situaría como una opción terapéutica en pacientes inmunocomprometidos y con cáncer (Matera y cols. 2000). Un claro ejemplo es el antagonismo de la prolactina sobre el TGF β , una citoquina inmunosupresora asociada a la evolución de ciertos tipos de cáncer y al SIDA (Murphy y cols. 1995; Richards y cols. 1998). También es fundamental su papel supresor sobre la apoptosis, que regula el pool de linfocitos (Buckley y Buckley 2000) y sirve como cofactor para la regulación del receptor del CD25 en pacientes con cáncer de mama y con niveles de prolactina menores (Bauernhofer y others 2003). El hallazgo más reciente es la posible implicación de la prolactina en pacientes de VIH+ con buen pronóstico (Galli y cols. 2003).

1.2.2.- Mecanismos de actuación

El mecanismo de acción de la hormona sobre la respuesta inmune es complejo y todavía hoy no está muy bien caracterizado. Parece ser que las diferentes isoformas de la hormona mantienen regulaciones diferentes: La producida por las células del sistema inmune interacciona con citoquinas linfocíticas regulando la propia liberación de la hormona en el sitio de la respuesta inmune, y por el contrario la de origen hipofisario está bajo el control del sistema inmune (estimulo no cognitivo) y del sistema nervioso central (estímulo cognitivo) (Matera 1997) mediante la actuación de los centros corticales y subcorticales (Kiess y Belohradsky 1986). En el apartado 1.1.6 ya se abordó la regulación y el mecanismo de acción de la prolactina hipofisaria, tratándose en esta sección únicamente de la originada en el sistema inmune. La prolactina de origen inmune transmite su señal al interior de las células hasta el núcleo, a través de receptores en linfocitos, y da lugar a la expresión de algunos genes y a la síntesis de proteínas (Skwarlo-Sonta 1992). Esta relación con la transcripción genómica es recíproca, la prolactina interviene en la transcripción genómica de los linfocitos (Yu-Lee y cols. 1990) y la respuesta inmune in vivo regula la expresión

genómica de la prolactina (Shen y cols. 1992), estableciéndose un feed-back entre respuesta inmune y prolactina controlado por numerosas citoquinas.

El proceso molecular del que se sirve la hormona implica la estimulación de receptores específicos de superficie en linfocitos T, similares a los de la IL-12, utilizando después una ruta clásica de cascada de receptor de protein kinasa y una activación mediante translocación nuclear (Skwarlo-Sonta 1992; Prystowsky y Clevenger 1994). Concretamente la transducción de la señal se lleva a cabo a través de una Janus tirosin kinasa y por un STAT (Goffin y cols. 1999). Además de actuar en las células del sistema inmune la prolactina estimula la activación de la proteina kinasa C en el bazo y en el hígado, lo que explica su implicación en el crecimiento junto a la GH (Russell 1989).

1.2.3.- Macrófagos, NK y linfocitos T citotóxicos

La influencia de la prolactina en la inmunidad celular es muy relevante y parece controlar la expresión de la respuesta Th1/Th2. El esquema de esta respuesta comienza en las células dendríticas, con la presentación de los antígenos a los linfocitos T helper (CD4+), divididos en dos subpoblaciones Th1 y Th2 que son indistinguibles morfológicamente. La separación es exclusivamente funcional y está basada en las interleucinas que producen:

Los Th2 generan IL-3, IL-4 y TNF β entre otras, que activan a los linfocitos B y a las células plasmáticas dando lugar a una respuesta humoral con elevada producción de anticuerpos.

Los Th1 producen INF γ , IL-2 e IL-12 entre otras, que inducen una respuesta celular con activación de linfocitos citotóxicos (CD8+), macrófagos y células NK.

Obviamente la respuesta no está tan polarizada, encontrando en el mismo animal ambas en equilibrio. Además existe otra subpoblación, Th3, que se encarga de modular a las otras dos (Neurath y cols. 2002). De forma esquemática la articulación de estas respuestas se resume en la **Figura I.2.**

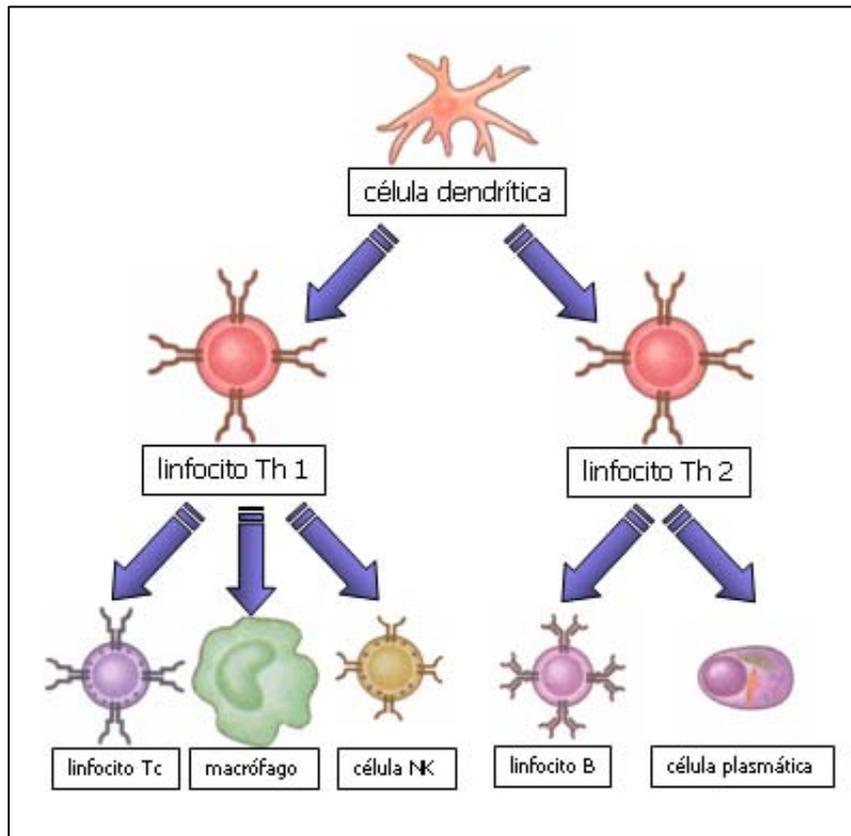


Figura I.2.

Paradigma Th1/Th2.

Esquema de la respuesta inmune humoral y celular

Parece claro que la prolactina actúa principalmente sobre la respuesta innata no específica (Di Carlo y cols. 1993). La hormona no sólo estimula la respuesta Th1 si no que suprime la Th2, este hecho ha sido recientemente demostrado por Youn y cols. en 2002 usando ratones tratados con bisfenol, una droga que aumenta los niveles de prolactina circulantes. Esta relación con la inmunidad celular ya se había observado mientras se estudiaban potentes drogas inmunosupresoras de este tipo de respuesta (Th1). Fueron Bernton y cols. en 1992 usando bromocriptina -capaz de disminuir la respuesta inmune retardada, la activación macrófaga T dependiente y la proliferación de linfocitos T y B in vitro al igual que los glucocorticoides, la ciclosporina A y la cisteamina- los que comprobaron que la mayoría de estas drogas reducían los niveles de prolactina circulantes suprimiendo la respuesta blastogénica de los linfocitos en ratones. Si a estos mismos ratones se les administraban drogas que aumentaban la liberación de prolactina o prolactina exógena, se antagonizaban todos los efectos inmunosupresores de las drogas anteriores. Sin embargo el efecto de los niveles de prolactina sobre la inmunidad celular no es directamente proporcional, y se ha comprobado que tanto la hipoprolactinemia como la hiperprolactinemia mantenida resultan inmunosupresoras (Matera 1997). Para mantener un estado inmune

competente se necesitan niveles fisiológicos, aunque parece que moderados incrementos de prolactina en momentos de inmunosupresión mediada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, pueden contrarrestarlo (Matera 1997).

Cuanto más se profundiza en el estudio de la hormona y de sus isoformas, más se concretan las diferencias entre ellas. Hay variedades, las de mayor peso molecular, que no parecen producir efecto alguno sobre el sistema inmune como se observó en personas con hiperprolactinemia crónica producida por un macroprolactinoma sin inmunoestimulación medible (Koller y cols. 1997), y sin embargo las otras isoformas son capaces además de modular la respuesta inmune, y de incrementar la respuesta antiinflamatoria y antitumoral (Matera y cols. 2000).

El papel inmunomodulador de la respuesta inmune de la prolactina está sobradamente demostrado, activándola o inhibiéndola en función de su concentración (Matera y cols.1989), pero la influencia sobre cada tipo celular es aun controvertida.

Las células dendríticas son las encargadas de presentar el antígeno, entre otras células, a los linfocitos T helpers. Cada día están cobrando mayor importancia y no se consideran ya unas meras espectadoras, inclinando la balanza inmunitaria según la manera en que presentan los antígenos. La prolactina está implicada en la maduración de estas (Matera y Mori 2000) regulándola junto con el GM-CSF. Además influye sobre la tasa de presentación antigénica y una mayor concentración de prolactina aumenta la tasa de presentación, comprobándose que altas concentraciones de prolactina aumentan la permisividad en la presentación, iniciándose una respuesta frente al MHC que puede ser la explicación a la relación entre hiperprolactinemia y autoinmunidad (Matera y cols. 2001).

Los linfocitos se encuentran divididos en varias familias que incluyen a los linfocitos T helpers o colaboradores, T supresores, T citotóxicos y linfocitos B. La prolactina actúa especialmente sobre los Th1 y los T citotóxicos, aunque se hayan identificado receptores específicos también en los NK (Draca 1995). Parece claro que la hormona participa en la diferenciación temprana y tardía de los linfocitos T (Matera y Mori 2000), regula la respuesta local (Matera and others 2001) y además modula su reactividad (Hiestand y cols. 1986), aunque la mayor parte de los datos están elaborados en ensayos in vitro. En estos experimentos, por ejemplo mediante el uso de ciclosporina, se demuestra la relación de la hormona y la competencia linfocitaria, observando como la unión de la ciclosporina a los linfocitos T en el receptor de la hormona la desplaza, y adicionando nuevamente prolactina recombinante al cultivo, se restaura la competencia inmune (Hiestand y cols. 1986; Pichler

1987). Además de la funcionalidad la prolactina estimula la proliferación linfoide; incluso se ha encontrado un péptido específico similar a la prolactina segregado por los esplenocitos murinos que resulta imprescindible para la proliferación linfoide (Montgomery y cols. 1987). Mediante estudios de linfoproliferación en los que se valora la incorporación de [3H] timidina en el DNA de linfocitos, se ha demostrado la activación linfocítica que produce la hiperprolactinemia en esplenocitos de ratas tratados con metoclopramida, una droga hiperprolactinemiante (Zerek-Melen y cols. 1990). La prolactina participa también en la activación linfocitaria y en particular en la citotoxicidad de los NK y de los LAK, CD56+, CD16+ incrementándola cuando se encuentra en condiciones fisiológicas y supra fisiológicas (Matera y cols. 1999). Sin embargo la hiperprolactinemia patológica, es decir tumoral o autoinmune, deteriora el estado citotóxico de las NK y de los linfocitos T (Kadioglu y cols. 2001).

Los macrófagos son unas de las células efectoras más importantes de la respuesta inmune celular, y también en éstas se han encontrado receptores para la prolactina (Thorat y cols. 1993). Es quizá en los macrófagos en donde está ampliamente aceptado el papel inmunoregulador y activador de la fagocitosis de la prolactina (Gaytan y cols. 1994; Ortega y cols. 1996; Meli y cols. 1996; Zhu y cols. 1997). Hay numerosos ensayos usando diferentes modelos animales que lo confirman; Di Carlo y cols. en 1993 en ratas in vivo, demostraron la activación sin movilización desde otras localizaciones, subrayando así la regulación producida por la prolactina en la inmunidad no específica. La misma observación la realizó Ortega y cols. en 1996 usando macrófagos peritoneales de ratón in vitro con dosis de prolactina semejantes a la hiperprolactinemia. Más tarde, en teleosteos Narnaware y cols. en 1998 inyectaron prolactina ovina intraperitoneal encontrando un incremento de la activación de la capacidad fagocitaria y del número de linfocitos circulantes. Incluso en aves, la incubación in vitro de heterófilos con prolactina ovina hace incrementar su capacidad fagocítica, la destrucción de partículas fagocitadas y el test de reducción del NBT (nitroazul de tetrazolio), además in vivo se obtienen los mismos resultados en la fase final de la incubación cuando los niveles de prolactina están elevados (Rodríguez y cols. 1996).

El mecanismo molecular por el que la prolactina consigue esta activación macrofágica está bien estudiado, la primera observación fue la realizada por Edwards y cols. en 1992 al administrar GH y prolactina, comprobando un incremento de la producción de $INF \gamma$ y del anión superóxido. Un año después se corroboró este hallazgo usando macrófagos peritoneales de ratones tratados con prolactina en los que estaba aumentada la producción de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno (Chen y Johnson 1993). La misma

observación realizaron Warwick-Davies y cols. en 1995 usando monocitos. Hasta ese momento se habían implicado como causantes de la activación macrofágica al $\text{INF } \gamma$, al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno; en 1996 un experimento realizado por Meli y cols. comprobó la acción profiláctica de la prolactina recombinante humana frente a *Salmonella typhimurium*, implicando al óxido nítrico como elemento fundamental. Si se trataba a los ratones con un inhibidor de éste (L-NAME) se revertía totalmente el papel protector de la prolactina. Este importantísimo hallazgo ha sido relacionado recientemente con un nuevo papel de la prolactina. La hormona consigue estimular a los macrófagos peritoneales hacia un estado tumoricida, aumentando la producción de NO_2 , de óxido nítrico sintasa y de O_2 en estos macrófagos (Raso and others 1999). In vivo la administración de prolactina inhibe la progresión del carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) en ratones (Majumder y cols. 2002), incrementando la citotoxicidad frente a tumores, aumentando el tiempo de supervivencia y disminuyendo el número de metástasis (Sun y cols. 2002).

Las células NK representan una subpoblación linfocítica derivada de la médula ósea y diferente de los linfocitos B y T que actúan en la respuesta inmunitaria innata para destruir células infectadas por microorganismos. Este grupo celular es uno de los más controvertidos en su relación con la prolactina. Inicialmente se relacionó la hiperprolactinemia patológica (tumoral o autoinmune) con una reducción de la actividad y del número de células NK, que se restablecía en pacientes tratados con bromocriptina (Gerli y cols. 1986). Posteriormente se volvió a reseñar esta pérdida de actividad en la hiperprolactinemia del puerperio (Nicoletti y cols. 1989), y prácticamente al mismo tiempo se decía que la prolactina no interfería en la funcionalidad de estas células (Matera y cols. 1989). Tres años después se volvió a asociar la hiperprolactinemia con la reducción en la funcionalidad de las células NK (Vidaller y cols. 1992). El primer trabajo que presenta la prolactina junto a la IL-12 como dos potentes inductores de la activación de las NK fue el de Cesano y cols. en 1994. Después se tipificaron receptores específicos para la hormona (Draca 1995) y se delineó una relación más compleja dependiente de la concentración de la hormona (Chakraborty y cols. 1996). A partir de entonces se comenzaron a asociar los altos niveles de $\text{INF } \gamma$ inducidos por la prolactina con la activación de las NK (Matera 1997), tanto a niveles fisiológicos como suprafisiológicos (Matera y cols. 1999), considerando incluso a la prolactina y a la GH, y no a la presencia de antígenos, como los verdaderos reguladores del número de células y del aumento de celularidad en la médula ósea (Berczi y cols. 2000; Sun y cols. 2002). Sin embargo todavía sigue habiendo resultados contradictorios respecto a la relación entre estas células y la prolactina a altas concentraciones; algunos estudios apuntan la posibilidad de

que estos niveles no afecten o incluso inhiban la citotoxicidad cuando se encuentra en una concentración 10 veces superior (Montero y cols. 2000; Matera y Mori 2000), y otros sin embargo señalan que a altas concentraciones aumentan la actividad de las NK (Brand y cols. 2001). Dejando a un lado estos resultados complejos de interpretar, parece respaldada por todos la diferenciación entre los tipos de hiperprolactinemia y su relación con el sistema inmune, afectando negativamente al estado citotóxico de las NK la hiperprolactinemia de origen patológico (Kadioglu y cols. 2001).

1.2.4.- Interleucinas

Las interleucinas son citoquinas estructuralmente definidas con independencia de su fuente o de su diana, y su principal función es la de servir de mediadoras entre las células del sistema inmune, modulando las reacciones inflamatorias e inmunitarias. Como posteriormente se describirá en el apartado 2.2.1, las diferentes citoquinas conducen o polarizan la respuesta inmune hacia patrones Th1, Th2 o mixtos. Desde la introducción de técnicas de biología molecular como la estimulación linfocítica o la RT-PCR se pueden cuantificar, también se puede identificar el tipo celular del que provienen y bajo que estímulos o condiciones se producen.

La prolactina se considera hoy en día una citoquina de origen linfocitario (O'Neal y cols. 1992) que comparte similitudes en estructura y función con los factores hematopoyéticos y con las otras citoquinas (Matera y cols. 2000). La principal acción de ésta es incrementar la linfoproliferación, incluso en linfocitos aviáres (Ibars y cols. 1997) y aumentar la transcripción de los genes de otras citoquinas (Zhu y cols. 1997) principalmente la IL-2, la IL-12 y el $INF\gamma$, aunque también incrementa el efecto del $TNF\beta$, GM-CSF y de la IL-3 en la diferenciación y proliferación de progenitores mieloides (Oberholtzer y cols. 1996; Schneider y cols. 1996; Majumder y cols. 2002). Tanto el $INF\gamma$ como la IL-2, como la IL-12 son citoquinas que conducen a una respuesta inmune celular o mediada por Th1.

La IL-2 es una citoquina originada en los linfocitos T activados por el antígeno, y está implicada en la estimulación de la proliferación y de las funciones efectoras de las células T y de las NK. Entre esta interleucina y la prolactina existe una gran imbricación e incluso para la síntesis de IL-2 se requiere la presencia de prolactina exógena que se internaliza y realiza su función en el núcleo (Clevenger y cols. 1990). Se ha observado que la prolactina induce la expresión de IL-2, aumentando la linfoproliferación y el número de CD8 en cultivo de esplenocitos de rata, de células NK y de células LAK (Viselli y cols. 1991; Tsai y Heppner

1994; Cesano y cols. 1994; Chakraborty y cols. 1996; Richards y cols. 1998; Hinterberger-Fischer 2000; Montero y cols. 2000). Esta relación es recíproca ya que para ejercer su efecto linfoproliferativo in vitro, la prolactina necesita de IL-2 (Gushchin y cols. 1995). Esta estrecha cooperación se ha observado con mayor intensidad en las células NK en las que la síntesis de INF-gamma mediada por IL-2 está incrementada con niveles fisiológicos de prolactina. Inesperadamente se encontró la misma interacción entre la prolactina y la IL-12 pero únicamente a altas concentraciones de prolactina (Matera y Mori 2000). Por otra parte la hiperprolactinemia patológica hace disminuir los niveles de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T (Vidaller y cols. 1986).

El interferón gamma es otra citoquina producida por los linfocitos T y por las células NK, encargada de activar los macrófagos. La prolactina consigue estimular la producción de esta citoquina (Rovensky y cols. 1995; Warwick-Davies y cols. 1995; Richards y cols. 1998; Matera y cols. 1999; Montero y cols. 2000; Brand y cols. 2001; Youn y cols. 2002; Majumder y cols. 2002) por parte de los linfocitos T, en presencia de IL-12 e IL-2 (Matera y Mori 2000), activando de esta forma a los monocitos, macrófagos (Edwards y cols. 1992) y a las células LAK y NK. En estudios in vitro usando cultivos celulares se ha observado que la producción de $INF\gamma$ sigue un patrón de amplificación dosis dependiente respecto a la prolactina (Cesario y cols. 1994; Breidhardt y cols. 2002).

Se ha estudiado menos la relación entre la prolactina y la respuesta inmune Th2. En 1998 Richards y cols. apuntaron la posible relación entre el $TGF\beta$ y la prolactina, demostrando que la hormona antagoniza el efecto inmunosupresor del $TGF\beta$. Esta citoquina de corte Th2, se encarga de inhibir la activación macrofágica y de contrarrestar el efecto de las citoquinas pro-inflamatorias y también se la ha relacionado con enfermedades como el cáncer o el SIDA.

1.2.5.- El fenómeno de la autoinmunidad

Puede entenderse este fenómeno como un estado en el que el sistema inmunitario adaptativo responde a los antígenos propios, con reacciones similares a las que emplearía frente a agentes patológicos. En las enfermedades autoinmunes tanto la apoptosis, o muerte celular programada, como la autotolerancia desempeñan un papel crucial, y la prolactina ha sido relacionada con estos tipo de patología desde 1991 hasta la fecha en numerosas ocasiones (Buskila y cols. 1991; Di Carlo y Meli 1991; Grossman C. J. y cols. 1991; Lavallo 1991; Lavallo 1992; Walker 1993; Murphy y cols. 1995; Wilder 1995; Vera-Lastra y cols.

2002). El mecanismo puede estar relacionado con el aumento de la permisividad en la presentación de antígenos, iniciándose una respuesta frente al MHC (Matera y cols. 2001). Por ejemplo durante una infección, en la fase febril, las citoquinas inician una respuesta aguda caracterizada por fiebre, inactividad, fatiga, anorexia, catabolismo. Reactantes de fase aguda se producen en el hígado, se incrementa la actividad medular activándose el metabolismo leucocitario y se suprime la respuesta inmune específica (Phelps y cols. 2001). Cualquier defecto en estos acontecimientos o en los ejes de conducción pueden desencadenar disfunciones inmunes como enfermedades reumáticas, inflamaciones crónicas, síndrome de la fatiga crónica y fibromialgia (Anisman y cols. 1996). Es la complejidad de estos procesos y quizá una predisposición genética los desencadenantes de una respuesta autoinmune; además el género femenino con mayor capacidad de respuesta inmunitaria, también presenta mayor predisposición para padecer trastornos como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple (Grossman C. J. y cols. 1991). En todas estas enfermedades se están encontrando niveles elevados de prolactina, aunque realmente su bioactividad está disminuida (Anisman y cols. 1996). Otro hecho que reafirma el papel de la prolactina en las enfermedades autoinmunes es el uso experimental de un agonista D₂ dopaminérgico, la bromocriptina, como inhibidor de la prolactina y modulador de la respuesta linfocitaria hacia los antígenos. El mecanismo concreto por el que la hipoprolactinemia produce la inmunosupresión está mediado por la disminución en la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T (Morikawa y cols. 1994; Buskila y Shoenfeld 1996; McMurray R. W. 2001).

La hiperprolactinemia continuada se ha relacionado con un gran número de enfermedades autoinmunes como el lupus, el síndrome de Reiter (Leanos Miranda y cols. 1997; Walker y Jacobson 2000), la artritis reumatoide juvenil y adulta, la tiroiditis autoinmune (Velkeniers y cols. 1998; Giusti y cols. 1999), la esclerosis múltiple, e incluso el rechazo del trasplante cardiaco (Chikanza 1999). De todas ellas las tres que se han estudiado con mayor profundidad son la esclerosis múltiple, el lupus y la artritis reumatoide.

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune causada por la inflamación e infiltración de monocitos en placas, produciendo desmielinización del cerebro y de la médula espinal. La hiperprolactinemia está implicada en su desarrollo (Draca y Levic 1996; Heesen y cols. 2002) y la bromocriptina también se está usando en modelos animales como tratamiento contra los brotes (Dijkstra y cols. 1994).

En el lupus la relación entre prolactina y la enfermedad ha sido demostrada en diversas ocasiones (Gutierrez y cols. 1995; Anisman y cols. 1996; Elbourne y cols. 1998; Walker y cols. 1998; Walker y Jacobson 2000; Jara y cols. 2001), encontrándose niveles muy elevados

de la hormona en el 20% de los enfermos (Walker y Jacobson 2000). Una prueba más de esta relación es el uso en ratones B/W, modelo del lupus eritematoso, de bromocriptina (Walker 2001) que consigue disminuir los anticuerpos anti-DNA y las IgG, aumentando la esperanza de vida (McMurray R. y cols. 1991).

Otra de las enfermedades autoinmunes en la que la prolactina está implicada es la artritis reumatoide (Walker y Jacobson 2000). En 1993 Berczi y cols. relacionaron la artritis reumatoide con una cierta disfunción en las hormonas hipofisarias y ya en 1998 Neidhart comprobó que las ratas con artritis y los ratones con artritis inducida por colágeno tipo 2 presentaban hiperprolactinemia crónica. Resulta curioso el patrón de presentación de la enfermedad que presenta un ritmo diurno (Zoli y cols. 2002), disminuye en la gestación por el predominio Th2 (Biesiada y cols. 2001), y se exacerba en la menopausia (descenso de estrógenos) y en la lactación (aumento de prolactina con descenso de hormonas gonadales) (Wilder 1996). También en esta enfermedad resulta de utilidad el uso de bromocriptina (Figuroa y cols. 1998).

1.3.- La hematopoyesis y la prolactina

La hematopoyesis es el desarrollo de las células sanguíneas maduras, hematíes, leucocitos y plaquetas, a partir de células madre pluripotenciales en la médula ósea y en el hígado del feto. Este complejo proceso se encuentra regulado por diferentes citoquinas producidas en la médula ósea, en los linfocitos T y en otros tipos celulares. El sistema inmune y la hematopoyesis muestran una clara interacción a través de muchas interleucinas y factores estimulantes del crecimiento. La misma prolactina está encuadrada hoy en día dentro de la familia citoquinas/células hematopoyéticas, siendo estructuralmente muy parecida a la eritropoyetina, al CSF-GM, a la GH, a la IL-2 y a la IL-7 (Chikanza 1999). Al igual que con la inmunidad, a partir de los trastornos hematopoyéticos aparecidos en animales hipofisectomizados se empezó a relacionar las hormonas hipofisarias con el proceso hematopoyético. Tanto la GH como la prolactina parecen tener propiedades estimuladoras del crecimiento y de la proliferación celular (Murphy y cols. 1992; Hooghe-Peters y Hooghe 1998; Welniak y cols. 2000; Ko y cols. 2003), influyendo en el desarrollo hematopoyético. Además se han encontrado receptores para la hormona en las stem cells medulares. Esta relación se ha comprobado tanto in vitro como in vivo (Richards y Murphy 2000); cuando se tratan ratones con prolactina recombinante humana durante cuatro días y posteriormente se eutanasian y se recogen las células esplénicas, muestran unidades formadoras de colonias, tanto GM, como BFU-e en un número significativamente superior a los controles (Woody y cols. 1999).

Además de los estudios acerca de la relación con la hematopoyesis global, se han hecho otros centrados, en la eritropoyesis y en la mielopoyesis. En lo referente a la primera, la eritropoyesis, la prolactina la promueve, así como la síntesis de DNA por parte de los precursores medulares (Arkins y cols. 1993). Otro trabajo refiere la cooperación existente, in vitro, entre la prolactina, el CSF-GM, y la IL-3 para la diferenciación eritroide. Además si se adiciona al medio de cultivo anticuerpos anti-prolactina la formación de BFU-e se disminuye, restaurándose al adicionar PAF (factor activador plaquetario) que estimula la producción de prolactina (Bellone y cols. 1997).

La relación entre la mielopoyesis y la prolactina parece ser similar a la observada en la eritropoyesis, la hormona incrementa el efecto de GM-CSF y de la IL-3 en la diferenciación y proliferación de progenitores mieloides (Oberholtzer y cols. 1996), además de aumentar la función celular (Richards y Murphy 2000).

También hay estudios que demuestran esta capacidad estimulante de la proliferación y diferenciación en los megacariocitos (Zhou y cols. 2002), en los precursores linfoides

(Morales y cols. 1999; Welniak y cols. 2000), y en los pre-adipocitos y adipocitos medulares (McAveney y cols. 1996).

Detrás de todas estas investigaciones siempre resuena la posible aplicación de la prolactina como estimulante medular. Sería un buen candidato frente a las citoquinas por presentar menos efectos secundarios y menor toxicidad (Welniak y cols. 2000). Además la acción sobre la médula es mayor en condiciones de estrés o patológicas que durante un estado fisiológico normal (Welniak y cols. 2001). Aunque el uso para restaurar la capacidad hematopoyética tras un trasplante medular está todavía en una fase experimental (Woody y cols. 1999), otros usos como el tratamiento de la anemia de Diamond-Blackfan han sido ya probados con éxito. En 2002 Abkowitz and others conseguían restaurar el hematocrito normal en mujeres con esta enfermedad mediante el uso de metoclopramida, un estimulante de la liberación de prolactina.

1.4.- Utilidad clínica de la hormona y de los fármacos relacionados

A lo largo de la revisión se han citado aplicaciones terapéuticas actuales o experimentales de la prolactina que incluyen, las enfermedades que producen inmunodepresión, como fármaco estimulador de la hematopoyesis y hasta como terapia frente a ciertos tipos de cancer; sin embargo la ausencia de prolactinas específicas de especie y el elevado coste de las recombinantes restringen su uso en el ámbito veterinario de los pequeños animales.

Para circunvalar este problema en este trabajo se recurrió a un fármaco que incrementase los niveles séricos de la hormona. Se usó la domperidona un antiemético con actividad anti-D₂, antagonista de la dopamina. Sus principales indicaciones son los vómitos por uremia, migraña, pancreatitis, dismenorrea y las dispepsias. Su biodisponibilidad oral es de un 15%, y su volumen de distribución de 6 l/kg con una semivida de 7 horas y media, eliminándose mediante metabolismo hepático.

En este trabajo se aprovecha la capacidad antagonista de los receptores D₂ de la dopamina (Nasello y cols. 1997; Freeman y cols. 2000; Matera y Mori 2000; Matera y cols. 2000) que hace elevar los niveles de prolactina, a través del aumento en la liberación de serotonina, sin cruzar la barrera hematoencefálica (Nasello y cols. 1997; Freeman y cols. 2000; Matera y Mori 2000; Matera y cols. 2000). Este aspecto resulta crucial; otros posibles candidatos provocan reacciones adversas de origen extrapiramidal, que nunca se manifestarán usando domperidona; así otros fármacos como la fenfluramina (Dulchin y cols. 2001), la sulfirida, la clormpromacina (Gabay 2002), la metoclopramida (Cunha-Filho y cols. 2001; Gabay 2002) y la cimetidina (Knigge 1990; Meltzer y cols. 1993; Willems y cols. 2000) son capaces de elevar los niveles séricos de prolactina, pero presentando más efectos secundarios que la domperidona.

Este fármaco anti-emético induce un pico en la secreción de prolactina entre la primera y cuarta hora tras su administración, que produce un efecto estimulador in vitro en los linfocitos T con ConA, aumentando significativamente dos horas después de la administración, la producción de INF γ por parte de leucocitos (Rovensky y cols. 1995). Por tanto la hiperprolactinemia producida por la domperidona actúa sobre el sistema inmune, en la misma forma que la natural, elevando los CD4+Th1, el INF-gamma y haciendo descender los CD4+Th2 (Berczi y Bertok 2000). Además otra dato a tener en cuenta acerca del uso de la domperidona es su bajo coste, que puede ser administrada en tratamientos prolongados y la ausencia de efectos adversos (Mann y Akinbami 2000).

2.- LEISHMANIOSIS

2.1.- Biología

2.1.1- El género *Leishmania*

La Leishmaniasis engloba las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios de los géneros *Leishmania* y transmitidos por insectos hematófagos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* en América y Europa (Slappendel y Green 1990; Bravo y cols. 1993). Se considera una zoonosis que afecta a los animales y al hombre (Rodríguez y cols. 1999), y aunque éste es un hospedador accidental, la leishmaniasis humana tiene una distribución muy amplia que incluye al menos 88 países (Hu y cols. 2000) en todos los continentes excepto algunas islas del Pacífico, Australia y la Antártida (Dereure y cols. 1999).

William Leishman y Charles Donovan en 1903 fueron los primeros en identificar al parásito en biopsias de enfermos hindúes (Alvar 1997). Desde entonces estos protozoos se encuadraron en el Reino Protista, aunque actualmente tiendan a incluirse en el Reino Animalia (**Figura I.3.**)

Reino: Protista (Animalia)
 Subreino: Protozoa
 Tipo: Sarcomastigophora
 Subtipo: Mastigophora
 Clase: Zoomastigophora
 Orden: Kinetoplastida
 Suborden: Kinetoplastida
 Familia: Trypanosomatidae
 Género: *Leishmania*
 Subgénero: *Leishmania*
 Especie: *Leishmania infantum* (Nicolle 1908).

Figura I.3.

Clasificación del género *Leishmania*
 (Adaptado de Molyneux y Ashford, 1983).

Las clasificaciones del género *Leishmania* siempre han presentado una gran dificultad porque la morfología del parásito no proporciona rasgos discriminativos útiles y por eso se

ha ido recurriendo a criterios circunstanciales como la geografía, el descubridor, el cuadro clínico y otras características, que al final han proporcionado nomenclaturas confusas y poco eficaces para la identificación de un conjunto en expansión del que al menos se han descrito 23 especies como causantes de enfermedad (Killick-Kendrick 1990) . La incorporación a la biología de nuevas tecnologías basadas en el estudio del fenotipo y en el análisis del DNA del género *Leishmania*, se han ido utilizando para perfilar clasificaciones cada vez más precisas que permitan establecer sus relaciones con la patogenia y su propagación.

La clasificación fenotípica usa la caracterización electroforética de los isoenzimas del parásito para separar hasta 26 especies, tal como se recoge en la **Figura I.4.**, estando considerada como la técnica de referencia. Los patrones isoenzimáticos idénticos en parásitos de la misma especie se agrupan en un único zimodema (Miro y Fraire 1999) que se considera un elemento básico en la taxonomía, porque permite compartir criterios idénticos. Actualmente en Europa se están utilizando 15 sistemas enzimáticos con la nomenclatura descrita por Chance (Alvar 1997).

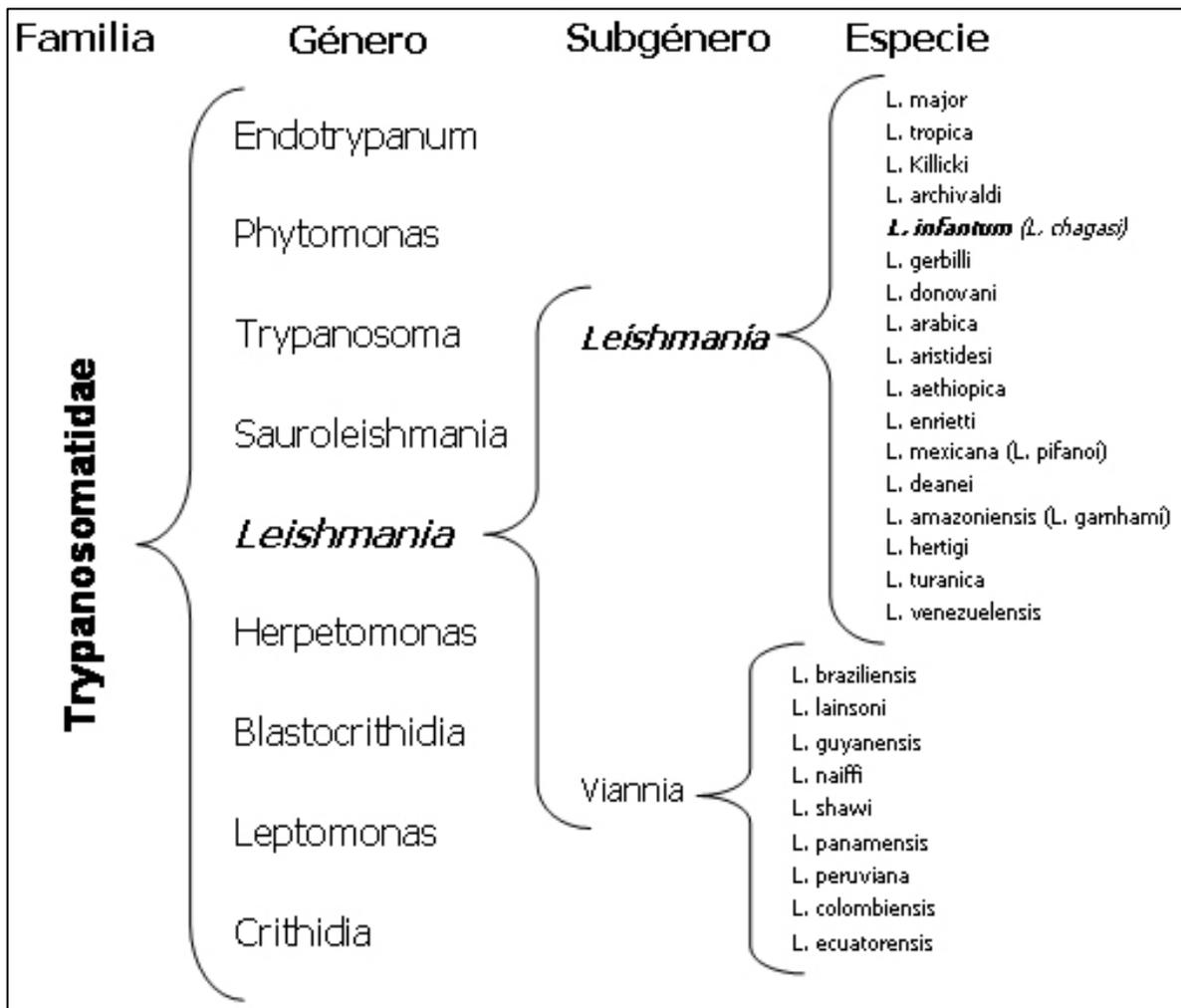


Figura I.4.

Clasificación del género *Leishmania* por medio de isoenzimas (Rioux y cols. 1990).

La caracterización genotípica basada en el estudio del ADN tiene la ventaja de que estudia un material, el genoma, que no se altera con los cambios morfológicos del ciclo biológico ni con la respuesta inmune del huésped. La variedad de técnicas utilizadas incluye la hibridación con sondas de ADN (Noyes y cols. 1998), la amplificación de DNA al azar (RAPD) (Noyes y cols. 1996), el PPIP-PCR (Eisenberger y Jaffe 1999), el análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP) (Bulle y cols. 2002) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Katakura y cols. 1998; Mauricio y cols. 2001).

La morfología del parásito se concreta básicamente en dos variantes que cubren todo su ciclo vital: el promastigote -extracelular, flagelado y localizado en el tracto digestivo del hospedador invertebrado- y el amastigote -aflagelar y situado en el interior de los macrófagos de los vertebrados- (Urquhart y cols. 1996).

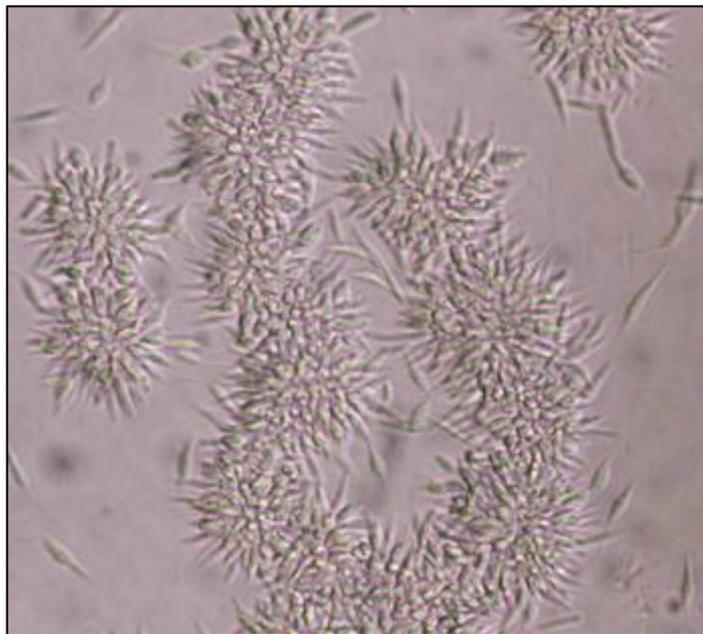


Figura I.5.
Promastigotes de *L. infantum* en cultivo.

La evolución del promastigote se inicia cuando está anclado en las microvellosidades del tubo digestivo del flebotomo gracias a un flagelo único y muy largo, con un cuerpo que mide entre 10-20 μ m y un kinetoplasto muy próximo al núcleo celular, y se denomina promastigote nectomona. Cuando migra hacia las porciones más anteriores del estómago, se redondea, su flagelo rico en lipofosfoglicanos (LPG) se acorta para facilitar la adhesión a las lecitinas que revisten el tubo digestivo, y entra en la fase de promastigote haptomona que carece de capacidad infectiva (Hoare y Wallace 1966; Alvar 1997; Boelaert y cols. 2000). Posteriormente vuelve a perder la adherencia por cambios en los LPG, el flagelo se hace muy largo en comparación con el cuerpo fino y corto, y recupera la capacidad de infectar;

entonces se sitúa en la hipofaringe del flebotomo, listo para ser inoculado, y se denomina promastigote metacíclico (Alvar 1997).

Los estudios realizados en cultivos de promastigotes de *L. major*, tanto en formas no infectivas -en fase de crecimiento logarítmica o procíclica- como en formas infectivas -en fase de crecimiento estacionario o metacíclica- demostraron que la estructura del LPG es común, y estaba constituida por un anclaje lipídico, un núcleo glicano y una larga cadena de oligosacáridos unidos por enlaces fosfodiéster con ramificaciones y grupos terminales. La configuración corta, P-LPG, favorece la unión del promastigote al intestino del flebotomo y le protege de la digestión, mientras que la forma P-LPG permite su liberación del intestino y favorece la unión a los macrófagos (Mc Conville y cols. 1992; Sacks y cols. 2000).

El amastigote es la forma aflagelar que se desarrolla en los macrófagos de los vertebrados con una configuración ovoidea o redondeada de 2.5 a 5 μm de diámetro, y con un núcleo y un kinetoplasto característico en forma de barra (Hoare y Wallace 1966; Simpson y cols. 1982). Aunque la evolución natural de promastigote a amastigote se produce con el cambio de hospedador, se ha demostrado in vitro con la *Leishmania mexicana* que también es posible esta transformación de promastigotes metacíclicos a formas similares a amastigotes tratándolos con suero humano y reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (Bee y cols. 2001)

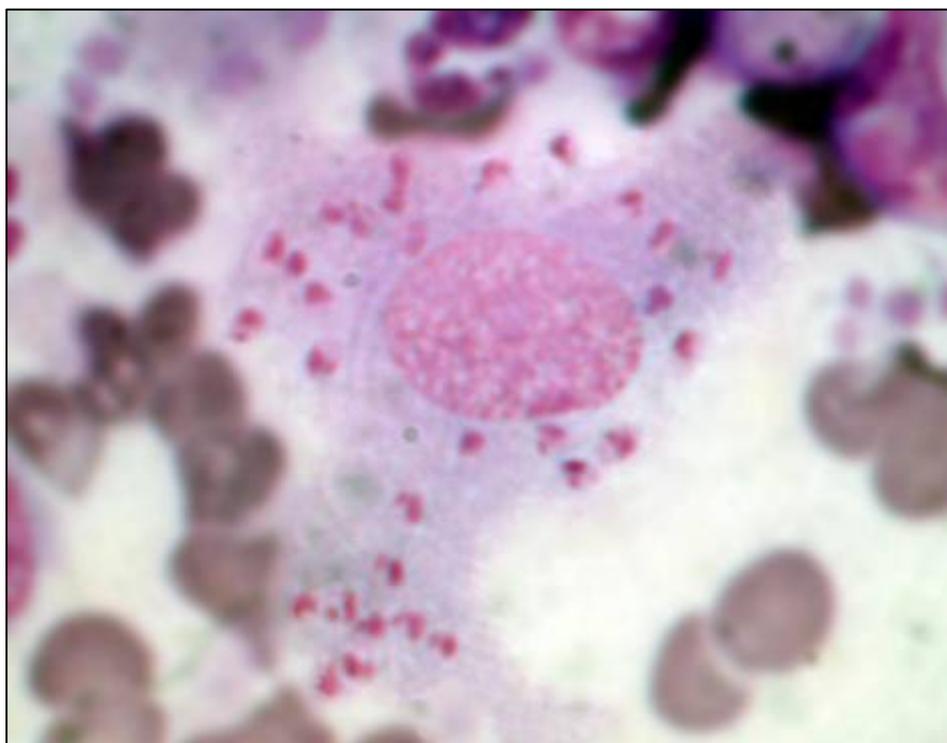


Figura I.6.

Amastigotes de *L. infantum* en el interior de un macrófago de perro.

El estudio de la infección por *Leishmania* con anticuerpos específicos, va incrementando el número de proteínas involucradas en la biología del parásito, y entre éstas son especialmente relevantes proteínas de membrana tales como la gp63 (Shreffler y cols. 1993; Morales y cols. 1997), la gp46 (Burns y cols. 1991), la PSA (Jiménez-Ruiz y cols. 1998), la KMP-11 (Berberich y cols. 1997), la proteína de unión al ácido hialurónico (HABP) (Rao y cols. 1999) y la p36/LACK, que aunque no es una proteína de membrana, tiene un papel importante en la supervivencia del parásito, relacionado con los mecanismos de síntesis y reparación del DNA nuclear y del kinetoplasto (González-Aseguinolaza y cols. 1999)

2.1.2.- El papel de los Phlebotomos y Lutzomyias

La primera descripción de *Phlebotomus perniciosus* la hizo Newstead en 1911 en la isla de Malta, sin embargo tuvieron que pasar algunos años hasta que se le relacionó con la Leishmaniosis, cuando distintos autores lograron infectar hembras de esta especie después de ser alimentadas sobre un perro con Leishmaniosis visceral (Parrot y cols. 1930; Adler y Theodor 1930). Hasta ahora se han identificado al menos 39 especies del género *Phlebotomus* que se alimentan de sangre humana (Killick-Kendrick y cols. 1979) aunque en el área del Mediterráneo occidental se considera a *Phlebotomus perniciosus* como el principal vector de la Leishmaniosis. Los *Phlebotomus* son pequeños dípteros hematófagos pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) que incluyen dos géneros con especial interés en medicina: *Phlebotomus* que transmite la enfermedad en Europa (Boelaert y cols. 2000) y *Lutzomyia* que la transmite en América (Bejarano y cols. 2001). En España se han identificado al menos 11 especies.

La morfología de todos los miembros de este género que pasan por una metamorfosis de tipo holometábola, incluye cuatro estadios bien diferenciados y fácilmente distinguibles

Los huevos tienen un aspecto fusiforme con un tamaño entre 350–360µm de largo, por 100-120 µm de ancho (Fausto y cols. 1992) y cuando están recién puestos tienen una coloración blanca o grisácea según la especie, aunque al poco tiempo adquieren un color café oscuro o negro. El corion está esculpido en relieve con protuberancias o polígonos, que forman patrones específicos de especie. La observación de estos patrones por microscopía electrónica, ha permitido la identificación de muchas especies (Ward y Ready 1975; Zimmerman y cols. 1977; Endris y cols. 1987).

La larva eclosiona a los 5 a 7 días después de la oviposición, gracias a una estructura en forma de diente situada en su cabeza y que le permite romper la pared del huevo (Ward 1985). La morfología de las larvas es semejante a la de una oruga, que sigue cuatro etapas bien definidas en su desarrollo. En el primer estadio, recién salida del cascarón, mide aproximadamente 0.5mm de largo por 0.1mm de ancho, para crecer dos veces su tamaño original antes de mudar el segundo estadio. Sucede lo mismo con el tercer y cuarto estadio, hasta llegar a unas dimensiones máximas antes de la pupación de 4 mm de largo y 0.6mm de ancho, con un cuerpo blanco por la evacuación de su intestino (Eldridge y Edman 2000), cilíndrico, recubierto de cerdas y dividido en nueve segmentos abdominales y tres torácicos. En los primeros siete segmentos abdominales posee patas falsas, que le permiten desplazarse en el medio. La cabeza es de color marrón, carece de ojos y tiene un aparato bucal masticador.

La pupa conserva la exuvia de la última muda y se fija verticalmente a la superficie en la que se encuentre en donde va cambiando de color, pasando del blanco al marrón oscuro. Al principio de la evolución es sésil y aunque son inmóviles reaccionan a los estímulos táctiles con movimientos de forma pendular; con el paso del tiempo se van desarrollando las características morfológicas del insecto adulto, perfectamente visibles a través de la cutícula, y aproximadamente 40 días después de la ingestión de sangre emerge el insecto adulto (Molina 1991).

El flebotomo adulto es más pequeño que otros dípteros, inferior a 5 mm, y además tiene una apariencia frágil. Se les puede reconocer por algunos rasgos característicos como la gran cantidad de sedas que recubren su cuerpo, las patas largas y las alas de aspecto lanceolado, que se insertan en el cuerpo con un ángulo de 45° a 60° con respecto al eje longitudinal. El color del cuerpo, sin diferencias entre machos y hembras, varía desde el marrón claro hasta el negro según la especie a la que pertenece. La cabeza tiene una implantación inferior en el tronco, lo que le confiere un aspecto giboso (Eldridge y Edman 2000). En las hembras la boca está especializada para la ingestión de sangre y dispone de un fascículo con seis estiletes. El aparato genital de los machos (externo e interno) y de las hembras (interno) tiene una gran importancia taxonómica. Las hembras tienen un abdomen cilíndrico y grueso que contiene los conductos genitales internos y las espermatecas, con grandes variaciones en el tamaño y en la forma entre especies y subespecies. Los machos tienen un aparato genital externo con simetría bilateral (Eldridge y Edman 2000), y es característica la rotación de la genitalia en 180° durante las 24 horas siguientes a la eclosión, antes de las cuales no se puede realizar el apareamiento con la hembra (Molina 1994).



Figura I.7.

Hembras de *Phlebotomus perniciosus* alimentándose sobre membrana con un preparado de eritrocitos.

2.1.3.- Ciclo biológico

Leishmania tiene un ciclo biológico complejo en el que participan hospedadores invertebrados, dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, y un amplio rango de mamíferos que incluye al hombre (Alexander y Russell 1992). El esquema general del ciclo biológico de *Leishmania* spp. sitúa en el primer plano a las hembras del insecto vector, hematófagas, por lo que son consideradas como las únicas responsables de la transmisión del parásito (Lariviere y cols. 1987). La secuencia de la infección da los siguientes pasos: La hembra del mosquito, infectada al alimentarse de un animal, le inocula formas infectivas del parásito que son fagocitados por los macrófagos en cuyas vacuolas se transforman en amastigotes y se multiplican. Cuando el macrófago infectado no puede contener más formas parasitarias estalla, liberando a los amastigotes que pueden infectar nuevos macrófagos y a través de la picadura también pueden infectar a un nuevo vector, situándose en el tubo digestivo del flebotomo. En unos días se transforma en promastigotes y evoluciona a formas metacíclicas en la parte anterior del tracto digestivo, en la proximidad de la probóscide, quedando listos para ser inoculados en la siguiente ingesta, cerrando de esta forma el ciclo biológico (Molyneux y Killick-Kendrick 1987).

En el interior del insecto vector, el ciclo biológico del parásito pasa por tres fases. La primera fase se inicia con la ingurgitación del parásito y llega hasta los 2 días post-ingestión. Todo el desarrollo de esta etapa en la que los amastigotes ingeridos evolucionan a

promastigotes pro-cíclicos, ocurre en el intestino medio, en la membrana peritrófica que contiene la ingesta de sangre. Algunos autores han observado divisiones previas de los amastigotes antes de dar lugar a las formas procíclicas (Killick-Kendrick y cols. 1979). Esta transformación ocurre entre las 6-12 horas post-ingestión, que es cuando aparecen las formas procíclicas ligeramente móviles, cortas, ovoides, con un núcleo difuso y un flagelo corto, que se pueden observar nadando en la periferia del cúmulo de sangre ingerida. Transcurridas entre 36 y 48 horas desde la infección, estas formas tempranas de promastigotes empiezan a transformarse en Promastigotes Nectomonas, adquiriendo una morfología esbelta, alargada y con un flagelo largo.

En la segunda etapa, 2-5 días post-ingesta, la membrana peritrófica constituida por un armazón de quitina y una matriz de proteínas y carbohidratos, se rompe y su contenido parcialmente digerido es arrastrado hasta alcanzar el íleon.

Existen fuertes evidencias de que el deterioro y ruptura de la membrana peritrófica es favorecido por la multiplicación desmedida del parásito, así como por la transformación de Promastigotes procíclicos a Nectomonas que liberan quitinasas; estos Promastigotes Nectomonas se unen a las microvellosidades de la pared intestinal por medio de los flagelos y se van desplazando hasta alcanzar la porción torácica del intestino medio uniéndose a la íntima cuticular del cardias y a la válvula estomodeal, mediante estructuras flagelares llamadas hemidesmosomas (Killick-Kendrick y cols. 1974), unión favorecida por una matriz similar a un gel (Lawyer y cols. 1987).

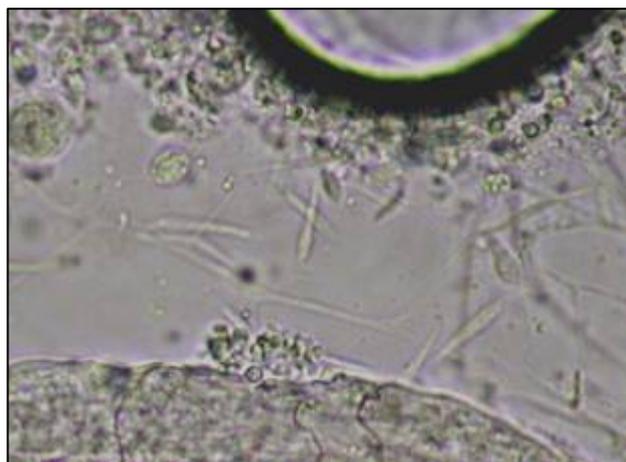


Figura I.8.

Preparación en fresco de un intestino de *Phlebotomus perniciosus* repleto de promastigotes.

Durante el tercer estadio, a partir del quinto día post-ingestión, el intestino se limpia de contenido sanguíneo, los huevos completan su desarrollo, se inicia la oviposición, y simultáneamente se produce una infección masiva del aparato digestivo anterior por

haptomonas que migran hacia el esófago y faringe posterior para acabar dispersas en el cibarium y probóscide, mientras se transforman en Promastigotes metacíclicos que son las formas específicamente preparadas para infectar a un nuevo hospedador (Eldridge y Edman 2000). Se han planteado varias hipótesis para explicar las formas de transmisión, y hay tres a las que se les da especial relevancia. En la primera de éstas, la transmisión se realiza con la inoculación de formas infectivas durante la ingestión de sangre o mediante la regurgitación de ésta, en la segunda hipótesis hay una ingestión directa del vector como ocurre en el caso de las *Sauroleishmanias*, y en la tercera opción, la transmisión se produciría al aplastar una hembra infectada sobre la piel (Adler 1929). Recientemente se ha sugerido una nueva forma de transmisión que se explicaría por la contaminación de lesiones o heridas con fluidos excretados por el insecto vector durante la ingestión de sangre sobre el hospedador vertebrado, y las observaciones realizadas por Sádlová y Volf en 1999, aislando parásitos a partir de muestras de excreciones de *P. papatasi* (37.5%) y *P. duboscqi* (16.1%) parecen demostrarlo.

2.1.4.- Modelos experimentales

Se han desarrollado diversos modelos experimentales para el estudio de la Leishmaniosis, con la intención de controlar los componentes genéticos del parásito y del huésped, y sin embargo hasta ahora, ninguno ha sido capaz de reproducir fielmente la enfermedad humana, y seguramente uno de los factores que más contribuye a establecer las diferencias entre los modelos animales y humanos es la naturaleza del inóculo.

En las infecciones naturales, el flebótomo introduce en la piel un número muy pequeño (posiblemente alrededor de 100 a 1,000) de promastigotes metacíclicos junto con su saliva fuertemente biorreactiva, mientras que en las infecciones experimentales, se inyectan miles o tal vez millones de promastigotes obtenidos de cultivos o amastigotes derivados de tejidos. Además el punto de inoculación es superficial y el inóculo de parásitos infectivos es probablemente muy pequeño, en contraste con las infecciones de laboratorio en las que se inoculan volúmenes relativamente grandes, de 50µl o más, en la hipodermis o por vía intravenosa (Handman 2001). La ausencia de modelos definitivamente concluyentes, ha llevado a proponer la utilización de distintas vías de infección en el mismo animal (Grimm y cols. 1991; Borjes y cols. 1998; Requena y cols. 2000 Martínez y cols. 2000), además de la evaluación de la eficiencia de diversos animales.

Los primates se han usado como modelos para el estudio de la leishmaniosis cutánea producida por *L. amazonensis* (Kenney 1999); sin embargo los resultados de las pruebas de hipersensibilidad son distintos de los obtenidos en los humanos.

El perro representa un modelo animal apropiado para el estudio de la enfermedad en el hombre. De hecho, algunos trabajos que se han realizado usando el modelo canino para estudiar la leishmaniosis, han demostrado su utilidad para la determinación de varios parámetros clínicos e inmunológicos, causados por la infección de *Leishmania infantum* (Abranches y cols. 1991; Pinelli y cols. 1994; Martínez-Moreno y cols. 1995; Carrera y cols. 1996; Rhalem y cols. 1999, 1999a). En el caso de la leishmaniosis visceral la enfermedad en los perros y en los humanos es muy similar, con un largo período de ausencia sintomatológica, seguido de un cuadro clínico caracterizado por anemia, linfadenopatía y fiebre (Peters y Killick-Kendrick, 1987), sin embargo cada vez se utiliza menos este modelo, considerando a otros más parecidos a la enfermedad en el hombre y con una respuesta inmune similar.

Distintos estudios indican que el **hámster dorado** (*Mesocricetus auratus*) es un animal, muy susceptible a la infección por *L. donovani* (Stauber 1966; Keithly 1976) y aunque existe un número limitado de estudios los trabajos que se han realizado indican que puede ser un modelo animal excelente para el estudio de la Leishmaniosis (Ghose y cols. 1999; Martínez y cols. 2000; Requena y cols. 2000), y de hecho fue uno de los primeros modelos utilizados para el estudio de la Leishmaniosis visceral. La infección con *L. donovani* conduce a la enfermedad visceral y finalmente a la muerte, con un cuadro clínico de anemia, hiperglobulinemia y caquexia, aspectos muy parecidos a la enfermedad humana lo que lo convierte en una herramienta útil para la caracterización de las moléculas y los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad (Hommel y cols. 1995). Sin embargo, en los últimos años el interés por este modelo ha disminuido y el hámster se usa habitualmente como una fuente de amastigotes de *L. donovani* para la infección de ratones que han pasado a ser el modelo preferido de la leishmaniosis visceral.

El ratón y concretamente determinadas líneas ha sido infectadas con especies de *Leishmania* patógenas para el ser humano, reemplazando al modelo cobayo *L. enriettii*, y aunque no son modelos perfectos, las manifestaciones de la enfermedad observadas en la leishmaniosis humana por *L. major* pueden ser imitadas en el laboratorio usando distintas líneas de ratones con un amplio rango de estados de susceptibilidad; además el uso de una

población clónica del parásito, elimina la diversidad genética y permite el análisis de los factores atribuidos al huésped. Entre las líneas de ratones genéticamente susceptibles a la leishmaniosis destacan los C57bL/6x129Sv/Ev (IL-13^{-/-}) y los Balb/c, que han sido muy empleados en el estudio de la enfermedad (Mc Kenzi y cols. 1998; Girginkardeşler y cols. 2001; Rodríguez-Sosa y cols. 2001). Los ratones BALB/c son muy susceptibles a la infección, desarrollando úlceras superficiales grandes que se extienden y metastatizan, llevando a la muerte, mientras que en los ratones C57BU6 y CBNN se producen lesiones pequeñas que curan en 10 a 12 semanas volviéndose resistentes a la reinfección. La mayoría de las demás líneas de ratones tienen un grado de susceptibilidad intermedio (Preston y Dumonde 1976). Parece claramente establecido que en los ratones, la susceptibilidad a la infección está condicionada por el tipo de activación de las subpoblaciones de células T (CD4+) hacia Th1 o Th2 (Murray y cols. 1982; Sadick y cols. 1986; Antczak y Gorman 1989; Charley y Blecha 1991). Por ejemplo en los ratones de la línea BALB/c se ha comprobado una respuesta del tipo Th2 con producción de IL-4 a las pocas horas de la infección (Launois y cols. 1999), situación que se produce durante el período de desarrollo de la lesión activa tanto en los ratones susceptibles como los resistentes (Morris y cols. 1992; Morris y cols. 1993). La diferencia más significativa entre los ratones susceptibles y los resistentes es que éstos últimos pueden cambiar a un perfil Th1 y controlar la enfermedad (Heinzel y cols. 1991; Solbach y Laskay 2000). Se ha observado que uno de los factores más relevantes para "decidir" la respuesta de tipo Th1 o Th2, es la producción precoz de la IL-12 capaz de decantar la respuesta hacia Th1 (Park y Scott 2001; Yamakami y cols. 2001). Los estudios con el modelo ratón permitieron la caracterización de los mecanismos inmunes implicados en las respuestas inmunes órgano-específicas que causan la eliminación de los parásitos hepáticos pero no de los esplénicos (Kaye y cols. 1995; Engwerda y Kaye 2000), la ineficacia de la quimioterapia en ausencia respuesta inmune T (Kaye y cols. 1995) y el descubrimiento de un gen que regula la resistencia de los animales a la infección, el gen de la susceptibilidad a la Leishmaniosis, actualmente conocido como NRAMP1 (Bradley 1974), que determina el grado de expansión temprana de los parásitos en el hígado y en el bazo (Blackwell 1996). A pesar de la utilidad comprobada del modelo ratón para el estudio de la Leishmaniosis, hay que resaltar las diferencias potenciales en los mecanismos patogénicos e inmunes que imponen cautelas significativas a la hora de extrapolar los resultados a la clínica humana. (Kelso 1995, 1998).

2.2.- Leishmaniosis canina

2.2.1.- Respuesta inmune

No se puede definir un patrón homogéneo para representar la respuesta inmunológica frente a la *Leishmania*, porque las diferencias son muy significativas y están relacionadas con la especie del parásito o el animal infectado, como demuestra la respuesta humoral débil en la infección cutánea y el elevado título de anticuerpos en la afectación visceral (Bourdeau 1994; Carvalho y cols. 1995; Fondevila y cols. 1997), o la existencia de perros que de forma natural son resistentes a la enfermedad y ni siquiera llegan a padecerla o la resuelven espontáneamente (Abranches y cols. 1991; Cabral y cols. 1992; Martínez-Moreno y cols. 1995; Solano-Gallego y cols. 2000; Fernández-Pérez y cols. 2003); sin embargo es una característica común la participación de mecanismos humorales y celulares en la respuesta inmune a lo largo de la evolución de la enfermedad (Maüel y Behin 1981; Pearson y cols. 1983; Howard 1985; Liew y O'Donnell 1993).

En un intento sistematizador se puede desglosar la respuesta inmune a la infección por *Leishmania* en tres apartados: La respuesta primaria en el punto de entrada, Respuesta Th 1 y Respuesta Th 2. Estas dos últimas son respuestas fundamentalmente de tipo celular dirigidas por los linfocitos T helper que representan dos tipos evolutivos: la Th 1 se asocia a un aumento de linfoproliferación específica con niveles de inmunoglobulinas moderados o bajos y una evolución favorable, y la Th 2 con una linfoproliferación específica disminuida, inmunoglobulinas muy elevadas y una evolución clínica desfavorable (Scott 1993; Varela y Valladares 1997; Miro y Fraire 1999; Pinelli y cols. 1999). La derivación hacia uno u otro tipo de respuesta parece estar muy condicionada por el tipo de citoquinas liberadas en las fases más precoces de la infección. Se ha comprobado que la depleción in vivo del IFN-gamma con anticuerpos monoclonales bloquea la respuesta Th1 y promueve la Th 2, mientras que la ausencia de IL-4 favorece la Th 1 o la IL-12 provoca la respuesta Th 1 (Scott1993).

La respuesta primaria en el punto de entrada se produce en la piel y está protagonizada por los macrófagos que tienen un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad aunque los propios mecanismos defensivos pueden ser causantes de síntomas graves. La actividad fagocítica del macrófago cuando se activa para destruir al parásito, incluye la acidificación del medio del fagosoma con un pH de 4 a 5.5, la liberación de enzimas hidrolíticas dentro del fagosoma, la generación de metabolitos reactivos del oxígeno

(MRO) como (OH , O_2 , H_2O_2), que reaccionan con diversas estructuras parasitarias desorganizándolas (Varela y Valladares 1997) y la producción de Óxido Nítrico (ON) que es considerada como uno de los mecanismos de destrucción más eficiente en el caso de *Leishmania*, al tratarse de una molécula muy activa que reacciona con el hierro presente en las enzimas parasitarias, inactivándolas. Su síntesis se induce por las citoquinas y especialmente por el Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) (Davidson y cols. 2000; Pinelli y cols. 2000).

La *Leishmania* también dispone de mecanismos mediante los que trata, y con frecuencia con éxito, de escapar de la destrucción macrofágica, y entre los más relevantes se incluyen la producción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que actúa bombeando protones desde el citosol parasitario hasta el medio del fagosoma para mantener un pH cercano a la neutralidad (Fairlamb y cols. 1985), la formación de una cubierta protectora (glicocálix) con los Lipofosfoglicanos (LFG) y las glicoproteínas para frenar la digestión por enzimas hidrolíticas (Mc Conville y cols. 1992), la actividad de diversas enzimas como la catalasa, la fosfatasa ácida y la glutatión peroxidasa capaces de inactivar los MRO, o la inducción de la síntesis de citoquinas desactivadoras, como el factor Transformador del Crecimiento ($\text{TGF-}\beta$) que frena la producción de ON (James y Nacy 1993).

La respuesta Th 1 aunque es una respuesta de la inmunidad celular que tiene su centro en los linfocitos T, se articula con una gran complejidad condicionando la actuación entrecruzada de los macrófagos, de las interleucinas, del interferón, de los factores estimulantes de colonias (CSF-GM) y del factor de necrosis tumoral (TNF).

La evidencia de esta respuesta se demostró en modelos experimentales de ratón, al observar como la resistencia de éstos frente a la infección por *L. major* se caracterizaba por la producción de IL-2, IL-3, IL-12, GM-CSF, $\text{IFN } \gamma$, $\text{TNF } \alpha$ y β (Murray y cols. 1982; Sadick y cols. 1986; Antczak y Gorman 1989; Charley y Blecha 1991), citoquinas que están relacionadas con una respuesta inmune mediada por células (Mosmann y cols. 1986; Mosmann y Coffman 1989) así como por la producción de IgG_{2a} (Reed y Scott 1993; Manetti y cols. 1993), siendo capaces de inducir una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) (Powrie y cols. 1993; Deplazes y cols. 1995; Lezama-Dávila y Isaac-Márquez 1995). Este tipo de respuesta también incrementa la fagocitosis, la expresión de receptores Fc (Warren y Vogel 1985) y la producción de óxido de nitrógeno e ión superóxido (Murray 1990), permitiendo incrementar el desarrollo de inmunidad a largo plazo (Pace y cols. 1983; Murray y cols. 1985).

Los estudios realizados con otros patógenos como la bacteria *Listeria* han demostrado que la IL-1, IL-6, TNF- α y TGF- β por sí solas son incapaces de reproducir el fenotipo Th1 (Hsieh y cols. 1993), y que sin embargo la IL-12 producida por los macrófagos era suficiente para inducir por sí sola el fenotipo Th1 al actuar directamente sobre linfocitos T CD4⁺ "naive" (Hsieh y cols. 1993; Scott 1993).

Las interleucinas

La Interleucina 12 (IL-12) desde su descubrimiento hace más de 10 años juega un papel esencial en el desarrollo de la respuesta inmune celular con fenotipo Th, que no se limita a comenzar sino que también contribuye a mantener, como lo demuestra la disminución rápida de las respuestas Th1 en ausencia de IL-12, conduciendo a una pérdida de la inmunidad protectora hacia distintos patógenos intracelulares como *Leishmania* y *Toxoplasma* (Park y Scott 2001). Esta citoquina de naturaleza proteica, esta compuesta por dos subunidades -p40 y p35- (Noormohammadi y cols. 2001) y es capaz de incrementar rápidamente la citotoxicidad mediada por células NK (Manetti y cols. 1993) por lo que inicialmente se la conoció como factor estimulador de células NK (NKSF) (Cheimi y cols. 1992). La producen los monocitos-macrófagos y los linfocitos B (Hsieh y cols. 1993) y es capaz de inducir la diferenciación de células con fenotipo Th1 para iniciar la inmunidad mediada por células (Yamakami y cols. 2001), también estimula la secreción de IFN- γ e IL-2 (Wynn y cols. 1994), e interactúa con el TNF- α y la IL-2 para incrementar la producción de IFN γ (Murray 1994). Su actividad es inhibida por la IL-10, el TGF- α y la IL-4 (Heinzel 1994).

La actividad leishmanicida inducida por la IL-12 es compleja y requiere de la participación de IFN- γ , IL-2 y TNF α endógenos (Brunda 1994; Wynn y cols. 1994), dependiendo en gran medida de la etapa de la infección como demuestra la poca actividad que demuestra sobre las infecciones por *L. major* ya establecidas (Heinzel y cols. 1993; Sypek y cols. 1993). Resultados experimentales sobre modelos murinos, han demostrado la eficacia de la IL-12 en las primeras fases de la infección con *L. donovani*, obteniéndose unos resultados similares a los presentados tras el tratamiento con IFN- γ (Murray 1990a; Heinzel y cols. 1993; Sypek y cols. 1993; Murray y Hariprashad 1995). Estas observaciones refuerzan la idea, de que la IL-12 posee un papel crucial en la protección mediada por células, en las primeras etapas de la infección por *Leishmania* (Scott 1993).

La Interleucina 2 (IL-2) es un polipéptido secretado por los linfocitos Th (Linfocitos auxiliares) activados, tras contactar con antígenos o mitógenos; constituye una importante hormona reguladora del sistema inmune, que posee la capacidad de inducir la proliferación y diferenciación tanto de linfocitos T, B y células NK, modulando su función inmunológica. La actividad de esta citoquina está íntimamente relacionada con una actividad ligando/receptor de tipo multimérico con tres tipos de reconocimiento: de baja, media y alta afinidad; siendo únicamente los receptores de media y alta afinidad los únicos capaces de favorecer los efectos biológicos de esta citoquina. El receptor está formado por 3 subunidades denominadas en función de su peso molecular como p55 (subunidad α), p70 (subunidad β) y p64 (subunidad γ), que al combinarse forman el receptor de baja afinidad (p55), el receptor de afinidad media (p70/p64) y el de alta afinidad (p55/p70/p64) (Leonard y cols. 1984; Nikaido y cols. 1984).

Estudios *in vitro* han demostrado que la resistencia a *L. donovani* se correlaciona con la capacidad de las células esplénicas para secretar IL-2 tras ser estimuladas antigénicamente (Murray y cols. 1987), mientras que por otro lado, la disminución en la respuesta de las células esplénicas frente a la estimulación con fitohemoaglutinina (FHA) durante la infección de ratones BALB/c con *L. donovani* respecto a los controles normales, se asocia con una disminución en la producción de IL-2 (Reiner y Finke 1983). También se ha demostrado que los sobrenadantes de PBMC procedentes de perros asintomáticos expresaron una alta actividad de IL-2 tras la estimulación con antígeno soluble de *Leishmania infantum* (LSA), muy superior a la observada en perros sintomáticos y perros control no infectados (Pinelli y cols. 1994).

La Interleucina 3 (IL-3) se sintetiza tanto en los linfocitos con fenotipo Th1 como Th2 (Pinelli y cols. 1999) y se considera un factor multipotente para la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, interviniendo también en la estimulación y proliferación de los mastocitos (Bourdeau 1988). En los humanos, parece ser que la IL-3 puede activar a los monocitos para inhibir la replicación intracelular de *L. amazonensis* y *Trypanosoma cruzi*, así como para la muerte extracelular de células tumorales (Ho y cols. 1992a).

Factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF)

El factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas es una citoquina sintetizada especialmente por los linfocitos T que promueve el crecimiento y la

diferenciación de las células pluripotenciales hematopoyéticas y activa la capacidad bactericida del macrófago (Grabstein y cols. 1986). En 1984 Murray y col. señalan que el GM-CSF es capaz de incrementar la actividad leishmanicida del macrófago (Guarga 1998).

El Interferón

El Interferón gamma (IFN- γ) conocido también como IL-18 (Tone y cols. 1997) es una citoquina secretada principalmente por las células T (Karupiah y cols. 1990) que estimula en el macrófago la producción de intermediarios tóxicos del oxígeno como el Óxido Nítrico (ON) (Nacy y Meltzer 1991). Los estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, han podido demostrar la efectividad del IFN- γ como un potente activador de los macrófagos infectados por *Leishmania* (Ho y cols. 1994), considerando a esta citoquina como una molécula clave en la curación de la leishmaniosis (Holaday y cols. 1993). La interacción del IFN- γ y la IL-2 con los macrófagos murinos induce la producción de IFN- α en respuesta a la infección por *Leishmania* (Narumi y cols. 1990). El IFN- γ aumenta la expansión de células Th1 y su diferenciación (Kemp y cols. 1996), pero por sí sólo no es capaz de generar una respuesta Th1 y necesita la intervención de otras citoquinas (Heinzel 1994) y especialmente de la IL-12 (Scott 1993). De todas formas el IFN- γ sigue siendo el mediador final del desarrollo de clones Th1, considerándose un inhibidor de la proliferación de clones Th2 (Powrie y cols. 1993).

Recientemente se ha observado que en ratones BALB/c irradiados con Rayos Ultra Violeta (UVA) se detecta RNAm codificante para IFN- γ y respuesta Th1, mientras que en los ratones no irradiados no se detectó RNAm y tuvieron respuesta Th2. Cuando además se les infectó con *L. amazoniensis*, el grupo irradiado mostró una supresión significativa en el desarrollo de lesiones cutáneas, en comparación con el grupo no irradiado (Khaskhely y cols. 2001).

Factores de Necrosis Tumoral

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina pleiotrópica producida por los macrófagos (Guarga 1998) e implicada en la regulación inmune y en la defensa del hospedador frente a numerosos patógenos intracelulares (Derouich-Guergour y cols. 2001).

En la leishmaniosis cutánea experimental por *L. major*, la adición de TNF- α , tanto endógeno como exógeno, incrementa la resistencia (Kossoda y cols. 1994). En estudios *in*

vivo se ha observado que induce la formación del granuloma tisular (Amiri y cols. 1992) y que disminuye durante la leishmaniosis visceral aguda, pero su producción se restablece tras el tratamiento (Ho y cols. 1992).

El Factor de Necrosis Tumoral beta (TNF- β), también conocido como Linfotoxina alfa, es una potente citoquina que se asocia con la respuesta inflamatoria (Carroll y cols. 1987) y se le ha relacionado con la miastenia grave experimental de los ratones (Christadoss y Goluszko 2002) y con el inicio y progresión del daño renal (Abboud 1993) en la glomerulonefritis de distintos modelos animales (Boswell y cols. 1988). También se ha descrito que la presencia en humanos del genotipo (TNFA2/TNFA2), se valora como un factor genético de pronóstico desfavorable para el desarrollo de nefropatía por IgA.

La respuesta Th2 se caracteriza por la imposibilidad de la destrucción intracelular del parásito en el macrófago y por la producción de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y GM-CSF, así como por la estimulación de la respuesta humoral con la producción de cantidades significativas de IgG₁, IgE e IgA y el desarrollo de eosinofilia (Deplazes y cols. 1995). En general a la respuesta de tipo Th2 se la considera perjudicial y es la que se observa en las formas de leishmaniosis con mal pronóstico tanto en ratones como en humanos (Uzonna y Bretscher 2001).

Interleucinas

La Interleucina-3 (IL-3) está producida tanto por células con fenotipo Th1 como por las Th2 (Pinelli y cols. 1999). A pesar de que en humanos parece ser que la IL-3 es capaz de inhibir la replicación intracelular de *L. amazonensis* y *Trypanosoma cruzi* (Ho y cols. 1992a), en modelos murinos la producción de esta citoquina se asocia con una leishmaniosis generalizada (Bourdeau 1994). También se ha observado que la administración de IL-3 y GM-CSF recombinante aumenta el desarrollo de las lesiones producidas por *L. major* así como la multiplicación de los parásitos dentro de los macrófagos incluso en lugares distantes a la lesión primaria, independientemente de la susceptibilidad o la resistencia de los ratones a la infección (Guarga 1998).

La Interleucina 4 (IL-4) posee una gran capacidad para la estimulación de células B, por lo que originalmente se le denominó como Factor-1 estimulante de células B (Nacy y Meltzer 1991) ya que estimula la síntesis preferente de anticuerpos de clase IgE (Holaday y cols. 1993) que se consideran como un marcador de la presencia de IL-4 (Miralles y cols.

1994). La producción de IL-4 está relacionada con la exacerbación de la enfermedad, tal y como se ha visto en infecciones experimentales de ratones BALB/c (Launois y cols. 1999) y en pacientes afectados de Kala-azar (Deplazes y cols. 1995) e incluso se la considera capaz de decantar la diferenciación celular hacia el fenotipo Th2 como se ha observado en modelos murinos utilizando anticuerpos monoclonales anti-IL-4, que inhibían la expansión de células Th2 favoreciendo la curación (Chatelain y cols. 1992). Estudios recientes realizados por Uzonna y Bretscher en 2001 indican que la neutralización de la IL-4 es suficiente para provocar la resolución de lesiones crónicas en ratones BALB/c.

La interleucina 5 (IL-5) posee la capacidad de estimular el crecimiento, diferenciación y proliferación de los eosinófilos (Kranefeld y cols. 1997) y juega un papel preponderante en la patogénesis de infecciones por helmintos y en procesos alérgicos en humanos (Lotvall y Pullerits 1999). Esta citoquina se ha identificado en las respuestas del tipo Th2 (Pinelli y cols. 1999).

La interleucina 6 (IL-6). Aunque se ha sugerido la asociación entre la secreción de IL-6 y la producción de elevados niveles de anticuerpos (Hirano y cols. 1986) se ha observado que la secreción de esta citoquina en las células mononucleares de sangre periférica en presencia de promastigotes de *L. major*, no mostró diferencias significativas entre los individuos curados y los no expuestos al parásito (Guarga 1998). Resultados similares se han presentado en la especie canina, ya que los sobrenadantes de células PBMC, estimuladas con antígeno soluble de *Leishmania* (LSA) procedentes de perros asintomáticos, no mostraron diferencias significativas de actividad IL-6 entre los perros sintomáticos y el grupo control no infectado (Pinelli y cols. 1994).

La interleucina 10 (IL-10) la producen los keratinocitos, las células T, los macrófagos y determinadas células B (Enk y Katz 1992). Entre sus funciones destaca su actuación como factor de crecimiento de células T y mastocitos, incrementa la viabilidad de las células B y es un estimulador de la expresión de MHC de clase II (Guarga 1998). La IL-10 posee una clara asociación con la patología de la leishmaniosis visceral humana (Ho y cols. 1994), observándose elevados niveles de RNAm de esta citoquina en los nódulos linfoides de pacientes con infección aguda de *L. donovani*, mientras que en personas tratadas con éxito se observan unos niveles normales de IL-10 (Ghalib y cols. 1993). Esta citoquina es considerada en la infección humana por *L. donovani* como el mayor factor de inmunosupresión (Holaday y cols. 1993).

A pesar de que en un principio la IL-10 se consideró como un inhibidor de la síntesis de citoquinas por los clones Th1 murinos (Fiorentino y cols. 1989), posteriormente se demostró que ese efecto inhibitorio era debido a su actuación sobre las células presentadoras de antígeno (Vieth y cols. 1994).

La interleucina 13 (IL-13) al igual que la IL-4 es producida por las células T activadas, e inhibe la producción de ON y TNF- α en el macrófago (Zurwaski y De Vries 1994). Recientes estudios han demostrado que la IL-13 juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune hacia distintas enfermedades parasitarias como las helmintiasis intestinales (Finkelman y cols. 1999) o las infecciones por *Schistosoma mansoni* (Chiaramonte y cols. 1999) Esta interleucina también tiene un importante papel en la regulación de la inmunidad dependiente de células Th2 como se ha observado con la adición de IL-13 o IL-4 exógenas a cultivos *in vitro* de células CD4⁺ obtenidas a partir de ratones IL-13^{-/-}, que no lograron restaurar la producción de citoquinas del tipo Th2 (Mc Kenzi y cols. 1998)

Las inmunoglobulinas

La IgG canina está compuesta por 4 subclases que en concordancia con la nomenclatura utilizada en medicina humana se denominan IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. En el suero normal de perros, las subclases IgG₁ e IgG₂ son las más abundantes con unas concentraciones medias de $8,17 \pm 0,95\text{mg/ml}$ y $8,15 \pm 3,16\text{mg/ml}$, respectivamente (Mazza y cols. 1994).

Los niveles de cada una de estas subclases de IgG se han puesto en relación con la activación de los fenotipos Th1 y Th2, de tal forma que una respuesta de tipo Th1 predispone a una producción preferencial de IgG_{2a} (Coffman y cols. 1988), mientras que el fenotipo Th2 favorece la secreción de la subclase IgG₁ (Rizzo y cols. 1995).

De todas formas no debe descartarse la posibilidad de que la respuesta de subclases de IgG sea meramente un efecto secundario de mecanismos celulares más importantes (Deplazes y cols. 1995).

2.2.2.- Infección clínica

La enfermedad del perro presenta gran variabilidad de presentaciones (Carrasco y cols. 1997; Ciaramella y cols. 1997; Valladares y cols. 1997) y la respuesta inmunológica se manifiesta como un condicionante de la evolución de la enfermedad (Campino y cols. 2000). La infección, incluso, puede ser asintomática en un alto porcentaje de perros (60-80%) (Ferrer 1999). La misma variabilidad que se da en las manifestaciones clínicas se da en el período de incubación en el que se registran rangos entre los 2 y los 25 meses en las formas subclínicas de la leishmaniosis canina experimental (Slappendel 1988; Oliveira y cols. 1993).

Las manifestaciones clínicas van desde las formas hiperreactivas, en las que no se aprecian parásitos pero existen lesiones orgánicas importantes y sintomatología severa, hasta formas anérgicas con diseminación generalizada, con un gran número de parásitos y pocas o ninguna manifestación clínica (Griffiths 1987).

Ciaramella y cols. en 1997, al realizar un estudio clínico retrospectivo con 150 perros infectados de manera natural por *Leishmania infantum* en Italia, observaron 16 perros en los que no fue posible demostrar la presencia de parásitos en cultivo ni por citología, y sin embargo presentaban síntomas asociados a la enfermedad, así como títulos altos de anticuerpos determinados por medio de IFI. También se observó que la gran mayoría de los animales presentaron una forma crónica de la enfermedad, mientras que la forma aguda sólo se detectó en seis animales que presentaban fiebre, linfadenomegalia generalizada y ausencia de lesiones.

Síntomas clínicos	No. de perros	% del total
Linfadenopatía	133	(88.7%)
Dermatitis exfoliativa	84	(56%)
Úlceras	60	(40%)
Onicogriposis	36	(24%)
Pérdida de peso	48	(32%)
Esplenomegalia	80	(53.3%)
Ascitis	3	(2.5%)
Anemia	90	(60%)

Tabla I.1.

Manifestaciones clínicas observadas en 158 perros con Leishmaniosis.
Koutinas y cols. 1999.

Síntomas clínicos	No. de perros	% del total
Linfadenopatía	103	(65.2%)
Lesiones cutáneas	80	(50.6%)
Dermatitis ulcerativa	82	(64.1%)
Onicogriposis	39	(30.5%)
Pérdida de peso	40	(25.3%)
Atrofia muscular	39	(24.7%)
Conjuntivitis	38	(24.1%)
Estomatitis ulcerativa	9	(5.7%)
Ascitis	4	(2.5%)
Anemia	116	(73.4%)

Tabla I.2.

Manifestaciones clínicas observadas en 150 perros con Leishmaniosis
Ciaramella y cols. 1997.

La difusión de la Leishmaniosis canina representa un verdadero problema sanitario, y en Europa se calcula que por lo menos 7 millones de perros están en riesgo de padecer la enfermedad (Reithinger y cols. 2001).

En España la LC al igual que en el humano, es causada por una sola especie *Leishmania infantum* (Martín-Sánchez y cols. 1999) y es zoonótica (Koutinas y cols. 1999)

En el año 1913 Pittaluga, comunicó el primer caso de Leishmaniosis Canina (LC) en la península ibérica, en la misma región geográfica donde un año antes había reseñado el primer caso en humanos. La LC esta sumamente diseminada en los países que poseen costas en el Mediterráneo (Fernández-Pérez y cols. 1999; Roura y cols. 1999). La prevalencia de la LC en España oscila entre un 1.6% en Galicia y un 18% en Cataluña (Alvar 1997). En las islas Baleares la seroprevalencia de la LC es de un 24 a un 26% (Matas y Rovira 1989), mientras que en Menorca la LC parece estar ausente (Alvar 1997). Los zimodemas aislados de infecciones caninas en España, son el ZM-1, ZM-11, ZM-77 (Dereure y cols. 1999) y ZM-105 (Alvar 1997), aunque el zimodema MON-1, es el más frecuente en la Cuenca Mediterránea (Aoun y cols. 2000).

Actualmente se considera al perro como el principal reservorio de esta enfermedad en el sur de Europa (WHO 1990; Cavaliero y cols. 1999), aunque hay otros cánidos silvestres cuyo papel en la transmisión aun está por determinarse, y ya se han encontrado evidencias de la infección en zorros (*Vulpes vulpes*) (Martín Iniesta y cols. 1982), en ratas (*Rattus rattus*) (Benavides y cols. 1985) y en lobos (*Canis lupus*) (Zárate y cols. 2000).

2.2.3.- Diagnóstico

Las opciones diagnósticas de la leishmaniosis son muy variadas y con amplios rangos de sensibilidad y de especificidad lo que permite la selección individualizada del método en relación con las condiciones técnicas y socioeconómicas de cada lugar.

Los métodos diagnósticos utilizados en la leishmaniosis canina se pueden separar en dos grupos:

Los métodos directos se basan en la demostración de la presencia del parásito en los frotis o en el estudio histopatológico de biopsias, el cultivo o la detección del DNA de la *Leishmania* con la PCR. Con un uso restringido habitualmente a la investigación también se incluyen en este grupo la inoculación a animales y el xenodiagnóstico.

Los métodos indirectos evalúan la respuesta inmune a la infección cuantificando los anticuerpos específicos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) o por Aglutinación Directa (DAT), y midiendo la respuesta celular con el Test de Montenegro o con la Prueba de Proliferación Linfocitaria (LPA).

Métodos Directos

Son los procedimientos más eficaces para demostrar la infección con una especificidad del 100% pero con una sensibilidad que varía entre el 50% de los ganglios linfáticos y el 60-80% de la médula ósea (Boelaert y cols.1999).

Los Frotis de Aspirados de ganglios linfáticos o médula ósea tienen la ventaja de su sencillez técnica y de la inmediatez, pero su sensibilidad está en un 60% para la médula ósea y es menor de un 30% en el ganglio linfático (Ferrer 1999). Los frotis esplénicos parecen tener mayor sensibilidad, 95-97%, aunque tienen una mayor incidencia de complicaciones (Zijlstra y El-Hassan 2001).

El Estudio Histopatológico de biopsias de piel o ganglios linfáticos solo es diagnóstico en la leishmaniosis si se observa directamente el parásito porque las lesiones tisulares son inespecíficas. Con frecuencia se comprueba una sensibilidad baja por la escasa presencia de parásitos en la muestra, lo que obliga a recurrir a la inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para mejorar los resultados de la hematoxilina-eosina (Bourdoiseau y cols. 1997).

El Cultivo y aislamiento del parásito es un procedimiento sencillo y con mayor sensibilidad que el frotis, sobre todo cuando la cantidad de parásitos presentes en la muestra es bajo (Lightner y cols. 1983). Se utilizan tres categorías generales de medios de cultivo: semisólidos y bifásicos -que utilizan sangre- y líquidos que utilizan Suero Bovino Fetal o eritrocitos lisados (Limoncu y cols. 1997). Con fines diagnósticos, el medio NNN (Novy-Nicolle-McNeal) que es un medio bifásico de agar sangre, es el más utilizado y de elección en la Cuenca Mediterránea para el aislamiento de *Leishmania* (Portús 1987). Con este medio se hace el primer control de la muestra en los 4-10 días posteriores a la siembra y si no se advierte crecimiento a partir del séptimo día, se realizan hasta cuatro resiembras que si son negativas se valora como un resultado definitivo (WHO1996; Dedet y cols. 1999).

Cuando se requiere una producción masiva de parásitos para la elaboración de antígenos (WHO 1996; Ozbek y cols. 2000) o para la identificación bioquímica (Evans 1989) se utilizan otros medios como el RPMI 1640, el 199 y el medio de Schneider (Evans 1989).

Las Técnicas Moleculares representadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se usan ampliamente en el diagnóstico de la leishmaniosis (Hu y col. 2000) al que aportan algunas ventajas sobre el resto de las técnicas, como la evaluación de la respuesta terapéutica (Osman y cols. 1998), la utilización de una gran variedad de tejidos como muestra -sangre, piel, médula ósea, aspirados linfáticos- (Reithinger y cols. 2000; Lechaud y cols. 2001) o su elevada sensibilidad que permite la detección de un sólo parásito en 10mL de sangre (Rodgers y cols. 1990). Recientemente se han desarrollado diversos oligonucleótidos que permiten amplificar específicamente el DNA de *Leishmania* (Lechaud y cols. 2000; Solano Gallego y cols. 2001) y también es posible incrementar la sensibilidad de la prueba usando una variante de la técnica conocida como Nested PCR, que consiste en amplificar el producto de una PCR previa (Noyes y cols. 1998).

La Inoculación a animales de laboratorio por vía intraperitoneal o intracardiaca (Bories y cols. 1998; Zijlstra y El-Hassan 2001) y **el Xenodiagnóstico** -en el que el insecto vector se alimenta directamente sobre el individuo sospechoso, (Molina y cols. 1994; Molina y J. Alvar 1996) son técnicas restringidas a la investigación o a casos clínicos muy concretos.

Métodos indirectos

Los Métodos Serológicos son una buena alternativa a la demostración directa del parásito (Piramez y cols. 1999) porque por su sencillez y eficiencia pueden ser utilizados en condiciones de campo (Neogy y cols. 1992).

Entre las técnicas serológicas empleadas en la investigación de la Leishmaniosis canina destaca la Inmunofluorescencia Indirecta (**IFI**) que es reconocida como el "gold standard" del diagnóstico serológico por su sensibilidad y especificidad, pero que resulta poco práctica para examinar grandes muestras (Gradoni 1999).

La alternativa es la Aglutinación Directa (**DAT**), que es un test muy sensible para la demostración de anticuerpos anti-*Leishmania* y además permite su uso en condiciones de

campo (Oskam y cols. 1999) sin perder su alta especificidad que se sitúa en un rango de 90-100% en controles sanitarios de zonas endémicas (Boelaert y cols. 1999a).

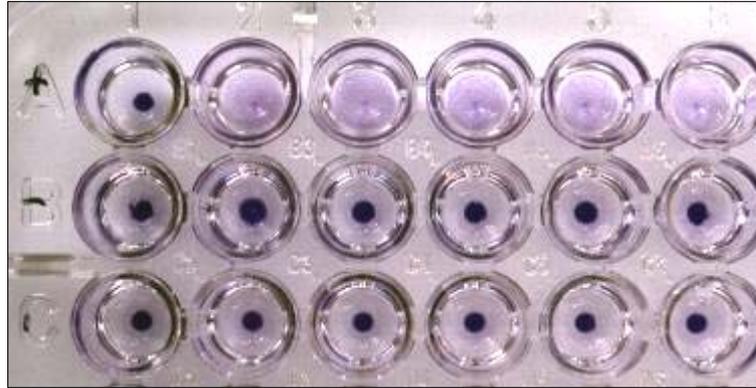


Figura I.9.

EasyDAT de dos sueros de perros en una placa con fondo en uve.

Técnica	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
DAT*/parasitológicos	100%	100%	Harith y cols. 1986
DAT**/parasitológicos	100%	99.3%	Harith y cols. 1986
DAT/IFI	100%	100%	Harith y cols. 1987
DAT/ELISA	96.3%	100%	Harith y cols. 1987
DAT/parasitológicos	100%	98.9%	Harith y cols. 1989
DAT/parasitológicos	94%	72%	Ziestra y cols. 1991
DAT/parasitológicos	95.4%	95.4%	Neogy y cols. 1992
DAT/ELISA	100%	100%	Neogy y cols. 1992
DAT/dot-ELISA	100%	SD	Gupta y cols.1994
DAT/parasitológicos	100%	85%	Boelaret y cols. 1999
DAT/parasitológicos	95.9%	99.4%	Boelaret y cols.1999a
DAT/Dip Stik K39	100%	93-96%	Bern y cols. 2000
DAT/IFI	100%	100%	Ozbel y cols. 2000

*sueros de pacientes tratados, **sueros de pacientes no tratados.

Tabla I.3.

Especificidad y sensibilidad del DAT frente a otros métodos diagnósticos.

La Inmunidad Celular se utiliza con fines diagnósticos valorando la Intradermoreacción o Test de Montenegro -induración cutánea en las 48-72 horas siguientes a la administración de promastigotes fenolizados (WHO 1996; Alvar 2001) o la Proliferación Linfocitaria (LPA) que estimula in vitro Células Mononucleares de Sangre Periférica aportando positividad muy evidentes en perros presintomáticos (De Luna y cols. 1999).

2.2.4. Tratamiento

El manejo terapéutico de la Leishmaniosis canina es complejo porque aunque la respuesta inicial al tratamiento es buena, raramente consigue evitar las recaídas, situación que seguramente se puede achacar a la peculiar respuesta inmune, a la presencia de parásitos intracelulares en zonas poco vascularizadas que dificultan la presencia de concentraciones adecuadas de fármacos y a la aparición de cepas de *Leishmania* resistentes a los antimoniales. La variedad de fármacos y de protocolos terapéuticos utilizados, y en continua expansión, subraya la ausencia de resultados definitivos.

Los Antimoniales pentavalentes, que combinan el estibogluconato sódico con la N-metil-D-glucamina, -antimoniato de meglumina- son los fármacos de elección en el tratamiento de la leishmaniosis visceral, con una menor toxicidad que otros fármacos por la ausencia de acumulación, como evidencia la eliminación urinaria de más del 80% del antimonio después de 9 horas de su administración (Tassi y cols. 1994; Valladares y cols. 1996). Se le achaca a las dosificaciones inadecuadas la selección de cepas resistentes en perros y humanos (Gramiccia y cols. 1992; Grogl y cols. 1992). Se han resaltado los beneficios farmacocinéticos de la asociación de la meglumina con la aminosidina (Oliva y cols. 1998b) y con el alopurinol (Ferrer y cols. 1995).

El Alopurinol es un antiguo fármaco antileishmanial muy usado en la práctica veterinaria. Su actividad leishmanioestática se debe a la incapacidad del parásito para sintetizar purinas, por lo que debe recurrir al hospedador incorporando alopurinol que actúa interfiriendo la síntesis proteica (Shapiro y cols. 1991). Aunque se han obtenido buenos resultados clínicos con distintas pautas (Ciaramella y Corona 2003; Liste y Gascon 1995), en general no se le considera como una alternativa válida al tratamiento con antimoniales.

La Aminosidina y la Pentamidina también se utilizan en leishmaniosis viscerales, especialmente en los casos refractarios a otras terapéuticas, sin embargo la aparición de efectos secundarios importantes que incluyen ototoxicidad y nefrotoxicidad en el caso de la

aminosidina (Liste y Gascon 1995) y daño hepatorrenal, hipotensión e incluso cuadros anafilácticos en el caso de la pentamidina (Rhalem y cols. 1999) restringen mucho su indicación.

La Anfotericina B y sus derivados liposomales ven muy limitado su uso por sus efectos secundarios, moderados en los compuestos liposomales (Oliva y cols. 1995a), su elevado coste y por la evidencia de su incapacidad para la curación definitiva de la leishmaniosis (Ciaramella y Corona 2003). Además la administración intravenosa de estos fármacos dificulta su uso rutinario en la clínica veterinaria.

El Ketoconazol y el Metronidazol son más activos in vitro que in vivo y en realidad son una alternativa marginal en el tratamiento de la leishmaniosis canina (Ciaramella y Corona 2003), aunque su asociación con la espiamicina parece arrojar unos resultados interesantes.

Los inmunomoduladores, si se valora adecuadamente la patogenia de la enfermedad, podrían ocupar una situación privilegiada en el tratamiento. Sin embargo su uso clínico se concreta en los corticoides, como fármaco inmunosupresor, utilizado en las formas más severas de la enfermedad en las que se detectan inmunocomplejos circulantes, y en inmunoestimulantes como el levamisol (Ciaramella y Corona 2003) y citoquinas y el INF γ (Badaro y cols. y 1990) que parecen ofrecer perspectivas optimistas para el control terapéutico de la enfermedad.



Material y Métodos

1.- INTRODUCCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS

El presente trabajo engloba cuatro experiencias muy dispares ubicadas en ámbitos de la investigación aparentemente separados. El uso de un modelo animal de laboratorio, una prueba clínica, el cultivo de progenitores hematopoyéticos y de stem cells y la secuenciación de un gen mediante técnicas de biología molecular, podrían parecer a primera vista inconexos, y sin embargo esta tesis doctoral utiliza el hilo conductor de la inmunomodulación en la leishmaniosis canina para tratar de abrir una nueva vía en el estudio de esta enfermedad endémica en toda la cuenca mediterránea.

En primer lugar se estudió la relación entre la lactación, hiperprolactinemia en situación fisiológica, y la leishmaniosis experimental usando un modelo criceto (*Mesocricetus auratus*). Posteriormente se utilizó un fármaco hiperprolactinemiante, la domperidona, en perros de raza Beagle para comprobar la conexión entre el sistema inmune, la hematopoyesis y la hiperprolactinemia. Paralelamente se comenzó una prueba en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza con este mismo fármaco en perros leishmaniósicos, infectados de forma natural. El último ensayo incluido en esta tesis es la amplificación y secuenciación de los cDNAs de la prolactina canina, como base para su posterior clonaje e inclusión en plásmidos vacunales como posible coadyuvante.

El apartado de material y métodos se describe individualizando cada uno de los ensayos realizados y se dedica un subapartado a la exposición de la metodología general utilizada, que a su vez se divide en: parámetros clínicos y analíticos, pruebas diagnósticas directas, pruebas diagnósticas indirectas, valoración de la respuesta inmune celular y cultivos de progenitores hematopoyéticos.

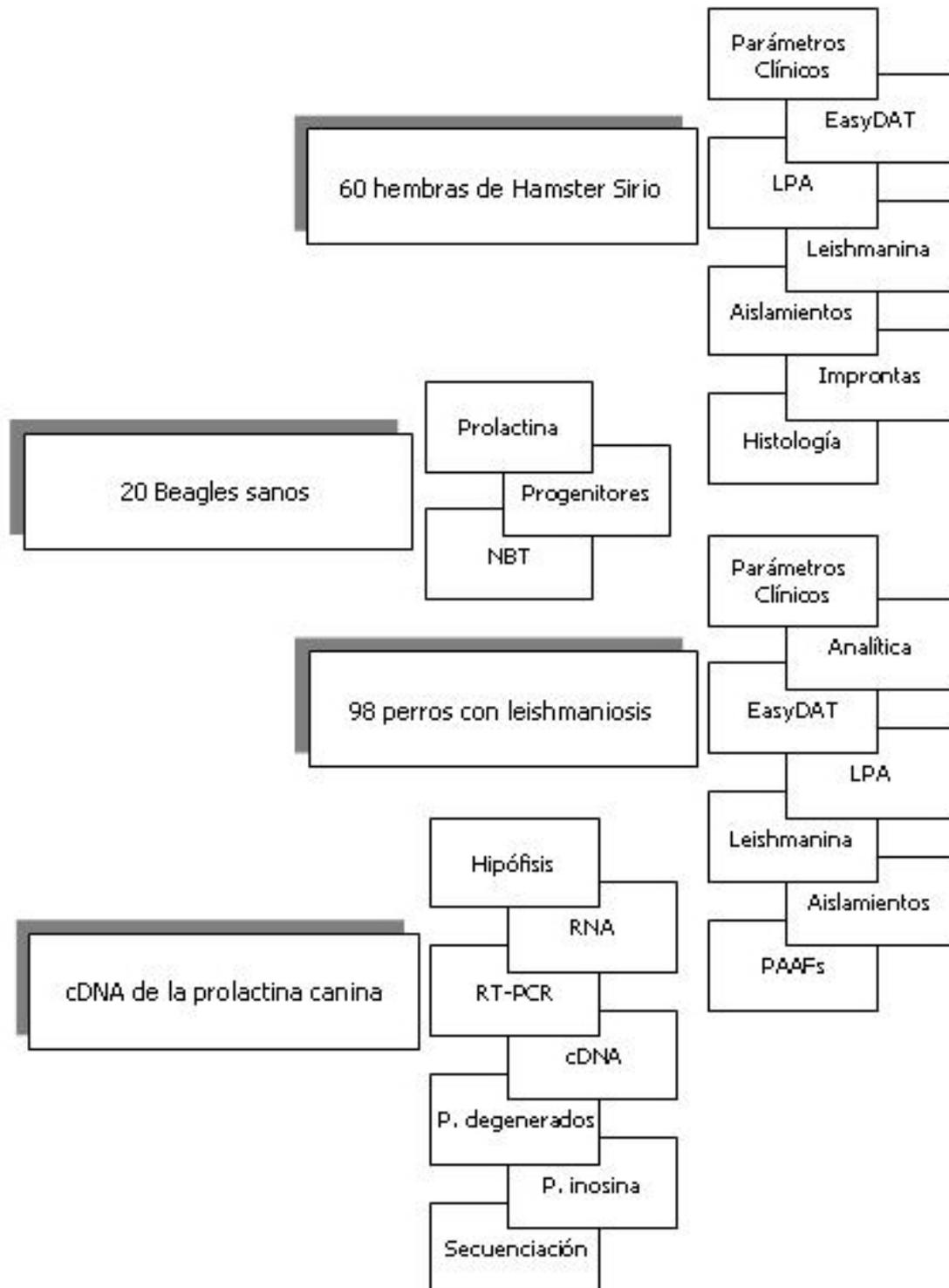


Diagrama del diseño experimental de la tesis

2.- INFLUENCIA DE LA LACTACIÓN EN LA INFECCIÓN POR *Leishmania infantum*. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN UN MODELO CRICETO (*Mesocricetus auratus*)

Para este experimento se utilizaron 60 Hámsters Sirios hembras; durante los 6 meses que duró el ensayo, el mantenimiento y cuidado de los animales se realizó en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, de acuerdo a las Guías Internacionales para el uso de animales de laboratorio. Se confeccionaron 3 grupos de 20, con los 60 hámsters. En el primero, grupo A, todas las hembras estaban en período de lactancia y se infectaron con 25 millones de promastigotes de *Leishmania infantum* intraperitonealmente. Las 20 hembras del grupo B fueron el control negativo y se les realizaron los mismos controles en ausencia de lactación y de infección. El grupo C estaba compuesto por animales no lactantes, e infectados con 25 millones de promastigotes de *L. infantum* por vía intraperitoneal.



Figura II.1.

***Mesocricetus auratus*, Hamster Sirio Dorado del Grupo A, en lactación e infectado**

El material biológico para realizar la infección se consiguió a partir del aislamiento de *Leishmania infantum* (MHOM/FR/78/LEM-75) de bazo de hámsters enfermos sembrando un macerado de la pulpa esplénica en tubos con medio semisólido NNN (Novy-Nicolle-McNeal). Una vez realizado el aislamiento, aproximadamente en una semana, se escalaba a un medio RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina y NaHCO₃ (SIGMA U.K.), adicionando Suero Fetal Bovino (Sigma-Aldrich, St. Luis Mo), al 10% (v/v) inactivado por calor y una mezcla antibiótica (penicilina 100UI/ml y estreptomina 100µg/ml) para evitar las contaminaciones bacterianas, todo él filtrado a través de membranas de 0,22µm de poro, antes de comenzar el cultivo. Nunca se realizaron más de tres pasajes, evitando así la pérdida de la capacidad infectiva del protozoo. Las condiciones, la técnica y la preparación de los medios empleados para el aislamiento y cultivo se describirán con detalle en el apartado 6 (Métodos de Evaluación).

Se consiguió el inóculo mediante centrifugación y lavado del cultivo usando Solución Salina Fisiológica (B. BRAUN, Medical S.A., Barcelona), ajustándose la concentración en una cámara de recuento de Neubauer, a 25 millones de promastigotes por mililitro. Se cargó el inóculo en una jeringuilla de 1ml y se inyectó, tras desinfectar la zona, a través de la pared abdominal en el peritoneo. En el grupo A la infección se llevaba a cabo al día siguiente del parto, y en el grupo C todas las hembras se inocularon el mismo día.

En los 6 meses que duró el experimento no se administró ningún tratamiento y la única manipulación ambiental que se realizó fue la retirada de las crías de la jaula de la madre a los 30 días. Durante el ensayo se controló un parámetro clínico, el peso, y se monitorizó el nivel de anticuerpos anti-leishmania mediante una prueba diagnóstica indirecta, el EasyDAT. Los días de control fueron el 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, y el 180. El pesado y toma de muestras se realizó tras sedación de los animales usando una droga disociativa de gran seguridad como la ketamina a una dosis de entre 0,1 a 0,2 mg de anestésico por gramo de peso vivo, administrada por vía intramuscular. Tras el pesaje se obtenía una muestra de sangre periférica, entre 1,5 y 2,5 ml por animal, puncionando el plexo retroorbital con un capilar libre de anticoagulantes en tubos Eppendorf de 1,5 ml, obteniendo el suero por centrifugación (**Figura II.2.**)

También se valoró la respuesta inmune retardada o celular usando el Test de la Intradermorreacción y un test de linfoproliferación in vitro (Kit Elisa Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech). Ambas pruebas descritas en el apartado 6 (Métodos de Evaluación), se llevaron a cabo los días 0, 90 y 180 para evaluar el estado inmune, de gran importancia en el desarrollo de la enfermedad. La intradermorreacción se realizaba bajo sedación y se leía a las 72 horas; la última inoculación se hizo el día 177 leyéndose el día 180. El test de

estimulación linfocítica se realizó en sangre periférica, 0,5 ml, anticoagulada con EDTA y los resultados se interpretaron a los 5 días.

El día 180 después de realizar todos los controles programados se eutanasió a los animales con una sobredosis de barbitúricos, cumpliendo las condiciones sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, especificados en el artículo 11 del Convenio Europeo, Estrasburgo, 18 de marzo de 1998 (B.O.E. 256, 25 de octubre de 1990). Antes de la toma de muestras se pesaron y midieron hígado y bazo, obteniéndose muestras de ambos y de médula ósea para realizar improntas, aislamiento en medio N-N-N, estudio anatomopatológico y carga parasitaria, detallados en el apartado 6 (Métodos de Evaluación) (**Figura II.3.**)



Figura II.2.

Toma de muestras mediante punción del plexo retroorbital bajo sedación

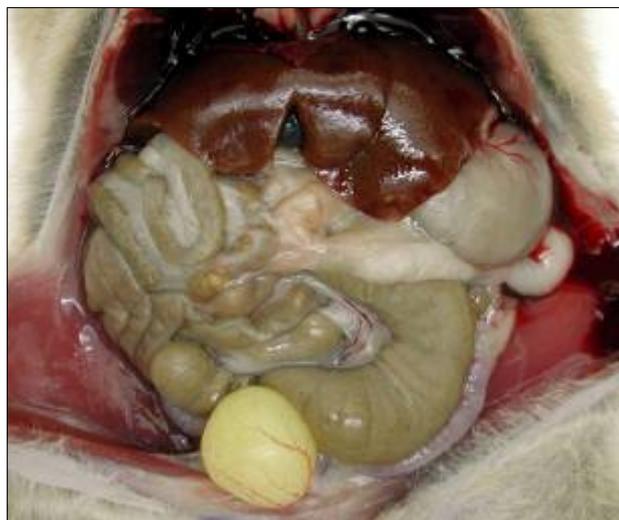


Figura II.3.

Día 180 después de la inoculación; necropsia

	n	Lactación	Inoculado	día 0	día 7	día 15	día 30	día 60	día 90	día 120	día 150	día 177	día 180
Grupo A	20	X	X	P EDAT LST LPA	P EDAT	P EDAT	P EDAT	P EDAT	P EDAT LST LPA	P EDAT	P EDAT	LST	P EDAT LPA IT NNN EAP
Grupo B	20	-	-	P EDAT LST LPA	P EDAT	P EDAT	P EDAT	P EDAT	P EDAT LST LPA	P EDAT	P EDAT	LST	P EDAT LPA IT NNN EAP
Grupo C	20	-	X	P EDAT LST LPA	P EDAT	P EDAT	P EDAT	P EDAT	P EDAT LST LPA	P EDAT	P EDAT	LST	P EDAT LPA IT NNN EAP

Esquema General del ensayo con 60 hembras de Hamster Sirio.

P: peso, EDAT: aglutinación directa, LST: leishmanina, LPA: linfoproliferación,

IT: imprevista, NNN: aislamiento, EAP: histología

3.-ESTUDIO PRELIMINAR DE LA RELACIÓN ENTRE LA DOMPERIDONA, LA INMUNIDAD Y LA HEMATOPOYESIS EN BEAGLES SANOS

Para comprobar la influencia de la hiperprolactinemia en los perros enfermos de leishmaniosis se diseñó una prueba clínica, que al ser la primera que empleaba drogas hiperprolactinemiantes carecía completamente de antecedentes bibliográficos. Inicialmente se valoró la utilización de prolactina recombinante, pero su alto coste la hacía totalmente inviable, despojando al experimento de toda aplicabilidad posterior, por lo que se optó por una sustancia como la domperidona que elevase los niveles de prolactina sin producir efectos adversos en el animal. El siguiente paso consistió en determinar la dosis y la pauta de administración, estipulándose en 1mg/kg cada 12 horas durante 1 mes. Aunque la elevación de la prolactina empleando esa dosis era casi segura de acuerdo a la bibliografía y a los estudios farmacocinéticos en otras especies, se diseñó una prueba para comprobar dicha elevación y evaluar además la interacción con la hematopoyesis y con la inmunidad.

En el ensayo se usaron 20 perros de raza Beagle, 10 machos y 10 hembras. Todos ellos se colocaron en jaulas separadas, en cuartos aislados del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, adecuadamente atendidos por personal del Centro de Apoyo a la Experimentación Animal de la misma Universidad, cumpliendo las condiciones sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 223/1998, B.O.E. 67, 18 de marzo de 1998).

Mediante venopunción de la yugular se obtuvo sangre periférica el día 0, antes de la administración, y los días 5, 15 y 30 tras administrar 1mg/kg de domperidona por vía oral cada 12 horas durante todo el mes. La sangre recogida se separaba en 5ml en medio McCoy's 5a para cultivo de los progenitores hematopoyéticos y 2,5 ml en tubos con EDTA para la prueba del NBT (Test de la reducción del Nitroazul de Tetrazolio). Ambas técnicas se detallaran en el apartado 6 (Metodología empleada).

Además el día 0 se realizó una curva de niveles de prolactina, usando un kit ELISA comercial (MILENIA, DPC), tomando sangre en la hora 0, a la hora tras administrar el fármaco, a las 4 horas y a las 10 horas. Inmediatamente, tras la toma de muestras se procesaban para evitar la degradación de la hormona.

4.- ESTUDIO DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE LA DOMPERIDONA EN PERROS ENFERMOS DE LEISHMANIOSIS

El principal objetivo de la prueba clínica era demostrar el papel terapéutico de la elevación de los niveles séricos de la prolactina frente a la enfermedad. Se utilizó la domperidona, un antiemético y procinético gástrico, para aumentar los niveles de la hormona. La pauta que se usó fue de 1 mg/kg cada 12 horas durante 1 mes por vía oral, para perros de menos de 30kg. La dosis absoluta correspondiente para los perros de más de 30 kg se consideró excesiva, administrando en estos casos 0,75 mg/kg cada 12 horas durante 1 mes. Hay que destacar la ausencia de referencias bibliográficas al respecto, ya que éste es el primer ensayo con la domperidona como droga inmunopotenciadora frente a una patología.

Debido al gran espectro de manifestaciones clínicas y analíticas de esta enfermedad, y a la utilización de perros infectados de forma natural que acudieron al SMIPA (Servicio de Medicina Interna de Pequeños Animales) del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza, se confeccionaron dos grupos de acuerdo a su sintomatología y a su título de anticuerpos.

En el grupo (A) se incluyeron 70 perros con títulos bajos de anticuerpos (1/800-1/1600 en EasyDAT), 34 asintomáticos y 36 con linfadenomegalias y/o síntomas cutáneos leves.

En el grupo (B) se encuadraron 28 perros con títulos altos de anticuerpos (>1/1600), todos polisintomáticos.

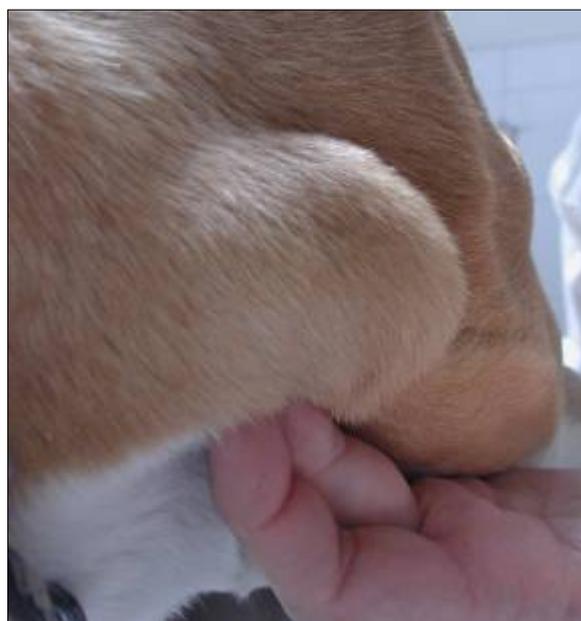


Figura II.4.

Perro del Grupo A con una marcada linfadenopatía preescapular

Cuando se diagnosticaba un perro como positivo, antes de incluirlo en el estudio se tomaron muestras de aspirado de ganglio poplíteo y de médula ósea en la unión costocondral, para visualización directa en microscopio óptico y para aislamiento en 10 tubos de medio N-N-N. En todos los perros del estudio se aisló el parásito, excluyéndose 11 perros serológicamente positivos en los que el aislamiento y la visualización directa fueron negativos. También se descartaron otros 8 perros que tenían otras enfermedades (6 Ehrlichiosis, 2 otitis crónica) o con tratamientos concurrentes (1 corticoesteroides, 1 antibióticos).

Se valoraron 98 perros a los que se les realizó el siguiente control clínico:

- **Sintomatología:** se valoraron todos los síntomas asociados a la leishmaniosis (dermatitis exfoliativa, alopecias, linfadenomegalias, palidez de mucosas, adelgazamiento, uveitis, onicogrifosis ...).



Figura II.5.

**Perra del Grupo B con alopecias perioculares
Síntoma de la cara de payaso**



Figura II.6.
Dermatitis exfoliativa y alopecia auricular



Figura II.7.
Palidez de la mucosa oral en un Dogo Alemán



Figura II.8.
Onicogriphosis y onicorrhexia

- **Perfil bioquímico general:** se incluyó perfil renal, hepático, glucosa, colesterol, proteínas totales, calcio y fósforo. Además se realizó un análisis electroforético de proteínas.
- **Urianálisis:** se valoró el U P/C o ratio proteína/creatinina urinaria.
- **Titulación de anticuerpos:** se uso el EasyDAT (Test de la Aglutinación Directa) considerándose positivo una dilución de 1/800.

Esta valoración se efectuó los días 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, llevando a cabo todos los controles mencionados.

Además se realizó una evaluación de la respuesta inmune celular, mediante pruebas de linfoproliferación in vitro los días 0, 30, 180, 360 (Biotrak cell proliferatrion ELISA, Amersham Pharmacia Biotech), y mediante la prueba de la intradermorreacción con leishmanina los días 0, 90, 360.

5.- AMPLIFICACION Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA PROLACTINA CANINA

5.1.- Extracción de RNA del tejido

El aislamiento del RNA se realizó a partir de tejido hipofisario. La glándula hipófisis se obtuvo a partir de un perro, *Canis familiaris*, de la raza Beagle. En tubos libres de RNasas de polipropileno, se puso el reactivo de extracción (TRIZOL[®] Reagent, Life Technologies, mezcla compuesta por guanidinio tiocianato y fenol, mantenido a 4 °C). Este tejido fue inmediatamente sumergido en el reactivo de extracción, evitando así la contaminación por RNasas.

El RNA total, a partir de la hipófisis, se obtuvo por homogenización del tejido en 1 ml del reactivo de extracción. La homogenización se realizó con un ultraturrax, cuyo vástago estaba libre de RNasas al haber sido tratado con solución descontaminante (agua destilada y desionizada con DEPC (dietil-pirocarbonato) al 0.05 %) y mantenido en estufa de 180 °C hasta su uso. Tras homogeneizar la muestra, el vástago se aclaró inicialmente con agua tratada (por cada litro de agua destilada y desionizada se añadió 0.25 ml de DEPC) y después con etanol absoluto, tras lo cual se secó.

El homogeneizado se dejó 5 minutos a temperatura ambiente, transfiriéndolo a un Eppendorf estéril. A cada eppendorf se le añadió 200 µl de cloroformo agitando vigorosamente por inversión y dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se centrifugó durante 20 minutos a 12000 xg, recogiendo la fase superior acuosa en un Eppendorf estéril. A esta fase se le añadió 0.5 ml de isopropanol, mezclando bien y manteniendo 20 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos, decantando el sobrenadante. Finalmente se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 75 %; en este punto se deben evitar demoras de tiempo ya que el etanol redisuelve y se producen pérdidas de hasta un 30 %. Finalmente se centrifugó durante 5 minutos a 12000 xg, lo que facilita la adhesión del precipitado, decantando el sobrenadante con cuidado para evitar la pérdida del precipitado que se dejó secar en la estufa a 60 °C durante 5 minutos, aunque no en exceso ya que disminuye la solubilidad. Otra variedad técnica utiliza un pulso de centrifuga y decanta el sobrenadante. Se disolvió en 100-200 µl de agua tratada con DEPC, y en otras ocasiones con formamida al 80 %, en función del precipitado. Las muestras, mantenidas en hielo a 4 °C, se rehidrataron en hielo durante 2-3 horas. Una vez extraído el RNA las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta determinar la concentración y calidad.

La concentración del RNA extraído se determinó mediante espectrofotometría, a 280 y 260 nm respectivamente, para lo cual se realizó inicialmente una línea base con 1 X TE, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, y EDTA 1 mM, a temperatura ambiente y valorando las muestras en dilución 1/200 en 1 X TE.

Se debe tener en cuenta que la relación 260/280 nm debe ser superior a 1.7 para considerar el RNA extraído libre de contaminación por DNA, y la concentración expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ es = $A_{260} \times 8$.

La calidad de los RNAs obtenidos se determinó mediante la electroforesis de 500 ng de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 1 % en 1 X TBE (10.8 g de Tris-base, 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0, y 5.5 g de ácido bórico, completando el volumen a 1 litro con agua tratada).

Los geles se corrieron en 1 X TBE a 80 V durante 30-35 minutos, tras lo cual se visualizaron en un transiluminador de UV. (**Figura II.9.**)

El almacenamiento de los RNAs extraídos se efectuó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada tubo fue perfectamente identificado con condición experimental, número de muestra, especie, concentración y fecha.

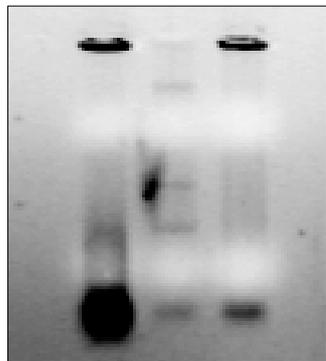


Figura II.9.

**Extracción de ARN total de hipófisis [0,480 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$].
El ARN compuesto por cuatro bandas no está degradado**

5.2.- Síntesis de cDNA

Entre 200 y 250 ng de RNA total o 70-80 ng de mRNA de hipófisis fueron utilizados para la transcripción reversa utilizando como primer Oligo (dT)₂₀ y la enzima SuperScript™ III RT (Invitrogen™).

El proceso, de retrotranscripción de la primera cadena de cDNA, consiste en una primera desnaturalización del RNA, del primer Oligo (dT)₂₀ 5 μM, y dNTPs mix 1 mM, a 65 °C durante 5 minutos, tras lo que se añade la mezcla de reacción, que consiste en RT buffer 1 X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM), MgCl₂ 5 mM, DTT (ditiotretitol) 10 mM, RNaseOUT™ (inhibidor recombinante de RNasas) 40 U, y la enzima SuperScript™ III RT 200 U, llevándose a cabo la síntesis del cDNA a 50°C durante 50 minutos, y terminando la reacción por incubación a 85°C durante 5 minutos. Para eliminar las trazas de RNA no transcriptas a cDNA, que pueden interferir durante la reacción en cadena de la polimerasa, se trató con 2 U de RNase H e incubó a 37°C durante 20 minutos.

Las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso o usadas para PCR inmediatamente.

5.3.- Síntesis de los oligos

La síntesis de los cebadores se basó, inicialmente, en la secuencia de nucleótidos obtenida a partir de la homología encontrada en otras especies.

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa **Clustal X (1.81)**. Se realizaron búsquedas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de las secuencias de nucleótidos, DNA, trasladadas a secuencia aminocídica, proteína, no existiendo homologías significativas con otras proteínas de vertebrados.

Secuencia Nucleotídica

Cabra	1	-----AAGGTCAGCGCAGAAA
Oveja	1	ATGGTGGTGATGATTTCAAGAAACACACTTCACCAGGACAGCAAAGGTCAGCGCAGAAA
Hombre	1	-----ATGAACATCAAAGGATCGCCATGGAAA
Gato	1	-----ATGGACAACAAGGGGTGGTCGCTGAAA
Ratón	1	-----ATGAACAGCCAGGGGTTCAGCCAGAAA
Hamster	1	-----ATGAACAGCCAGGGATCAGACCGAAA
Gallina	1	-----ATGAGCAACAGAGGGCTTCATTGAAA
Pavo	1	-----ATGAGCAACACAGGGCTTCATTGAAA
Consensus		-----ATGACAaCaAgGGaTcg cgcgGAAA

Cabra	18	G---GGTCCCGCCTGCTCCTGCTGCTGGTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGT CAGG---GT
Oveja	61	G---GGTCCCGCCTGCTCCTGCTGCTGGTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGT CAGG---GT
Hombre	28	G---GGTCC-----TCCTGCTGCTGCTGGTGTCAAACCTGCTGCTGTGCCAGA---GC
Gato	28	G---GGTCACTCCTGTTCCTGCTGCTGCTGCTGTTCAGACCTGCTCCGTGTCAAGA---GC
Ratón	28	GCAGGGACAC-----TCCTCCTGTTGCTGATATCAAACCTGCTGTTCTGCCAAA---AT
Hamster	28	GCAGTGACAC-----TCCTGCTGCTTGTGATGTCTAACCTGCTGTTCTGCCAAA---AT
Gallina	28	GGTTTGTTC-----TGGCGGTTCTTCTGGTCTCCAACACACTTCGACCAAGGAAGGA
Pavo	28	GGTTTGTTC-----TGGCGGTTCTTCTGGTATCCAACATGCTTCGACCAAGGAAGGA
Consensus		GgGtCaCTCC TGCTGCTgcTGgTG TCaaACCTGCTgcTgTGCCAgAgcGtGgc

Cabra	72	GTGGTCTCCACCCTCTGTGCCAATGGGCCTGGCAACTGCCAGGTGTCCCTTCGAGAC
Oveja	115	GTGGTCTCCACCCTGTCTGTGCCAATGGGCCTGGCGACTGT CAGGTGTCCCTTCGAGAC
Hombre	76	GTGGCCCTTGCCCATCTGTCCCGCGGGCTGCCGATGCCAGGTGACCCTTCGAGAC
Gato	82	GTGGCCTCCCTGCCCATCTGTCCBAGCGGGCGGTCAACTGCCAGGTGTCCCTGCCGGAC
Ratón	79	GTTTCAGCCTTGCCAATCTGTTCC-----GCTGGT GACTGCCAGACTTCTCTCCGAGAG
Hamster	79	GCGCACCCCTTGCCAATCTGCCCT-----GGTGGGAATGCCAGATGCCCTTCAGGAG
Gallina	82	GTGACCTCCCTTGCCAATCTGCCCATTTGGATCAGTCAACTGCCAAGTTTCCCTTGGGGAA
Pavo	82	GTGACCTCTTGCCAATCTGCTCCAGTGGATCTGTCAACTGCCAAGTTTCCCTTGGGGAG
Consensus		CcCCcTGCCcATCTGtCCcgGcGGGgc g c aa TGCCAGgTG CCCT CggGAcCTGT

Cabra 132 CTGTTTGACCGGGCAGTCATGGTGTCCCACTACATCCATAACCTCTCCTCGGAAATGTTC
 Oveja 175 CTGTTTGACCGGGCAGTCATGGTGTCCCACTACATTATAACCTCTCCTCGGAAATGTTC
 Hombre 136 CTGTTTGACCGCGCCGTCGTCTGTCCCACTACATCCATAACCTCTCCTCAGAAATGTTC
 Gato 142 CTGTTTGACCGCGCGGTTCATCCTGTCTCACTACATCCACAACCTGTCTCCTCGGAAATGTTC
 Ratón 133 CTGTTTGACCGTGTGGTCATACTTCTCACTACATCCATAACCTGTATAACAGATATGTTC
 Hamster 133 CTGTTTGACCGGTGATCATGCTTCTCACTACATTTATATGTGTCTGCAGATATGTTC
 Gallina 142 CTTTTTGATCGGGCAGTTAACTTTCACACTACATACTACCTCTCTTCAGAAATATTC
 Pavo 142 CTTTTTGATCGGGCAGTTAGACTTTCACACTACATACTTCTCTCTTCAGAAATTTTC
 Consensus TtGACCGcGcggTCaTcCTgTcTCACTACATc cAtAacCTgTCctCaGAaATGTTCaat

Cabra 192 AATGAATTTGATAAACGGTACGCCAGGGCAAGGGTACATTACCATGGCCCTCAACAGC
 Oveja 235 AATGAATTTGATAAAAGGTATGCCAGGGCAAGGGTTCATTACCATGGCCCTCAACAGC
 Hombre 196 AGCGAATTCGATAAACGGTATACCCATGGCCGGGGTTCATTACCAAGGCCATCAACAGC
 Gato 202 AATGAGTTTGATAAAAGGTATGCCAGGGCCGGGGTTCATTACCAAGGCCATCAACAGC
 Ratón 193 ATTGAATTCGATAAACAGTATGTGCAAGACCGTGAGTTTATGGTCAAGGTCATCAATGAC
 Hamster 193 ATTGAATTTGATAAACAGTATGCTCAAGATCACGAGTTTATTGCCAAGGCCATCAGTGAC
 Gallina 202 AATGAATTTGATGAACGTTATGCTCAGGGTCGGGGTTTCATTACAAAAGCTGTTAATGGC
 Pavo 202 AATGAATTTGATGAACGCTATGCTCAGGGTCGGGGTTTCATTACAAAAGCTGTTAATGGC
 Consensus GAaTT GATAAAcgGTATgCcCAgGgcCggGg TTcATTaCCAAGGCCATCAacagCTGc

Cabra 252 TGCCATACCTCCTCCCTTCCTACCCCTGAAGACAAAGAACAAGCCCAACAGACCCACCAT
 Oveja 295 TGCCACACCTCCTCCCTTCCTACCCCTGAAGACAAAGAACAAGCCCAACAGACCCACCAT
 Hombre 256 TGCCACACTTCTTCCCTTGCCACCCCGAAGACAAGGAGCAAGCCCAACAGATGAATCAA
 Gato 262 TGTACACTTCTCCTCCCTCCCTACCCCTGAGGACAAGGAGCAAGCCCAACAGATCCATCAC
 Ratón 253 TGCCCCACTTCTTCCCTGGCTACACCTGAAGACAAGGAACAAGCCCTGAAAGTCCCTCCG
 Hamster 253 TGCCCCACTTCTTCCCTGGCTACCCCTGAAGGAAGGAAGCCAGCAGGTCCCTCCG
 Gallina 262 TGCCACACTTCTCCTTAACCACTCCTGAAGATAAGGAGCAAGCTCAGCAGATTCATCAT
 Pavo 262 TGCCACACTTCTCCTTAACCACTCCTGAAGATAAGGAGCAAACCTCAGCAGATTCATCAC
 Consensus CaCACTTctTCCCT gCtACCCctGAaGaCAAGGAgcAAGCCCAaCAGaTccaTcaagAA

Cabra 312 GAAGTCCTTATGAGCTTGATTCTTGGGTTGCTGCGCTCCTGGAATGACCCTCTGTATCAC
 Oveja 355 GAAGTCCTTATGAGCTTGATTCTTGGGTTGCTGCGCTCCTGGAATGACCCTCTGTATCAC
 Hombre 316 AAAGACTTTCTGAGCCTGATAGTCAGCATATTGCGATCCTGGAATGAGCCTCTGTATCAT
 Gato 322 GAAGACCTTCTGAACGTGATACTCAGAGTGTGCGGTCTGGAATGACCCCTGTATCAC
 Ratón 313 GAAGTTCTTCTGAACCTGATCCTCAGTTTGGTGCAGTCTCGAGTGACCCTCTGTTTCAA
 Hamster 313 GAAGTCCTTCTGAACCTGATACTCAGTTTGGTGCACCTCCTGGAATGACCCTCTATTCAA
 Gallina 322 GAAGACCTACTGAATTTAGTAGTGGAGTGCTGCGTTCCTGGAATGATCCCCTGATCCAT
 Pavo 322 GAAGAGCTACTGAATTTGATACTGGAGTGCTGCGTTCCTGGAATGATCCCCTGATCCAT
 Consensus GaCcTTCTGAaCcTGATAcTCAG gTgtTGCggTCCTGGAATGAcCctCTgTaTCA CTc

Cabra	372	CTAGTCACAGAGGTGCGGGTATGAAAGGAGTCCCAGATGCTATCCTATCGAGGGCCATA
Oveja	415	CTAGTCACAGAGGTGCGGGTATGAAAGGAGTCCCAGATGCTATCCTATCGAGGGCTATA
Hombre	376	CTGGTCACGGAAGTACGTGGTATGCAAGAAGCCCCGGAGGCTATCCTATCCAAAGCTGTA
Gato	382	CTCGTCACGGAAGTGCAGGACTGCACGAAGCCCCGATGCTATCCTGTCCAGAGCCATT
Ratón	373	CTAATAACTGGAGTAGGTGGTATTCAGAAGCCCCGAATACATCCTATCAAGAGCCAAA
Hamster	373	CTCGTAACTGAAGTAGATGGTATTCATGAAGCCTCTGATGCTATCATATCAAGAGCGAAA
Gallina	382	CTGGCCTCTGAAGTGCAAAGAAATCAAGAAGCTCCAGATACCATTCTCTGGAAGGCTGTA
Pavo	382	CTGGCCTCTGAAGTGCAAAGAAATCAAGAAGCTCCAGATACCATCCTCTGGAAGGCTGTA
Consensus		GTcACgGAAGTAcgtGGtaTgCA GAAGCCcC GAtGCTATccTaTCcAgAGC ataGAG
Cabra	432	GAGATTGAGGAAGAAAACAAACGACTTCTGGAAGGCATGGAGATGATATTGGGCCAGGTT
Oveja	475	GAGATTGAGGAAGAAAACAAACGACTTCTGGAAGGCATGGAGATGATATTGGCCAAGTT
Hombre	436	GAGATTGAGGAGCAAACCAAACGGCTTCTAGAGGGCATGGAGCTGATAGTCAGCCAGGTT
Gato	442	GAGATCGAGGAGCAAACAGGAGGCTTCTAGAGGGCATGGAGAAGATAGTGCACCAGGTT
Ratón	433	GAGATTGAGGAACAAAACAAGCAGCTTCTTGAGGGAGTTGAGAAGATAATTAGCCAGGCC
Hamster	433	GAGATTGAGGAACAAAACAAGCGCTTCTAGAAGGAATTGAGAAGATACTGGCCAGGCC
Gallina	442	GAGATTGAGGAGCAAACAAGAGGCTTCTAGAAGGAATGGAGAAAATAGTTGGGCGGGTT
Pavo	442	GAGATTGAGGAGCAAACAAGAGGCTTCTAGAAGGAATGGAGAAAATCGTTGGGCGGATT
Consensus		ATtGaGGAgCAAAaCAagcGgCTTCTAGAgGGc ATgGAGaaGATAgT agCCAGGttcA
Cabra	492	ATTCCTGGAGCCAAAGAGACTGAGCCCTACCCTGTGTGGTCAGGACTCCCATCCCTGCAA
Oveja	535	ATTCCTGGAGCCAAAGAGACTGAGCCCTACCCTGTGTGGTCAGGACTCCCATCCCTGCAA
Hombre	496	CATCCTGAAACCAAAGAAAATGAGATCTACCCTGTCTGGTCGGGACTTCCATCCCTGCAG
Gato	502	CATCCCGGAGTCAGAGAAAACGAGTCTACTCCGTCTGGTCCGGACTCCCCTCCCTGCAG
Ratón	493	TATCCTGAAGCCAAAGGAAATGGGATCTACTTTGTTTGGTCACTACTTCCATCCCTACAG
Hamster	493	TATCCTGAAGCCAAAGGAAATGAGATCTACTCGGTTTGGTCACTACTTCCATCTCTGCAG
Gallina	502	CATCTGGTCATGCTGGAAATGAAATTTACTCTCACTCGGACGGCTTCCATCCCTGCAA
Pavo	502	CATCTGGCGATGCTGGAAATGAAGTTTCTCTCAGTGGGACGGCTTCCATCCCTGCAA
Consensus		TCctGaAgcCAaAGaAAAAtGAGaTCTActC GTc TGGTCgggAcTtCCaTCcCTGCAGa
Cabra	552	ACTAAGGATGAAGAGGCACGTCATTCTGCTTTTTTACAACCTGCTCCACTGCCTGCGCAGG
Oveja	595	ACTAAGGATGAAGATGCACGTCATTCTGCTTTTTTACAACCTGCTTCACTGCCTGCGCAGG
Hombre	556	ATGGCTGATGAAGAGTCTCGCCTTTCTGCTTATTATAACCTGCTCCACTGCCTACGCAGG
Gato	562	ATGGCTGATGAAGACTCTCGCCTTTTGCCTTTTTATAACCTGCTCCACTGCCTACGCAGG
Ratón	553	GGAGTTGATGAAGAAATCCAAATCTTGTCTTTGCGCAACACCATTTCGCTGCCTGCGCAGG
Hamster	553	GGAGTTGATGAAGAAATCCAGAGACTTGGCTATTTACAACAAGGTTTCGCTGCCTGCGCAGG
Gallina	562	CTCGCTGATGAGGACTCCAGACTCTTTGCTTTTTTATAACCTGCTGCATTGCCACCGCAGA
Pavo	562	CTCGCTGATGAGGACTCCAGACTCTTTGCTTTTTTACAACCTGCTGCATTGCCACCGCAGA
Consensus		tgGcTGATGAAGAgTctcGcctcTttGCTttTTAt AACctGcTcCaTGCCTaCGCAGG

Cabra 612 GATTCAAGCAAGATTGACACTTACCTTAAGCTCCTGAATTGCAGAATCATCTACAACAAC
 Oveja 655 GATTCAAGCAAGATTGACACTTACCTTAAGCTCCTGAATTGCAGAATCATCTACAACAAC
 Hombre 616 GATTCAACATAAATCGACAATTATCTCAAGCTCCTGAAGTGCCGAATCATCCACAACAAC
 Gato 622 GATTCAACATAAGATTGACAGTTATCTCAAGCTTCTGAAGTGCCGAATTGTCTACGACAGC
 Ratón 613 GATTCCACAAGGTTGACAATTTTCTCAAGGTCCTGAGGTGCCAAATTGCCCATCAAAC
 Hamster 613 GATTCCACAAGGTTGACAATTATCTCAAGCTCCTGAGATGTAGAGTTGTCCACAACAAC
 Gallina 622 GATTCCACAATAATTGACAACATCTTAAAGTTTTGAAGTGCCGCCTAATCCATGATAGC
 Pavo 622 GATTCCACAATAATCGACAACATCTTAAAGTTTTGAAGTGCCGCCTAATCCATGATAAC
 Consensus GATTCaCatAAgaTtGACAaTTATCTCAAGCTcCTGAagTGccGAaTtgTCcACaACAaC

Cabra 672 AACTGCTAA-----
 Oveja 715 AACTGCTAA-----
 Hombre 676 AACTGCTAA-----
 Gato 682 AACTGCTAA-----
 Ratón 673 AACTGCTAA-----
 Hamster 673 AACTGCTAA-----
 Gallina 682 AATTGCTAAATGGACAGCA
 Pavo 682 AATTGCTAA-----
 Consensus AACTGCTAA-----

Primers Sintetizados

	Secuencia (5'-3')	Tm	Estructuras secundarias	Dímeros
Forward	5'-ATG RAC ANC NAR GGN TNR NC -3'	60		
Reverse	5'-TTA GCA GTT GYT GTN RTR GA -3'	56		
PRL 1	5'-ATG IAC AIC IAI GGI T -3'	39.8	No	No
PRL 2	5'-TTA GCA GTT GIT GTI GT -3'	48.8	No	No
PRL 3	5'-CAC AAC CTG TCC TCG GAA AT -3'	63.8	Muy débil	No
PRL 4	5'-CCT CGT TTT CTC TGA CTC CG -3'	63.8	No	No

* Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd.; las secuencias fueron las siguientes: Y = C+T; R = A+G; N = A+C+G+T; M = A+C; I = Inosina.

Los cebadores Forward, Reverse, PRL 1 y PRL 2 se diseñaron basándose en las homologías encontradas en los extremos 5' y 3', mientras los dos restantes, PRL 3 y PRL 4, se obtuvieron de homologías internas seleccionadas por el programa Primer3Output www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi.

a) Primers Forward + Reverse: Temperaturas de hibridación 65.8° y 62.8°C, respectivamente.

ATG RAC ANC NAR GGN TNR NC (M-N/D-S/T/I/N-K/E/Q-G-L/S/W)

TTA GCA GTT GYT GTN RTR GA (L-A-V-A/V-V-I/M/V)

b) Primers PRL 1 + PRL 2: Temperaturas de hibridación 58.1° y 57.8°C, respectivamente.

ATG IAC AIC IAI GGI T (M-N/D-S/T/I/N-K/E/Q-G-L/S/W)

TTA GCA GTT GIT GTI GT (L-A-V-A/V-V-I/M/V)

c) Primer PRL 1 + PRL 2 + PRL 3 + PRL 4: Temperaturas de hibridación 58.1°, 57.8°C, 56.6°, y 67.3, respectivamente.

ATG IAC AIC IAI GGI T

TTA GCA GTT GIT GTI GT

CAC AAC CTG TCC TCG GAA AT

CCT CGT TTT CTC TGA CTC CG

6.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN

En esta sección se detallan las demás pruebas realizadas así como la metodología empleada, puesto que muchas de ellas se utilizan en varios ensayos.

6.1.- Parámetros clínicos y analíticos

En el experimento descrito en el apartado 4 (Estudio de la eficacia terapéutica de la domperidona en perros enfermos de leishmaniosis) se realizó una anamnesis completa y un examen físico exhaustivo revisando la evolución de las lesiones o síntomas asociados a la enfermedad.

La anamnesis consistió en preguntar a los propietarios acerca del ambiente en el que vivía su mascota, y del tiempo de evolución de los síntomas en caso de que los hubiese, ya que muchos perros del grupo A no manifestaban síntomas aparentes, siendo positivos en el control serológico anual que el HCV recomienda realizar.

Al finalizar la recogida de datos se exploraba al animal, tomando su temperatura y recogiendo las constantes básicas (frecuencia cardíaca, respiratoria, pulso), después se examinaban las mucosas (conjuntiva y oral) valorando la coloración, la posible presencia de úlceras y el TRC (tiempo de relleno capilar), presionando sobre éstas y observando el tiempo de respuesta que debe ser menor de 2 segundos. En la cabeza del perro se prestaba especial atención a la presencia de signos de uveitis en el globo ocular y a las alopecias perioculares y auriculares. A continuación se valoraba el tamaño y textura de los ganglios submaxilares, preescapulares y poplíteos, considerando a estos últimos de más relevancia. Se intentó objetivar la presencia y el tipo de linfadenopatías, dividiéndolas en leves, moderadas y severas, según el tamaño y el número de linfonodos implicados. También se revisaba toda la capa del animal en busca de lesiones alopécicas, úlceras en las zonas de apoyo, hiperqueratosis o dermatitis exfoliativa. Se concluía la exploración realizando una palpación abdominal minuciosa intentando determinar el tamaño esplénico y la posible presencia de respuestas dolorosas en el cuadrante renal.

Después de explorar al animal se realizaba la toma de muestras. La sangre se obtenía por venopunción yugular, cefálica o safena, dependiendo del tamaño y del carácter del perro. Para los análisis sanguíneos se echaba la sangre en tubos con anticoagulante, EDTA, para los parámetros hematológicos y en tubos sin anticoagulante, para la obtención de suero para perfiles bioquímicos. Las muestras recogidas se mantenían en refrigeración y se procesaban antes de 4 horas. El estudio hematológico se hizo usando un Diluidor automático (Sysmex AD 270) y un Microcell counter (Sysmex F 800) que determinaba el número total de

hematíes, la hemoglobina, el hematocrito, el VCM (volumen corpuscular medio), la HCM (hemoglobina corpuscular media), el CHCM (concentración de hemoglobina corpuscular media), el número total de plaquetas y el número total de leucocitos. También se hizo una extensión sobre porta que se tiñó para su visualización en el microscopio óptico con tinción rápida Diff Quick. En esta extensión se valoraba la proporción de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos para obtener la fórmula leucocitaria.

Los valores de referencia y las unidades de cada parámetro se encuentran reflejados en las **Tablas II.1. y II.2.**

VALORES DE REFERENCIA		
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,5	7,6
HGB (g/dl)	12	19,2
HCT (%)	37	55
VCM (fl)	64	74
HCM (pg)	22	27
CHCM (g/dl)	31	36
PLT ($\times 10^3/\text{ml}$)	150	430

Tablas II.1.

RBC: número total hematíes, HGB: hemoglobina, HCT: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, CHCM: concentración de hemoglobina copuscular media, PLT: plaquetas

VALORES DE REFERENCIA		
WBC	6000	16650
Neutrofilos	4100	11700
Linfocitos	1035	4405
Eosinófilos	0	1850
Monocitos	0	400
Basófilos	0	95

Tablas II.2.

Valores absolutos leucocitarios por mm^3

Con el suero obtenido por centrifugación se determinaron 9 parámetros bioquímicos que incluyeron la glucosa, el colesterol, el B.U.N (nitrógeno ureico sanguíneo), la creatinina, el calcio, la ALT (alanin amino transferasa), la AST (aspartato amino transferasa) y la AP (fosfatasa alcalina) en un Multianalizador de química líquida (Technicom RA-500, Bayer). Los valores de referencia y las unidades de cada parámetro se encuentran reflejados en la siguiente **Tablas II.3.**

VALORES DE REFERENCIA		
Glucosa (mg/dl)	75	120
Colesterol (mg/dl)	110	300
B.U.N. (mg/dl)	7	24
Creatinina (mg/dl)	0,6	1,2
Calcio (mg/dl)	9	11,5
Fósforo (mg/dl)	3,3	6,5
AST (u/l)	15	42
ALT (u/l)	15	50
AP (u/l)	18	70

Tablas II.3.
Valores bioquímicos de referencia

Por su relación con la enfermedad hay que destacar dentro de este perfil bioquímico general el B.U.N., la creatinina, el calcio y el fósforo como parámetros de disfunción renal, y la AST, la ALT (hepatoespecífica en carnívoros), y la AP como marcadores de daño hepatobiliar.

Además con parte del suero se determinaban las proteínas totales y se realizaba una electroforesis o proteinograma. Se usó una fuente (LKB Bromma, Pharmacia LKB) a 100 V, 12,6 mA y 2,5 W, durante 30 minutos en una cubeta para 10 tiras. El soporte donde se realizaba la migración electroforética eran tiras de Acetato de Celulosa (Cellogel, ATOM). La lectura se hizo en un densitómetro o lector electroforético a 610 nm (CS 900, SHIMADZU). Con esta prueba se monitorizaban tanto los niveles de albúmina como los de las beta globulinas y los anticuerpos o gamma globulinas. Los valores de referencia y las unidades de cada parámetro se encuentran reflejados en la **Tablas II.4.**

VALORES DE REFERENCIA		
Proteínas totales(g/dl)	5,7	7,5
Albúmina (g/dl)	2,3	4,6
Alfa 1 (g/dl)	0,3	0,8
Alfa 2 (g/dl)	0,5	1,3
Betas (g/dl)	0,7	1,8
Gammas (g/dl)	0,4	1

Tablas II.4.
Valores de las diferentes fracciones proteicas

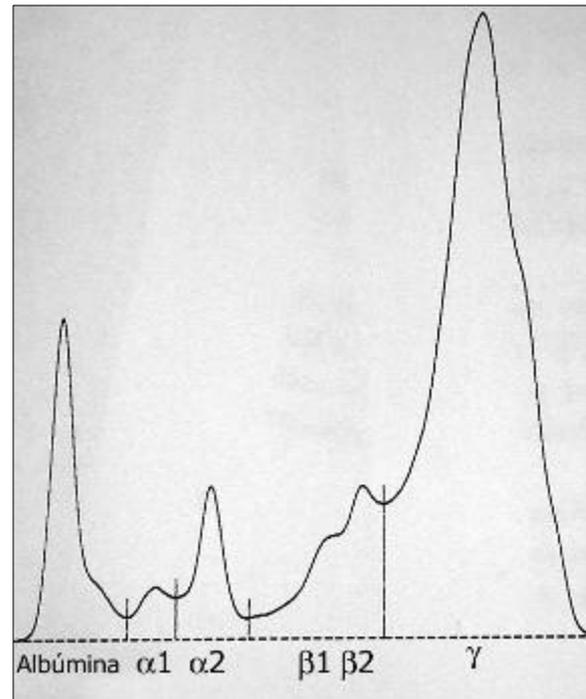


Figura II.9.
Proteinograma alterado en un perro del Grupo B;
la albúmina está baja y las β y las γ elevadas



Figura II.10.
Cistocentesis ecoguiada.
La aguja se visualiza como una línea ecogénica

Además de la sangre se obtenía una muestra de orina mediante cistocentesis que implica la punción ecoguiada de la vejiga. En todos los perros se desinfectaba el área y en decubito supino o lateral derecho se puncionaba para conseguir una muestra de aproximadamente 10 ml. Las ventajas de esta técnica sobre el sondaje residen en la menor dificultad en hembras, en la esterilidad de la muestra recogida y en el menor trauma generado.

En la orina recogida se llevaba a cabo un urianálisis rutinario y la determinación del U P/C (Relación proteína creatinina urinaria). Esta prueba es un método útil, sensible y rápido para la detección y cuantificación de proteinuria en muestras recogidas aleatoriamente (Lulich y Osborne 1990, Ruggenti y cols. 1998). A diferencia de otras pruebas este cociente presenta la ventaja de no verse afectado por la densidad y el volumen de orina (Lulich y Osborne 1990) y se calcula dividiendo las concentraciones de proteína y creatinina urinarias, expresadas ambas en mg/dl. La interpretación se resume en la **Tabla II.5**.

0-0,5	Normal
0,-1	Cuestionable
>1	Patológico
>1 (1-5)	Prerrenal, glomerular leve o temprana, postglomerular
>1 (5-13)	Pérdida media a moderada. Sugiere enfermedad postrenal o glomerulonefritis, glomerulosclerosis progresivas
>1 (>13)	Pérdida grave. Glomerulonefritis grave o amiloidosis

Tabla II.5.
Valores de U P/C y su correlación clínica

Esta prueba aporta precisión a la valoración renal del perro leishmanioso (Palacio y cols. 1995). Este es otro elemento de juicio que enriquece la pobre estimación que proporciona el B.U.N y la creatinina sérica, parámetros que se elevan únicamente cuando ya hay dos terceras partes del riñón afectadas.

6.2.- Pruebas diagnósticas directas

Las pruebas diagnósticas directas o parasitológicas son las que permiten visualizar o demostrar la presencia del parásito (*Leishmania infantum*). En este trabajo se ha empleado la impronta, el aislamiento en medio semisólido N-N-N, el estudio anatomopatológico, y además también se determinó la carga parasitaria. En la **Tabla II.6.** se concreta el uso de cada prueba en los diferentes ensayos.

	Impronta	Aislamiento	Anatomía Patológica	Carga Parasitaria
Apartado.2 Hamsters Sirios	Hígado, Bazo, Médula ósea	Hígado, Bazo, Médula ósea	Hígado y Bazo	Hígado y Bazo
Apartado.4 Perros Domperidona	Gánglio poplíteo, Médula ósea	Gánglio poplíteo, Médula ósea		

Tabla II.6.

Las improntas se realizaron presionando una sección del órgano contra un portaobjetos en los hámsters, y a partir de aspirados con aguja fina en los perros. Una vez obtenidos los frotis se teñían con coloración hematológica de diferenciación rápida (Diff Quick, DADE). Las muestras se fijaban en metanol (0,02g/l) durante 10 segundos. El primer colorante utilizado fue la eosina-G (tampón fosfato pH 6,6) y el segundo la tiazina (tampón fosfato pH 6,6); en ambos se sumergía el portaobjetos durante 5 segundos. Tras el secado se visualizaba en un microscopio óptico, considerando positivas todas las preparaciones en las que se vio al menos un amastigote, y negativas en las que después de mirar 100 campos distintos no se conseguía ver ninguna forma parasitaria (Lezama-Dávila y Gallagher 1995).

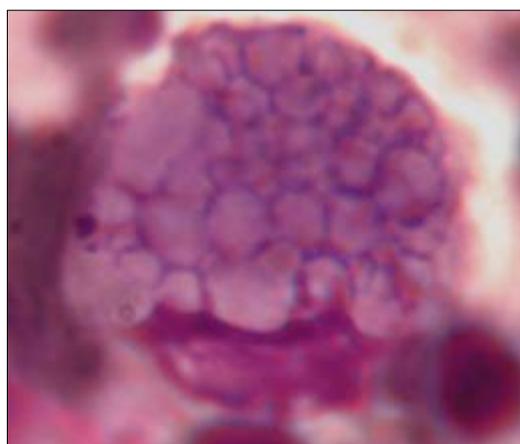


Figura II.11.

Célula de Mott en médula ósea, que aunque no es patognomónica, su presencia es sugestiva de leishmaniosis

El aislamiento se realizaba en tubos con medio N-N-N (Novy-Nicolle-McNeal). Este es un medio semisólido bifásico formado básicamente por sangre de conejo, una combinación de antibióticos y agar en forma de pico de flauta, y por la interfase líquida. Una vez sembrados los tubos con el aspirado (en el caso de los perros) o con un macerado del órgano (en los hámsters) se dejaba en incubación a 27°C. Una vez a la semana se examinaban microscópicamente en busca de promastigotes, realizándose pases sistemáticos cada 7 días. Al cabo de un mes, cuatro pases, sin observar promastigotes se consideraron negativas (Zijlstra y El-Hassan 2001).



Figura II.12.

Aspirado medular en la unión costo-condral



Figura II.13.

Tubos con medio N-N-N para el aislamiento de *Leishmania*

El estudio histológico se realizó en el hígado y en el bazo de los Hámsters. Después de registrar los pesos y medidas, los órganos se introducían en una solución de formaldehído al 10% en PBS. Para lograr una correcta imbibición se hicieron cortes en dirección al hilio de cada órgano, y después se incluían en parafina mediante procesamiento automático. Posteriormente se cortaban con un grosor de 5µm y se transferían a portaobjetos para teñirlos con Hematoxilina-Eosina y examinarlos en un microscopio óptico.

La determinación de la carga parasitaria se llevó a cabo a partir de las improntas del hígado y bazo de los hámsters. Se siguió el método empleado por Baumann y cols. en 1990, por el que la carga parasitaria total se determina contando 500 núcleos y contando el número de amastigotes. La fórmula empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$\text{Carga parasitaria} = \text{número de amastigotes por núcleo} \times \text{peso del órgano (mg)} \times 2 \times 10^5$$

6.3.- Pruebas diagnósticas indirectas

Las pruebas diagnósticas indirectas detectan efectos producidos por el parásito, pero sin demostrar su presencia; las pruebas serológicas que detectan anticuerpos frente al parásito, son el ejemplo más claro de este tipo de prueba. Hasta la realización de este trabajo, nuestro laboratorio empleaba la técnica de aglutinación directa (DAT) para el diagnóstico serológico, cuyo fundamento es el uso de promastigotes tripsinizados, fijados con formaldehído y teñidos con azul de Coomassie para la detección de anticuerpos en una placa de 96 pocillos con fondo en uve (Harith y cols. 1986). El resultado se lee a las 18-24 horas, obteniendo un punto bien delimitado en el fondo del pocillo cuando no hay anticuerpos, o una mancha o red azul difuminada cuando los hay.

El dintel de positividad en las técnicas serológicas se fija en función del origen y de la procedencia del suero (Harith y cols. 1986), y siendo nuestra región una zona endémica y basándonos en estudios propios se estableció el título 1/800 como positivo. El principal inconveniente del DAT es el largo proceso de elaboración del antígeno (Boelaert y cols. 1999), aproximadamente 2 días, generando una baja repetibilidad de resultados entre antígenos diferentes. Además el protocolo actual no establece una relación número de promastigotes/ tripsina, y se necesita una ultracentrífuga refrigerada, lo que complica aún más el proceso.

Hemos desarrollado un nuevo protocolo de elaboración de antígeno EasyDat que elude todos estos inconvenientes. La elaboración del antígeno para el EasyDat empieza desde el cultivo de la cepa de *Leishmania*. En nuestro caso se utilizó *Leishmania infantum* (MHOM/FR/78/LEM-75), en recipientes de medio litro a 26.4 °C en medio RPMI 1640 con L-glutamina y NaHCO₃ (SIGMA U.K.), adicionando 5mM de HEPES, 100 U.I./ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina y 10% de suero fetal bovino inactivado con calor. El cultivo se mantiene hasta que la mayoría de los promastigotes están en forma elongada. Para saber la concentración (promastigotes/ml) se usa una cámara de recuento de Neubauer, donde la media de los promastigotes en 16 recuadros se multiplica por 160, por la dilución utilizada, normalmente 1/50 o 1/100, y por 1000. La elaboración se ha estandarizado a 1000 millones de promastigotes, que se pasan a un nuevo recipiente. Después esta cantidad se afora, a 100 ml con solución citrato salina. A continuación se agregan 0.2 g de Tripsina 1:250 de páncreas porcino γ -irradiado (PANREAC), y se mantiene a 37° C durante 45 minutos. Pasado este tiempo se detiene la tripsinización en un baño de hielo. Se añaden entonces 130 µl de Formaldehído 37-38% p/p estabilizado con metanol (PANREAC) directamente sobre el cultivo tripsinizado. Homogeneizamos suavemente y dejamos fijar durante 1 hora. Después de la

fijación se centrifuga en tubos de 50 ml (FALCON), 2 veces para concentrar, y una posterior, con solución citrato salina, para lavar el exceso de formaldehido. Cada centrifugación son 10 minutos a 2000 xg. Al final resuspendemos el pellet, de 1000 millones de promastigotes, en 25 ml de solución citrato salina.

Para la tinción disolvemos una tableta de 1g de Azul Brillante de Coomassie (R-250 MERCK) en 200 ml de solución citrato salina, quedando el colorante diluido al 0.5% (peso/volumen). Añadimos 25 ml del colorante a los 25 ml de la solución citrato salina con los promastigotes, quedando el colorante a una concentración del 0.25% (peso/volumen). Se mantiene en agitación suave durante los 90 minutos que dura la tinción y transcurrido este tiempo se centrifuga a 2000 xg durante 10 minutos 3 veces, lavando cada vez con solución citrato salina. Para guardar el antígeno EasyDAT, se resuspende el pellet en solución citrato salina formolada al 0.4% a una concentración de 50×10^6 promastigotes/ml. El antígeno debe guardarse protegido de la luz y a 4°C. En la **Figura II.14.** se resume todo el proceso.

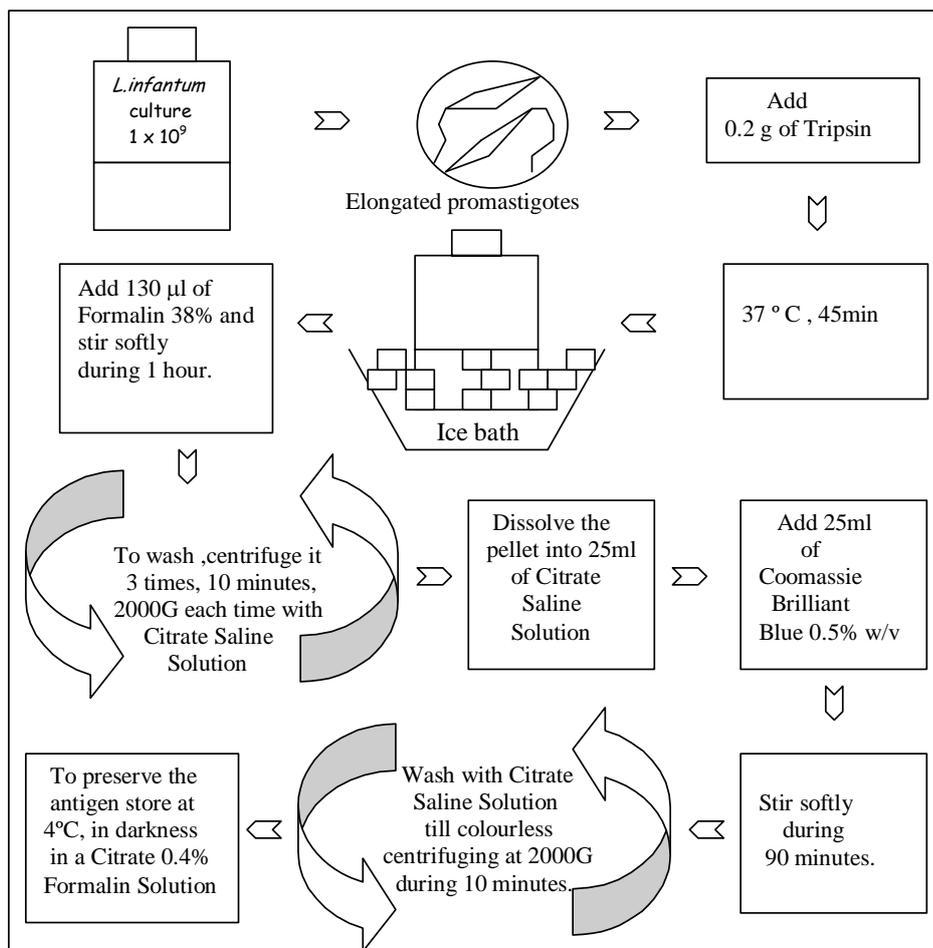


Figura II.14.

Gómez-Ochoa y cols.,

CDLI American Society for Microbiology, Septiembre 2003.

Para testar el antígeno EasyDAT y comprobar que el nuevo procedimiento no influía en la sensibilidad ni en la especificidad se usaron dos grupos de perros. En el primero se incluyeron 139 animales positivos diagnosticados mediante punción de ganglio y médula ósea, o aislando el parásito en medio N-N-N. El segundo grupo estaba compuesto por 151 perros asintomáticos y con aislamiento y frotis negativo.

La prueba se realiza en placas de 96 (12 x 8) pocillos con fondo en uve. En cada pocillo se pone 50 µl de una dilución del suero problema, comenzando en 1/100, en el contiguo 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, hasta 1/6400. A continuación se añadían 50 µl del antígeno a cada pocillo. Además en cada placa se hacía un control positivo y un control negativo como testaje del antígeno. Antes de guardar la placa, se agita para conseguir una correcta homogeneización, y a continuación en un ambiente húmedo y protegido de la luz se incuba durante 18-24 horas (Harith y cols. 1986).

La interpretación de los resultados debe hacerse sobre un fondo blanco y por dos personas. La titulación de un suero corresponde a la dilución anterior al punto idéntico al control negativo. En este trabajo, de acuerdo con Vercammen y cols. en 1997 se consideraron positivos todos los sueros con una titulación igual o superior a 1/800.

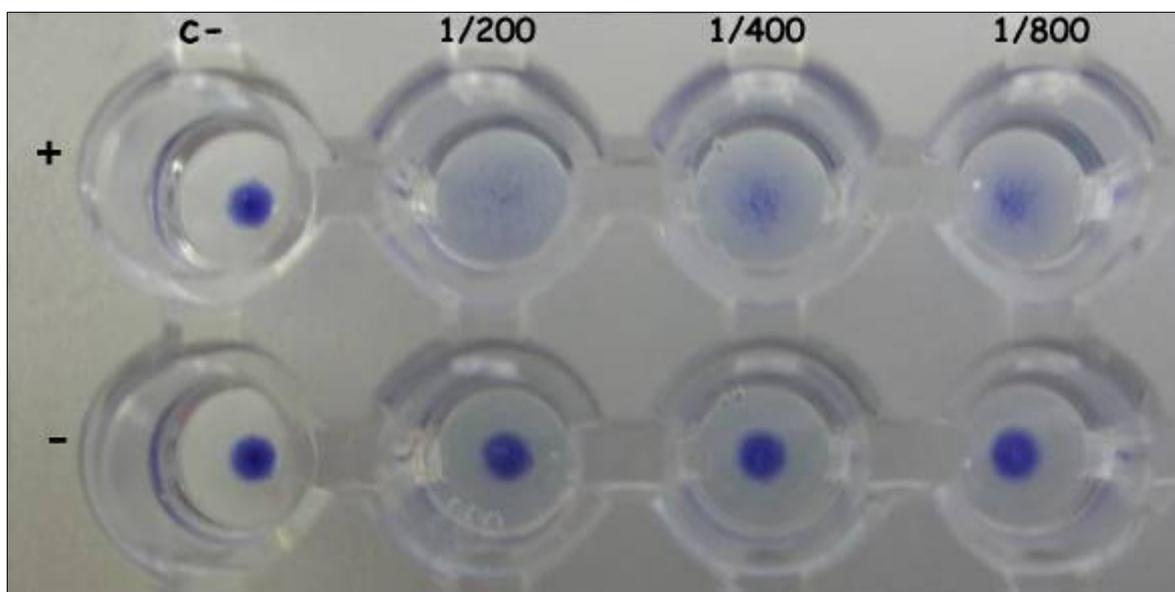


Figura II.15.

Placa de EasyDat. En la fila superior un perro positivo con titulación superior a 1/800; obsérvese que a ese título todavía no se observa un punto definido como en el control negativo. En la fila inferior un suero de un perro completamente negativo

6.4.- Valoración de la respuesta inmune celular

Los métodos de valoración de la respuesta inmune celular en el campo de la leishmaniosis canina resultan en la mayoría de los casos controvertidos, por su compleja interpretación y por su relativa subjetividad. En esta tesis se ha empleado como test in vivo la intradermorreacción o prueba de la leishmanina y como pruebas in vitro un ensayo de respuesta linfoproliferativa y el test de la reducción del NBT (nitroazul de tetrazolio).

Prueba Intradérmica de la Leishmanina

La utilidad de esta prueba reside en la capacidad de detectar respuesta inmune celular específica frente a *Leishmania*. Aunque el equivalente en el humano (Reacción de Montenegro) se utiliza desde finales de los años veinte, no ha sido implantada hasta los noventa en la práctica veterinaria (Weigle y cols. 1991). Este test intenta poner de manifiesto la actitud frente al parásito de las células inmunitarias (células dendríticas, linfocitos T y macrófagos). Se han observado en la leishmaniosis visceral humana resultados negativos durante la fase activa de la infección, mientras que resulta positiva en infecciones subclínicas, en fases tempranas y en las evoluciones positivas después del tratamiento (Cahill 1971). A partir de los estudios de Cardoso y cols. en 1998 se piensa que algo parecido ocurre en el perro.

El fundamento de la prueba es inocular una cantidad determinada de promastigotes inactivados en la dermis del animal, revisando la zona a las 48 y a las 72 horas. Se han probado diferentes soluciones y concentraciones, y parece que la preparación óptima es de 3×10^8 promastigotes/ml en una suspensión fenolada (Cardoso y cols. 1998; Solano-Gallego y cols. 2001a).

Para la preparación de la leishmanina se usaba el mismo cultivo de *Leishmania infantum* (MHOM/FR/78/LEM-75) utilizado en los anteriores ensayos. Los promastigotes se mantenían en recipientes de medio litro a 26.4 °C en medio RPMI 1640 con L-glutamina y NaHCO₃ (SIGMA U.K.), adicionando 5mM de HEPES, 100 U.I./ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina y 10% de suero fetal bovino inactivado con calor. El cultivo se mantiene hasta que la mayoría de los promastigotes están en forma elongada. Después se lava y se diluyen a una concentración de 3×10^8 promastigotes/ml en una solución PBS al 0,5% de fenol (PANREAC) peso/volumen. Para probar la esterilidad de la suspensión se sembraban 2 placas de agar sangre con 0,1 ml, a 26 y 37° C durante 72 horas.

Al animal se le inoculaba 0,1 ml de esta solución en la pared abdominal, lo que implica un total de 30 millones de promastigotes inactivados. Además como control negativo se inoculaba la misma cantidad de solución disolvente (PBS con 0,5% de fenol (PANREAC) peso/volumen) en el otro flanco.

La lectura e interpretación se realizaba a las 72 horas de la inoculación, midiendo el diámetro máximo del habón producido. Se consideraron negativos todos los perros con menos de 5 mm de diámetro, dudosos entre 5 y 6 mm y positivos a partir de 6mm.

Prueba de estimulación linfocitaria

La estimulación de células sanguíneas periféricas mononucleares, se utiliza para conseguir una estimación in vitro de la respuesta celular del paciente ante un determinado antígeno. En la leishmaniosis, el papel preponderante de la inmunidad celular, hace de la prueba de estimulación linfocitaria una valiosa herramienta. Estudios anteriores demuestran que los perros leishmaniosos con síntomas muestran una nula estimulación en el test específico de linfoproliferación, en contraste con perros asintomáticos, con una fuerte respuesta (Rhallem A. y cols. 1999). Además la supresión de la respuesta linfoproliferativa es un indicador temprano de la infección por leishmania en perros presintomáticos (De Luna R. y cols. 1999). Estos resultados avalan el test de la linfoproliferación como parámetro de seguimiento de la inmunidad.

En esta prueba se utilizó como muestra sangre total recogida en tubos heparinizados. Se escogió este procedimiento, en lugar de la separación de las células mononucleares mediante centrifugación en Ficoll-Paque, por la posible inactivación de algunos linfocitos en este medio (Shifrine M. y cols. 1978). Además la utilización de sangre total resulta más sencilla, económica y no reduce la sensibilidad de la prueba.

Tras la toma de la muestra se diluyen 200 μ l en 3 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de glutamina, 100 μ g de estreptomina y 100 UI/ml de penicilina. De esta dilución se toman 12 muestras de 100 μ l, que se echan en los pocillos de una placa de fondo plano para cultivo. La capacidad de proliferación se valoró con un mitógeno inespecífico, Concanavalina A en 3 pocillos, y con un mitógeno específico, la proteína del complejo antigénico fructosa-manosa ligando GP36, en los otros tres. Los seis pocillos restantes se dejaban sin mitógeno. Las cantidades de mitógenos añadidas por pocillo fueron: 100 μ l de Concanavalina A, 100 μ l de GP36 a una concentración de 1 μ g/ml.

La placa se incubó en una estufa a 37° C y 5% de CO₂ durante 5 días. Para valorar la respuesta celular se empleó un kit ELISA (BIOTRAK, Amersham Pharmacia Biotech). Este sistema utiliza BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), un análogo de la timina, en lugar de timina

tritiada, para cuantificar la síntesis de ADN. Con este método se evita el uso de isótopos radioactivos, sin perder sensibilidad, obteniendo un alto nivel de correlación con la proliferación celular. Tras los cinco días de incubación se añaden 20 μ l de BrdU: a los 3 pocillos con Con A, a los 3 pocillos con GP36 y a los 3 pocillos sin mitógeno; además se pone la misma cantidad en otros 3 pocillos vacíos (control 1). Estos últimos sirven de control, para valorar las uniones no específicas del BrdU al fondo de la placa. Los 3 pocillos con muestra y sin BrdU (control 2) darán información de las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la muestra.

A modo de resumen, en una placa, tras la primera incubación hay: 3 pocillos con muestra + mitógeno inespecífico (Con A) + BrdU; 3 pocillos con muestra + GP36 + BrdU; 3 pocillos con muestra + BrdU; 3 pocillos con BrdU (control 1) y 3 pocillos con muestra sin BrdU (control 2).

Para que el análogo de la timina se incorpore al ADN se incuba durante 1 día en las mismas condiciones, después se centrifuga a 300 xg durante 10 minutos y se quita el sobrenadante.

Para fijar las células al fondo del pocillo se utiliza un secador de aire durante 15 minutos, luego se añaden 200 μ l de solución fijadora a cada pocillo incubando 30 minutos a temperatura ambiente, se elimina el fijador y se echan 200 μ l de solución bloqueante por pocillo y se incuba otros 30 minutos a temperatura ambiente. Se elimina la solución bloqueante y se añaden 100 μ l por pocillo de solución de anticuerpos anti-BrdU marcados con peroxidasa y se incuba 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lava cada pocillo tres veces con 300 μ l de solución de lavado. Inmediatamente se echan 100 μ l de solución TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), que sirve como sustrato para la enzima peroxidasa. Se mezcla e incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene pipeteando 25 μ l de ácido sulfúrico 1 M en cada pocillo. Se debe apreciar una clara gradación de color entre los pocillos. En los siguientes 5 minutos hay que medir la densidad óptica en un lector a una longitud de onda de 405 nm.

Los pocillos controles (1.-sin muestra y con BrdU, 2.- con muestra sin BrdU) no deben dar una absorbancia superior a 0.1.

El resultado final de la proliferación celular en presencia de Con A se obtiene restando la media de las densidades ópticas de los pocillos con mitógeno menos la media de los pocillos sin mitógeno.

El incremento de proliferación en presencia de GP36 es el resultado de restar la media de los pocillos con mitógeno específico menos la media de los pocillos sin mitógeno.

Test de Reducción del NBT

Esta prueba permite explorar la funcionalidad leucocitaria, muy importante en la leishmaniosis. Aunque comenzó a usarse en 1967 por Baehner y Nathan como diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica de la infancia, pronto su uso se extendió a todos los estados en que presumiblemente debiera existir alguna alteración en el funcionalismo leucocitario; de esta forma el NBT test pasó a ser una prueba funcional del leucocito circulante, especialmente en los estados infecciosos.

La base morfológica, citoquímicamente apreciable, del NBT test se sitúa en el cambio de coloración que sufre el nitroazul de tetrazolio, de amarillo en su forma soluble a azul oscuro al reducirse a formazan insoluble, claramente apreciable por microscopía óptica. La membrana intacta del leucocito no es permeable al NBT, siendo necesaria la producción de cambios en ésta para que pueda ser atravesada. Para lograr la permeabilización se requiere la presencia de factores tales como bacterias o productos derivados de ellas, complejos antígeno-anticuerpo o una interacción del complemento; todo ello condiciona la relación entre la reducción del NBT y la capacidad bactericida de los granulocitos. La penetración del NBT al interior de la célula se realiza por fenómenos de pinocitosis como corresponde a un cuerpo soluble. La reducción se produce en el interior de la vacuola fagocítica por medio de la NADPH-oxidasa.

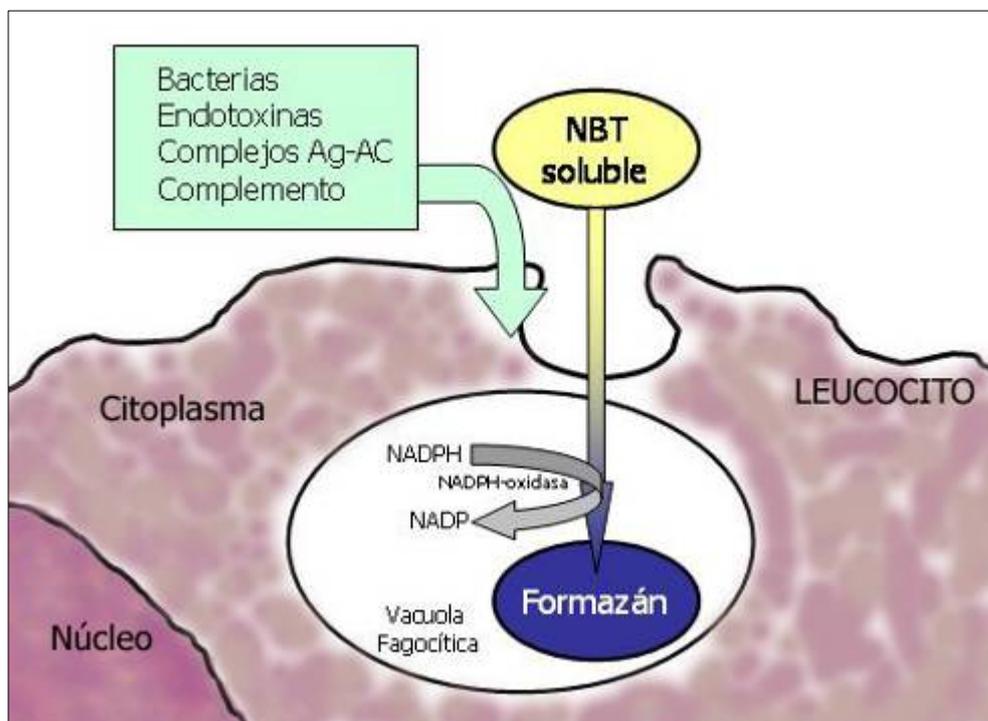


Figura II.16.

Esquema de la reducción celular del Nitroazul de Tetrazolio

El conocimiento del mecanismo a través del cual se produce la reducción del NBT, implica la necesidad de admitir la integración de dos condiciones que la hagan factible: Es necesaria la presencia de factores permeabilizadores de la membrana y también la normalidad de la función fagocítica que permita dicha reducción.

Aunque esta prueba se ha utilizado en medicina humana para el seguimiento de enfermedades tan diversas como las faringitis estreptocócicas, la tuberculosis, las neoplasias febriles, las meningitis bacterianas, las sepsis por *Candida albicans*, la malaria y otras enfermedades parasitarias, no ha sido utilizada en el ámbito clínico de la leishmaniosis canina.

La técnica del NBT puede realizarse a partir de muestras sin anticogulantes o con sangre anticoagulada. Por su mayor sencillez se eligió el segundo procedimiento (Ashburn y cols. 1973).

La sangre recogida (3ml) en tubos con EDTA se dejaba reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación previa agitación suave se llenaban 2 tubos de Wintrobe por muestra, centrifugándolos a 400 xg durante 10 minutos, de esta forma se obtenía el acumulo leucocitario entre el suero y los hematíes que era extraído mediante pipeta Pasteur y depositado en tubos de plástico estériles.

La incubación de los leucocitos con NBT se realizó depositando 0,05 ml de suspensión de leucocitos con la misma cantidad de solución NBT al 0,1% de concentración en tampón fosfato, durante 15 minutos en una estufa a 37° C, con una presión parcial de CO₂ del 5% y humedad a saturación, y otros 15 minutos a temperatura ambiente.

Después de los 30 minutos de incubación se realizan las extensiones sobre portaobjetos de vidrio en la forma habitual.

Como tinción de contraste y sin ninguna fijación previa se utilizó la solución de Giemsa diluida (dos gotas de solución comercial de Giemsa (Merck) por ml de agua destilada) durante 10 minutos.

Para valorar la reducción del NBT se cuentan 100 leucocitos, cuya morfología sea inequívoca y huyendo de los acúmulos celulares, contabilizando como positivas las que muestren acúmulo citoplasmático de formazán; su número total define el índice de reducción del NBT.

6.5.- Cultivos de progenitores hematopoyéticos

La valoración del efecto de la hiperprolactinemia sobre la hematopoyesis se llevó a cabo mediante cultivos de progenitores hematopoyéticos en medio semisólido y en medio líquido. Desde hace unos años se encuentran disponibles de manera comercial medios de cultivo con diferentes cantidades de citoquinas y factores estimulantes de colonias, para la especie humana. El primer objetivo fue la comprobación de su utilidad, en el perro y en diferentes especies animales y su posterior estandarización.

Para demostrar la utilidad de esta técnica en el perro, el gato y en otras especies utilizadas en experimentación animal se diseñó el siguiente ensayo. Se tomaron muestras de sangre periférica (punción yugular- perro y gato-, punción retroorbital- ratón, hámster, rata- e intracardiaca- cerdo y conejo) a 5 animales de cada especie, en tubos que contenían 5 ml de medio de cultivo McCoy's 5a y heparina de litio libre de aditivos (10U/ml). El volumen extraído dependió de la especie y se refleja en la **Tabla II.7.**

	Número de animales	Volumen extraído (ml)
Perro	5	5
Gato	5	5
Ratón CD1	5	1
Rata Wistar	5	3
Hamster Sirio	5	2,5
Cerdo	5	5
Conejo	5	5

Tabla II.7.

Volumen sanguíneo extraído en cada especie

Todas las muestras se procesaron de inmediato para evitar el daño celular. A continuación se separaron las PBMNC (células mononucleares de sangre periférica) usando la siguiente metodología; se diluye la muestra (1:1) con suero fisiológico y se vierte en un tubo con 5ml de Ficoll-Paque PLUS (StemCell Technologies) densidad 1077 g/ml. Después se centrifuga a 400 xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Usando una pipeta Pasteur se elimina el sobrenadante sin dañar la capa de células mononucleares que se encuentra en la interfase. A continuación se aspiran las PBMNC y se trasladan a un tubo estéril de poliestireno y se realizan tres lavados con volúmenes de 5 ml de medio McCoy's 5a y

centrifugando a 400 xg durante 5 minutos. Para establecer el número y la concentración de células se usó un contador celular automático.

Se sembraron 150000 células en 2ml en placas de Petri de 35mm de diámetro, usando medios semisólidos y medios líquidos.

Medios semisólidos: se usaron 4 medios estandarizados que contenían citoquinas recombinantes humanas con una base de metil celulosa (StemCell Technologies, Vancouver, Canada).

1.- MethoCult™ GF⁺ H4435: 1% Metilcelulosa en Iscove's MDM, 30% (FBS) suero fetal bovino, 1% BSA, 10⁻⁴M 2-Mercaptoethanol, 2mM L-glutamine, 50ng/ml rh Stem Cell Factor, 20ng/ml rh GM-CSF, 20ng/ml rh IL-3, 20ng/ml rh IL-6, 20ng/ml rh G-CSF, 3 u/ml rh Epo. Este medio se ha estado utilizando en ensayos con progenitores hematopoyéticos humanos muy primitivos (Kaufman y cols. 2001; Wang y cols. 2002)

2.- MethoCult™ GF H4534: 1% Metilcelulosa en Iscove's MDM, 30% FBS, 1% BSA, 10⁻⁴M 2-Mercaptoethanol, 2mM L-glutamine, 50ng/ml rh Stem Cell Factor, 10ng/ml rh GM-CSF, 10ng/ml rh IL-3, sin Epo (eritropoyetina).

Este medio se recomienda para el cultivo de progenitores hematopoyéticos humanos de médula ósea, sangre periférica, del cordón umbilical, de productos de la leucoféresis y células CD34+ purificadas (Gribaldo y cols. 2000; LaRosee y cols. 2002).

3.- MethoCult™ GF⁺ H4535: 1% Metilcelulosa en Iscove's MDM, 30% FBS, 1% BSA, 10⁻⁴M 2-Mercaptoethanol, 2mM L-glutamine, 50ng/ml rh Stem Cell Factor, 20ng/ml rh GM-CSF, 20ng/ml rh IL-3, 20ng/ml rh IL-6 and 20ng/ml rh G-CSF (sin Epo). Este medio resulta apropiado para el cultivo de progenitores muy primitivos en poblaciones purificadas (Keir y cols. 2000).

4.- MethoCult™ SF^{BIT} H4236: 1% Metilcelulosa en Iscove's MDM, 1% BSA, 10µg/ml Insulina Recombinante Humana, 200µg/ml Trnsferrina humana (a saturación en hierro), 10⁻⁴M 2-Mercaptoethanol, 2mM L-glutamine. Este medio no contiene FBS, Epo o citoquinas recombinantes humanas.

Todas las placas se incubaban en una estufa a 37° C con una presión parcial de CO₂ del 5% y humedad a saturación máxima. Después de 21 días de incubación se leyeron los cultivos usando un microscopio invertido.

En la lectura se contaron el número de clusters (menos de 50 células) y de colonias (más de 50 células). También se tipificaron el tipo celular al que pertenecía cada colonia, diferenciando CFU-GM (granulo macrofágica), CFU-E (eritroide), CFU-Mk (megacariocítica) y CFU-Mix (mixta GM y E).

Medio líquido: para el estudio de otras características del crecimiento se usaron cultivos en medio líquido. Con las mismas muestras se sembraron 1×10^6 PBMNCs en placas de Petri de 35 mm con 3ml de medio McCoy's 5a , incubándose en las mismas condiciones que las anteriores. Cada semana se renovaba la mitad del medio de cultivo, leyéndose el día 14 y el día 30 en un microscopio invertido. Posteriormente se desechaba el sobrenadante, tiñéndose las células adheridas al fondo de la placa con May Grünwald-Giemsa, para observarlas usando un microscopio convencional.

Los parámetros que se valoraron en este ensayo fueron el crecimiento total, el grado de confluencia y la relación macrófagos/células fibroblásticas.

1. *Crecimiento total.* Se dividió en cuatro grados subjetivos; 0 ausencia de crecimiento en la placa, 1 bajo grado de crecimiento, 2 grado medio y 3 crecimiento intenso o masivo. Todas las placas fueron evaluadas por un observador entrenado.

2. *Grado de confluencia.* Hace referencia a la capacidad para formar mallas que tienen las células fibroblásticas, encontradas en el fondo de la placa. Se valoró con un patrón subjetivo similar al anterior en el que se clasificó de 0, no confluencia, a 3, altísimo grado de confluencia.

3. *Relación macrófagos/células fibroblásticas.* Se evaluó contando 100 células de 5 campos diferentes y obteniendo la relación en forma de fracción entera. Este último parámetro, por la dificultad que supone el contaje con las células vivas, se hizo con las células fijadas y teñidas.

Inmunocitoquímica: para la comprobación de la naturaleza (stem cells, progenitoras hematopoyéticas) de las células cultivadas en medio líquido se usaron anticuerpos monoclonales heterólogos anti-CD34 (115 kDa), específicos de este tipo celular (Abbas y cols. 2002). Se utilizó el kit PeliCluster CD34 (M1636, CLB), siguiendo la técnica FFAFA (fosfatasa alcalina anti fosfatas alcalina) conjugada con Streptavidina. Las muestras (células del fondo de las placas de medio líquido) habían sido congeladas a -20° C y envueltas en papel de aluminio. Para su preparación se descongelaban retirando la envoltura pasados 30 minutos. A la vez se descongelaban los anticuerpos monoclonales y se ponía el sustrato del Fast-Red a temperatura ambiente. También se preparaba una solución de trabajo TBS (Concepta cod. co523 V2LT) pH 7,6 al 1/10 de concentración en volumen.

La fijación de las muestras se hacía con acetona (Merck) durante 10 minutos, y mientras secaban, se aplicaba con cuidado el Sigmacotc (Sigma) alrededor del campo delimitado. Se dejaban secar otros 15 minutos y a continuación se aplicaba el anticuerpo monoclonal (CD34), incubando durante 60 minutos en una cámara húmeda. Después se lavaba con TBS 1/10 y se quitaba el exceso de líquido y se aplicaban 3 gotas del reactivo LINK (Anticuerpo

puente rabbit anti-mouse, Biogenex HK-340-9K) cubriendo las extensiones e incubando durante 20 minutos en la cámara húmeda. Se realizaba otro lavado con TBS 1/10, retirando el exceso de líquido, y se aplicaba el reactivo LABEL (complejo enzimático fosfatasa alcalina-streptavidina, Biogenex HK-330-59K), cubriendo las extensiones e incubando 20 minutos en la cámara húmeda. Se volvía a lavar otras dos veces con TBS 1/10 y se cubrían las extensiones con CHROMOGEN (colorante Fast-Red, Biogenex HK 182-5K), incubando 40 minutos en la cámara húmeda, después se volvía a lavar por inmersión, tiñendo finalmente las preparaciones con Hematoxilina durante 10 minutos, para contrastar. Tras el último lavado se montaban las extensiones (Aquatex 108562, Merck) y se dejaban secar.

6.6.- Análisis estadístico

Los resultados que se obtuvieron de los ensayos anteriores fueron sometidos inicialmente a un análisis descriptivo.

La normalidad de los datos fue analizada por el test de Kolmogorov-Smirnov. Una vez comprobada se aplicó el análisis de homogeneidad de varianzas de Levene. De acuerdo con los resultados de estos análisis y tras realizar un ANOVA, los datos se analizaron en función del tipo de ensayo con las siguientes pruebas estadísticas: Test de la T de Student y Test de Scheffe.

Para valorar adecuadamente la prueba diagnóstica del EasyDAT se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, eficacia y la J de Youden. Los test diagnósticos se desarrollan para detectar una enfermedad subclínica o para reemplazar otra técnica muy laboriosa o cara. Un test diagnóstico debería tener una validez alta, lo que significa que los porcentajes de resultados falsos positivos y falsos negativos deberían ser limitados. La validez será expresada por la Sensibilidad y la Especificidad, pero para determinarlos es necesaria una segunda prueba, llamada test de oro o estándar con una validez de aproximadamente el 100%. En ese caso la evaluación de la primera prueba se hace fácilmente usando una tabla de contingencia de 2x2.

		Enfermedad (gold standard)		
		Sí	No	Total
Prueba comparativa	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
	Total	A+C	B+D	N

Donde:

A= número de muestras detectados como positivos por el gold standard.

B= número de muestras falsas positivas.

C= número de muestras falsas negativas.

D= número de muestras detectadas como negativas por el gold standard.

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{A}{(A + C)} \times 100$$

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{D}{(B + D)} \times 100$$

Se debe tener en cuenta que en la clínica, al enfrentarse a un caso, obviamente este no ha sido previamente clasificado. La cuestión que se plantea es ¿ante un caso con un resultado positivo, qué probabilidad hay de que realmente esté afectado? y ¿ante un caso con resultado negativo, qué probabilidad hay de que realmente no esté afectado? Las respuestas las proporcionan otros coeficientes, igualmente calculados a partir de la tabla de contingencia; **valores predictivos**.

El VPP o valor predictivo positivo se obtiene aplicando la siguiente fórmula: $\frac{A}{(A + B)} \times 100$

El VPN o valor predictivo negativo se obtiene aplicando la siguiente fórmula: $\frac{D}{(C + D)} \times 100$

Estos valores nos permiten valorar la eficacia real de una prueba, pero hay que tener en cuenta que están muy influenciados por la prevalencia de la enfermedad. Por lo tanto no se podrán aplicar los mismos coeficientes a otras localizaciones con diferente prevalencia.

Cálculo de la J de Youden.

Otro parámetro que se ha calculado y que informa acerca de la calidad de un resultado en una prueba diagnóstica es la J de Youden, cuyo cálculo se hace con la siguiente fórmula:

$$J = S + E - 1.$$

Donde S es Sensibilidad y E es Especificidad.

Cuanto más se aproxime a 1 el valor de la J de Youden, mayor es la calidad del resultado obtenido al aplicar una técnica sobre una muestra.



Resultados

1.- ESTRUCTURA DE LOS RESULTADOS

Los resultados, por tratarse de ensayos bien diferenciados, se han agrupado respetando la división anteriormente expuesta en el apartado Material y Métodos. Además se han elaborado dos subapartados que describen las pruebas de validación del EasyDAT y la estandarización de los cultivos de progenitores hematopoyéticos porque las dos técnicas se utilizaron en los demás ensayos.

2.- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELABORACIÓN DEL ANTIGENO EASYDAT

La aglutinación directa es una prueba serológica empleada en el diagnóstico de la leishmaniosis canina. Uno de sus mayores inconvenientes radica en el largo y complejo proceso de elaboración del antígeno lo que afecta a la calidad del antígeno final; este trabajo intenta superar este problema.

Para validar la nueva técnica de elaboración del antígeno había que demostrar que no se alteraba ni la sensibilidad, ni la especificidad respecto de los datos obtenidos con antígenos tradicionales; además era importante observar si existían divergencias entre el título final de un mismo suero testado con los dos antígenos.

Se diseñó el experimento descrito en el apartado 6.3. (Pruebas diagnósticas indirectas) de Material y Métodos con 290 perros, de los que 139 eran positivos al aislamiento y a la visualización directa, y 151 eran negativos con las mismas pruebas. Para esta prueba se usó como gold estándar el aislamiento y la visualización mediante microscopía óptica.

El suero de cada perro se testó con los dos antígenos, obteniendo los resultados descritos en la **Tabla III. 1.**

	Diagnóstico Parasitológico (+) Grupo A	Diagnóstico Parasitológico (-) Grupo B
E-DAT (+)	139	2
E-DAT (-)	0	148

Tabla III. 1.

Resultados de los 290 perros en el estudio de validación del antígeno

La tabla de contingencia anterior arroja una sensibilidad para el antígeno EasyDAT de 100% [$139/(139+0)$], una especificidad de 98.7% [$148/(148+2)$], un valor predictivo positivo (VPP) de 98,5%, un valor predictivo negativo (VPN) del 100%. También se calculó la J de Youden obteniendo un valor de $J= 0,987$, muy cercano a 1.

El título de corte se estableció para ambas pruebas en 1/800, obteniendo títulos idénticos para todos los sueros, realizando titulaciones hasta 1/12800.

Al concluir este primer testaje el suero sobrante (únicamente se emplean 10 μ l de muestra) se congelaba a -70° C y para evaluar el tiempo de vida útil del antígeno cada suero se testaba cada mes. Se comprobó que la vida útil del antígeno eran 6 meses, similar a la del antígeno DAT tradicional.

3.- ESTANDARIZACIÓN DEL CULTIVO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES

El uso de los cultivos de progenitores hematopoyéticos como instrumento de valoración de la hematopoyesis, es muy frecuente en medicina humana, sin embargo en el ámbito de la experimentación animal la ausencia de medios de cultivos específicos ha hecho de éste un campo inexplorado.

Aunque la metodología desarrollada iba dirigida a implementar el ensayo con los perros Beagles (apartado III. 5.- **Relación de la hiperprolactinemia inducida por Domperidona con la hematopoyesis y la funcionalidad leucocitaria en Beagles sanos**) se decidió estudiar su estandarización en diversas especies animales (rata, ratón, hamster, cerdo y gato) además de hacerlo con los perros.

En todas ellas se siguió la misma metodología, variando únicamente la cantidad de sangre recogida, y usando los mismos medios líquidos y semisólidos, ampliamente descritos en el apartado de Material y Métodos, y resumidos en la **Tabla III. 2.**

En primer lugar se exponen los resultados para la especie canina y a continuación, de una manera global los datos para las demás especies.

	Denominación	EPO	CSF-G	CSF-GM
MethoCult™ GF ⁺ H4435	A	+	+	+
MethoCult™ GF H4534	B	-	-	+
MethoCult™ GF ⁺ H4535	C	-	+	+
MethoCult™ SF ^{BIT} H4236	D	-	-	-

Tabla III. 2.

Medios de cultivos semisólidos utilizados en la estandarización

3.1. Especie canina

Se sembraron las PBMNCs obtenidas de la sangre periférica en placas de Petri con medios semisólidos y con citoquinas recombinantes humanas. Todos ellos contienen methylcellulosa, lo que les da el carácter semisólido. Esta circunstancia hace que el crecimiento de las células se produzca formando clusters (agregados de menos de 50 células) y colonias (agregados de más de 50 células), **Figura III.1.**, sobre las que se realizaron los estudios cuantitativos y cualitativos a los 21 días post siembra.

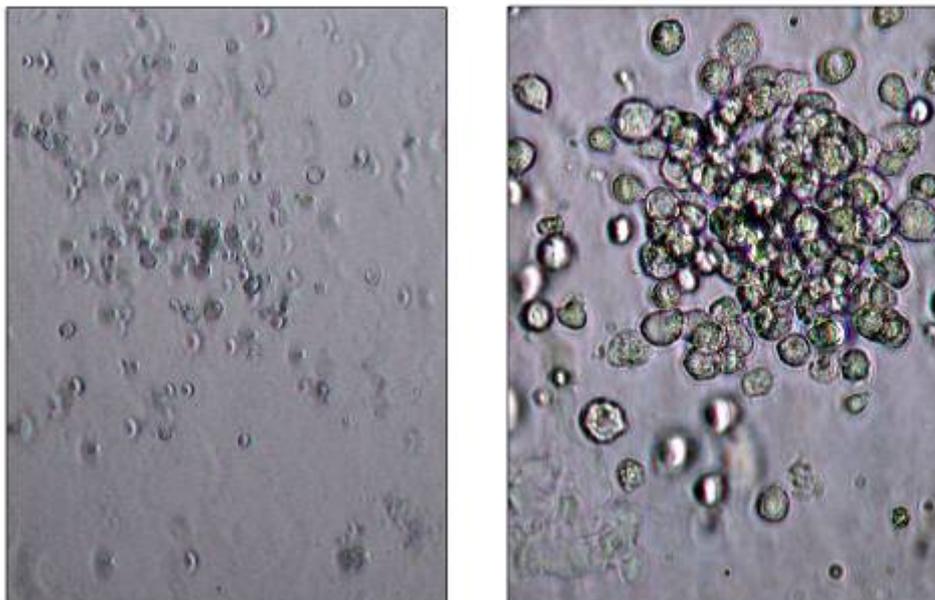


Figura III.1.

Proliferación granulocítico-macrofágica: Cluster (menos de 50 células) en la imagen de la izquierda y colonia en la de la derecha

El crecimiento en los distintos medios (número de colonias medio \pm DE) se refleja en el **Gráfico III. 1**. Se observó respuesta proliferativa de todas las líneas hematopoyéticas en relación con la composición de citoquinas en cada medio, como demuestran las **Figuras III.2., III.3. y III.4.** Además se detectó el crecimiento de una colonia GMMk (megacariocítica) en dos de las placas del medio B.

En ninguno de los 5 perros se observó crecimiento en las placas con medio D que no contiene eritropoyetina, ni suero fetal bovino, ni citoquinas recombinantes.

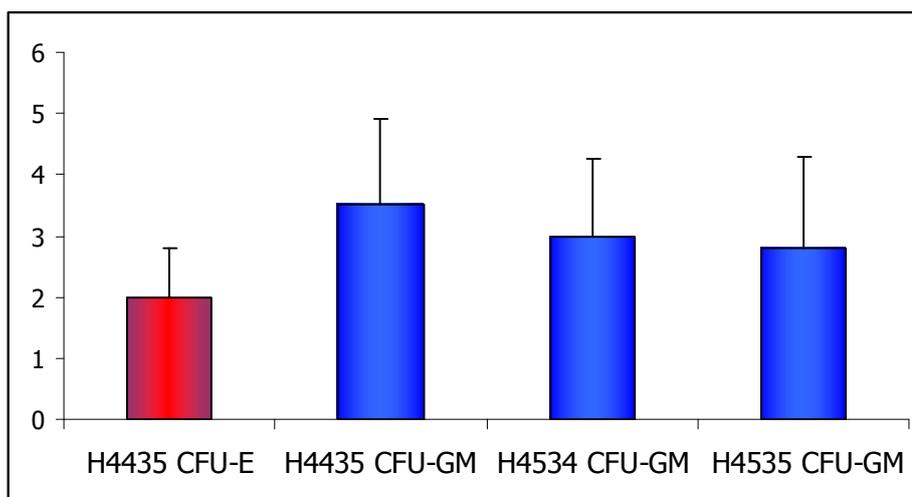


Gráfico III. 1.

Número de colonias (media \pm DE) en los diferentes medios semisólidos



Figura III.2.

Serie eritroide: crecimiento de burst (BFU-E)

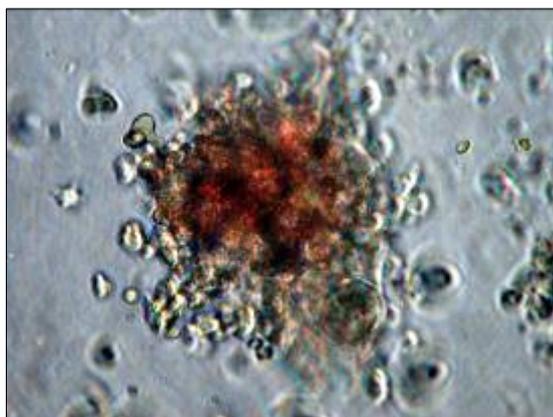


Figura III.3.

Serie eritroide: crecimiento de colonia (CFU-E)



Figura III.4.

Crecimiento de colonias CFU-GM en medio semisólido

Además del estudio en medios semisólidos se sembraron placas con medio líquido (McCoy's 5a). Los parámetros que se valoraron fueron el crecimiento total, el grado de confluencia y la relación macrófagos/fibroblastos. A continuación se retiraba el sobrenadante y se teñía con May Grünwald-Giemsa observando la morfología celular (**Figura III.5. y III.6.**).

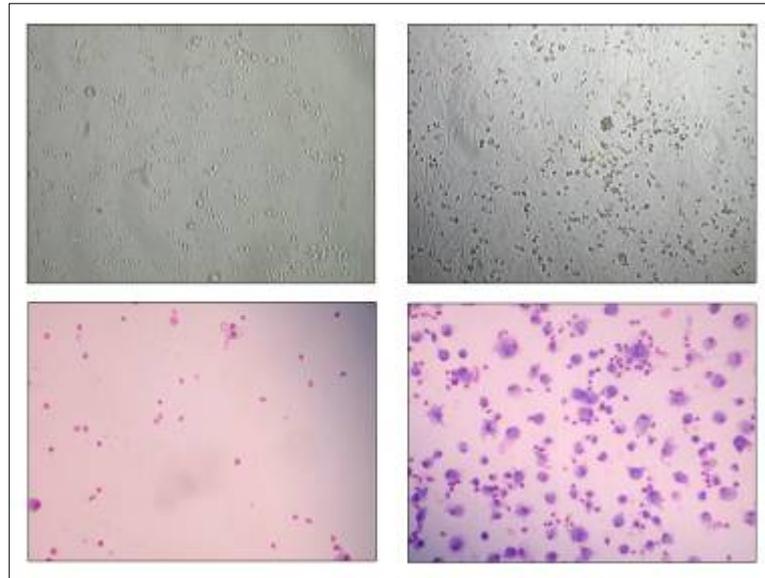


Figura III.5.
Diferentes grados de crecimiento,
en fresco y teñidos, en medio líquido.

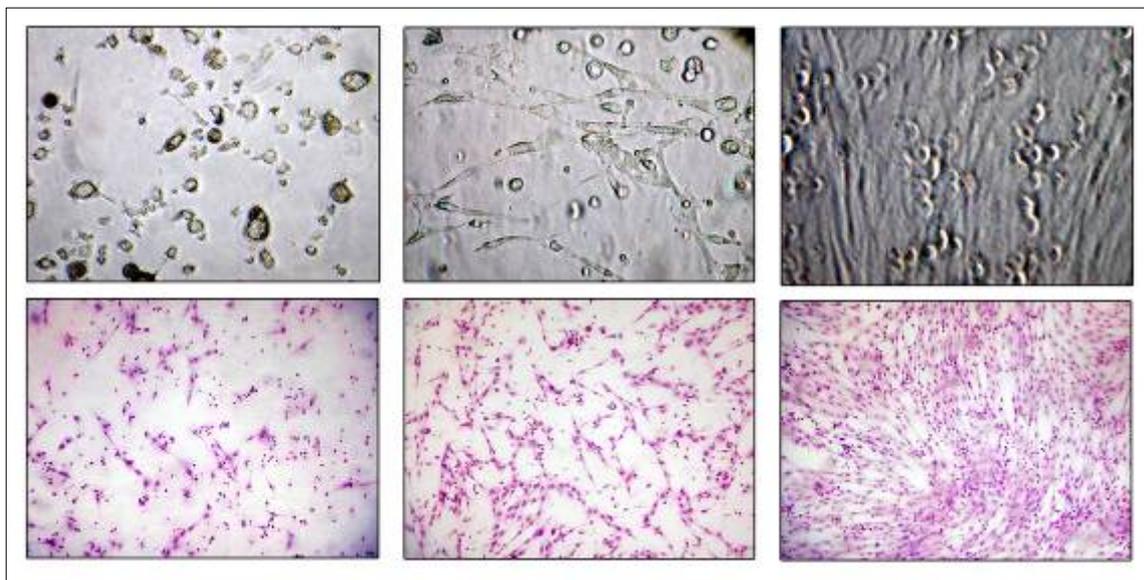


Figura III.5.
Grado de confluencia en medios líquidos en fresco y teñidos.
De izquierda a derecha, ausencia, grado medio y grado alto de confluencia

Los resultados obtenidos en medio líquido en la especie canina fueron un crecimiento total bajo-medio (1-2), una relación macrófagos-fibroblastos 2 a 1 y un grado de confluencia bajo.

Se describieron dos poblaciones celulares, una formada por elementos macrófágicos y la otra por elementos fibroblásticos.

El estudio inmunocitoquímico para tipificar estas poblaciones incluyó la aplicación de anticuerpos monoclonales anti-CD34 (células progenitoras hematopoyéticas) que detectaron una intensa positividad sobre la población fibroblástica como se demuestra en la **Figura III.6.**

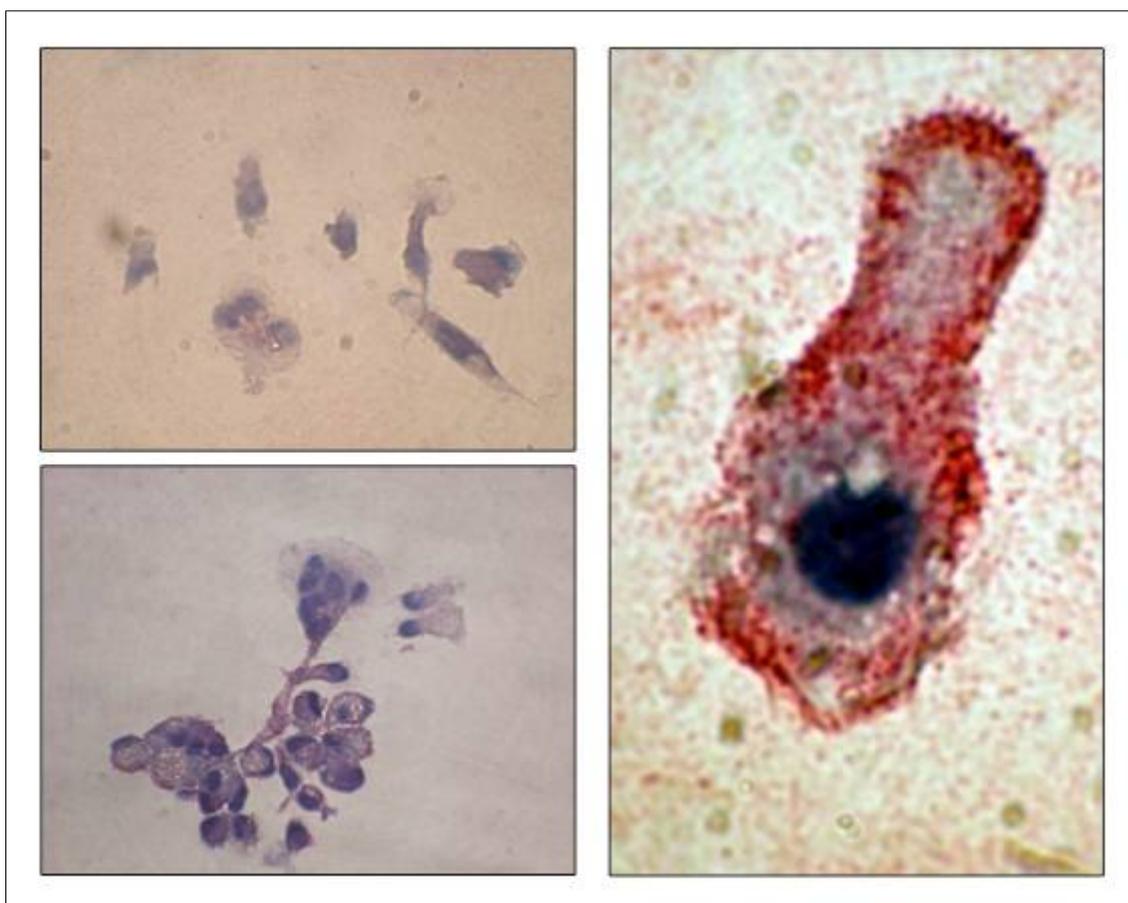


Figura III.6.

En la parte superior izquierda se observan células CD34 negativas.

**Debajo un grupo fibroblásto-macrofágico CD34 positivo
(gránulos rojos en la membrana celular).**

A la derecha detalle de una de estas células

CD34 positiva

3.2.- Rata, hámster, ratón, conejo, cerdo y gato

En estas especies se realizó la misma metodología expuesta en el perro. A continuación se hace una descripción global de los resultados de acuerdo al tipo de medio de cultivo, semisólido o líquido.

Medio semisólido

En la **rata**, los cultivos realizados con el medio A registraban un significativo crecimiento formado por pequeños clusters que cubrían la placa, sin embargo, con el medio B se obtuvieron un número muy reducido de colonias por placa ($3 \pm 1,2$; Media \pm DE), en los que a pesar de la ausencia de Epo se detectaban crecimientos del tipo CFU-Mix (familia mieloide y eritroide) como se observa en la **Figura III.7**. Además se observó la presencia de un alto número de células fibroblásticas. En ninguno de los ensayos realizados se obtuvo crecimiento celular en el medio C.

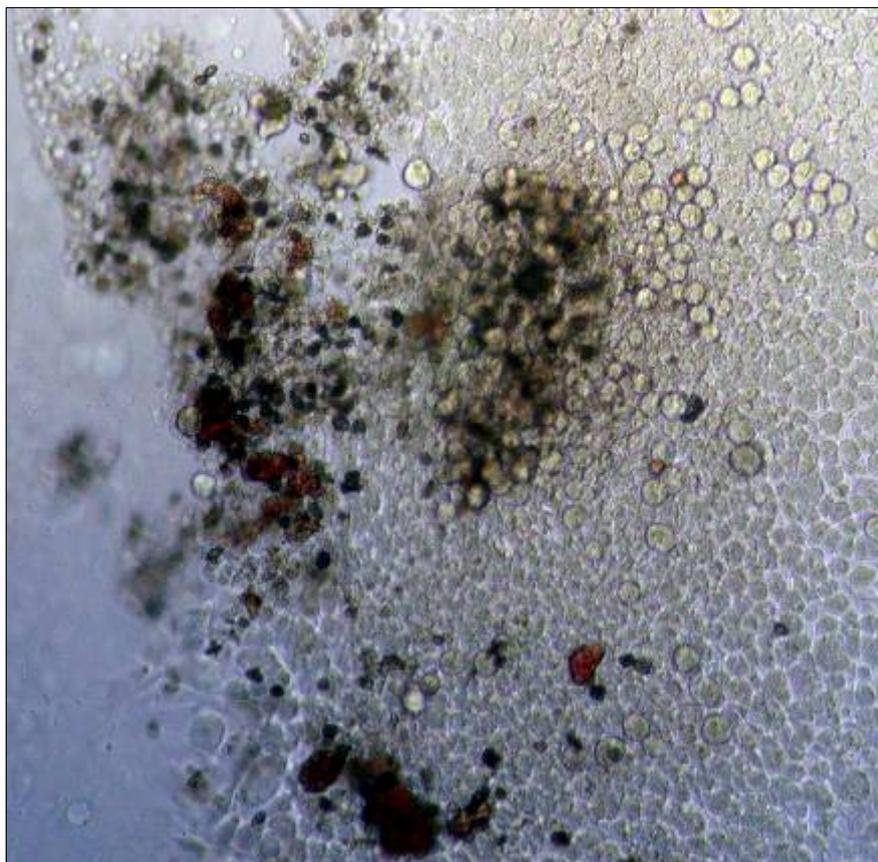


Figura III.7.

Cultivo de rata en medio semisólido.

Colonia CFU-Mix con elementos mieloides y eritroides hemoglobinizados

El crecimiento global observado en el **hámster** fue notablemente superior al de la rata, obteniéndose $196 \pm 83,0$ (Media \pm DE) CFU-Mix por placa en el medio A. De la misma manera, en los cultivos realizados en medio B, la placa evidenció un crecimiento en sábana, **Figura III.8.**, apareciendo siempre cubierta por un número incontable de elementos mieloides. También se realizó el cultivo de PBMNCs en medio C, observándose la proliferación de un centenar de colonias CFU-Mix por placa ($103 \pm 47,6$; Media \pm DE) a pesar de que este medio carece de Epo, como ocurría en el caso del B en rata.

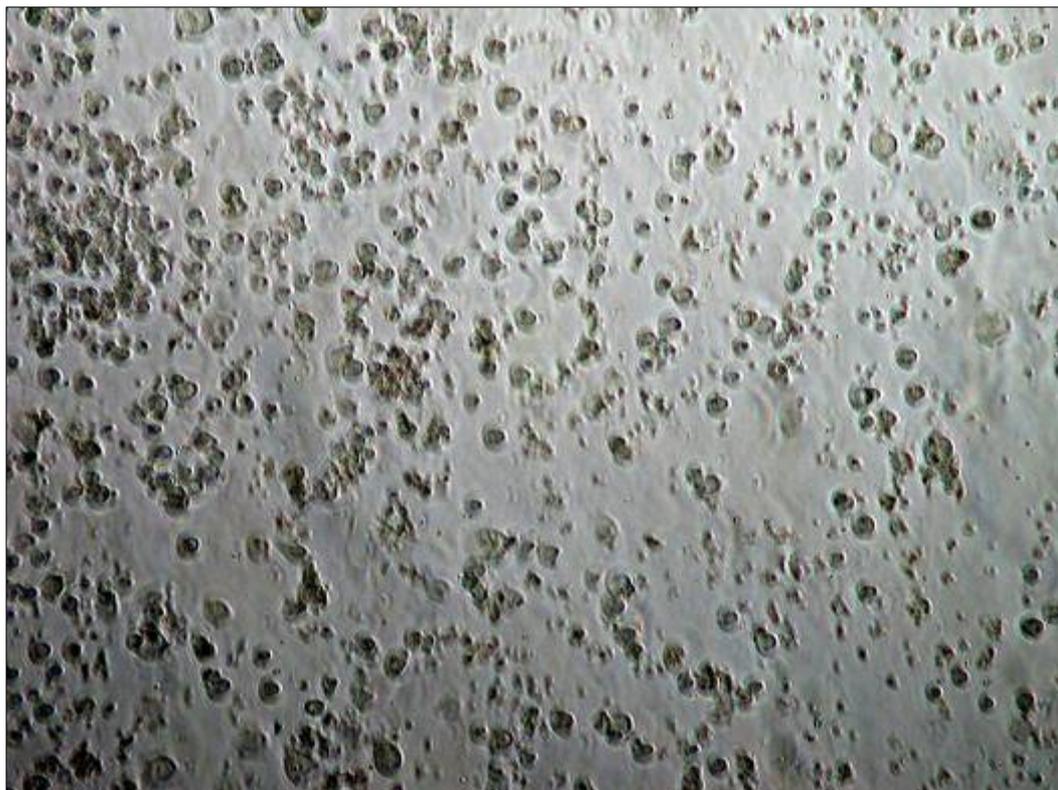


Figura III.8.

Cultivo semisólido de hámster: crecimiento en sábana

En los cultivos realizados de PBMNCs provenientes de sangre de **ratón** en los medios A, B y C apareció un bajo número de CFU-GM ($3 \pm 0,9$; $2 \pm 1,2$ y $0,5 \pm 0,9$ respectivamente; Media \pm DE), aunque se formó una densa red de células fibroblásticas cubriendo las placas.

En los cultivos realizados con PBMNCs provenientes de sangre de **conejo** aparecieron colonias CFU-GM ($28 \pm 2,3$; $19 \pm 1,8$ y $15 \pm 1,3$) en los medios A, B y C. Además se observaron colonias CFU-E ($32 \pm 4,6$) en el medio A.

En el **cerdo** se observó un gran crecimiento. El número de colonias CFU-GM fue muy alto en los tres medios con citoquinas (158 ± 24 , $173 \pm 18,5$ y $163,2 \pm 21,3$) A, B y C, respectivamente. Únicamente crecieron colonias CFU-E ($110,3 \pm 11,9$) en el medio A.

También se comprobó la presencia de una tupida malla fibroblástica en todas las placas anteriores como se demuestra en la **Figura III.9.**



Figura III.9.

Cultivo semisólido de cerdo: se observa una tupida malla fibroblástica

El crecimiento obtenido en medios semisólido a partir de los progenitores hematopoyéticos **felinos** fue escaso. Se obtuvieron colonias CFU-GM ($6,3 \pm 4,5$; $4,8 \pm 2,2$ y $2,9 \pm 1,8$) en los medios A, B y C, respectivamente. También se observaron una media de $2,3 \pm 1,1$ colonias CFU-E en el medio A.

En ninguna placa de todas las cultivadas en las 6 especies hubo crecimiento celular en medio D, carente de suero fetal bovino, eritropoyetina y citoquinas recombinantes humanas.

Medio líquido

Después de obtener las PBMNCs a partir estas 6 especies, también se sembraron en placas con medio líquido McCoy's 5A (1×10^6 células por placa). Trascorridos 21 días desde la siembra, mediante microscopía óptica, se valoraron los mismos parámetros que en la especie canina (crecimiento total, grado de confluencia y relación macrófagos-fibroblastos). Además se examinó la proliferación de los distintos tipos celulares.

Se observó que el **grado de crecimiento** era distinto para cada una de las especies y utilizando una escala subjetiva, se comprobó que en el caso del hámster el crecimiento era alto (grado 3 de crecimiento), mientras que las células provenientes del ratón y de la rata mostraban un crecimiento medio y bajo respectivamente (grado 2 y 1 de crecimiento).

En el conejo se estimó en 1, crecimiento bajo, mientras que en el cerdo fue de 3, crecimiento alto.

El gato mostró un crecimiento medio, grado 2.

En cualquier caso, siempre se observó crecimiento en todas las placas, independientemente de la especie de origen.

Otro parámetro que se valoró fue el **grado de confluencia** de las células en la placa, lo que refleja el patrón de crecimiento fibroblástico. Las células originarias de ratón y hámster mostraron un índice de confluencia medio (grado 2 de confluencia), mientras que en rata las células aparecían aisladas (grado 1 de confluencia).

En conejo y en gato el grado de confluencia fue bajo, grado 1, mientras que en el cerdo se observó un grado 3, con formación de grandes redes.

Tras realizar una tinción de May Grünwald-Giemsa se pudo realizar un estudio morfológico de las células presentes en la placa y al igual que en el perro se identificaron dos tipos de subpoblaciones celulares, macrofágicas y fibroblásticas. En el hámster, el ratón, el conejo y el gato la relación macrófagos/fibroblastos fue de 2 a 1, mientras que en rata y cerdo el índice era mayor (3 a 1).

Por último, mediante inmunocitoquímica, se demostró la presencia mayoritaria del marcador de stem cells hematopoyéticas CD34 en las células de la subpoblación fibroblástica, como se demuestra en la **Figura III.10**.

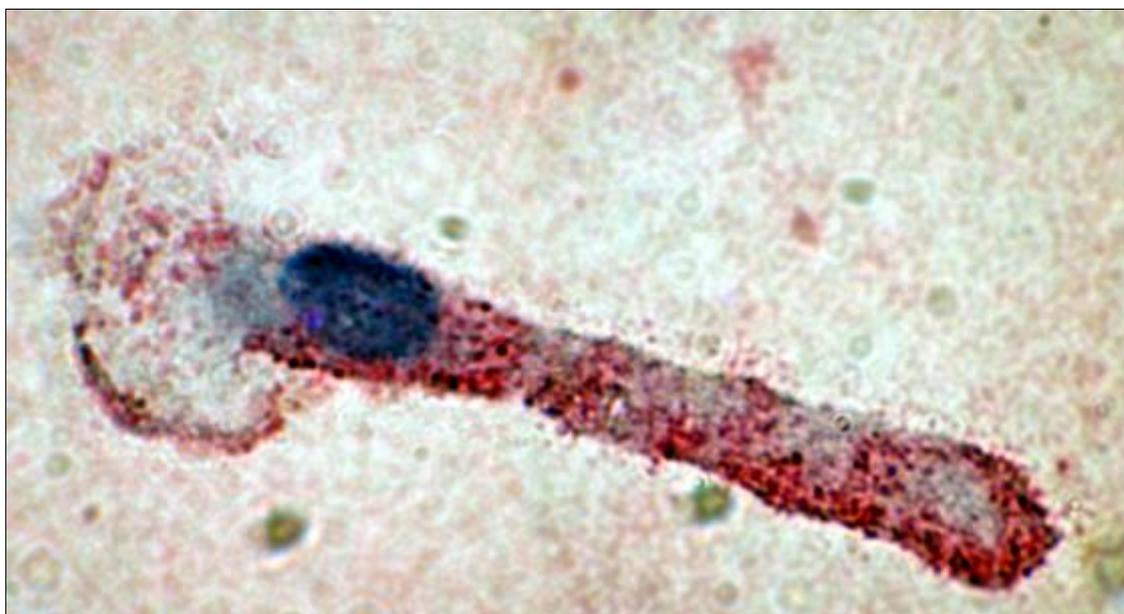


Figura III.10.

Célula fibroblástica de cerdo en medio líquido CD34 positiva

4.- RELACIÓN ENTRE LACTACIÓN Y LEISHMANIOSIS EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON UN MODELO CRICETO

En este ensayo se usaron 60 hembras de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) divididas en 3 grupos. En el grupo A las hembras en el primer día de lactación eran inoculadas por vía intraperitoneal con 25 millones de promastigotes de *Leishmania infantum*. El grupo B fue el control negativo compuesto por hembras no lactantes y no infectadas. El grupo C, control positivo, estaba formado por hámsters no lactantes infectadas con 25 millones de promastigotes de *Leishmania infantum* por vía intraperitoneal. Durante los 6 meses que duró el experimento se controló un grupo de parámetros que incluían el peso, la tasa de anticuerpos, la respuesta inmune celular y después de la necropsia, el día 180, se valoró la morfología de los órganos diana y se hicieron improntas, aislamiento y estudio anatomopatológico.

4.1.- Peso

El primer parámetro obtenido durante este ensayo fue el peso que se vio incrementado en un 24,4% y en un 16,5% en los grupos A y B respectivamente, sufriendo un descenso del 23,9% en el grupo C. La evolución del parámetro peso a lo largo de la prueba se detalla en el gráfico III. 2.

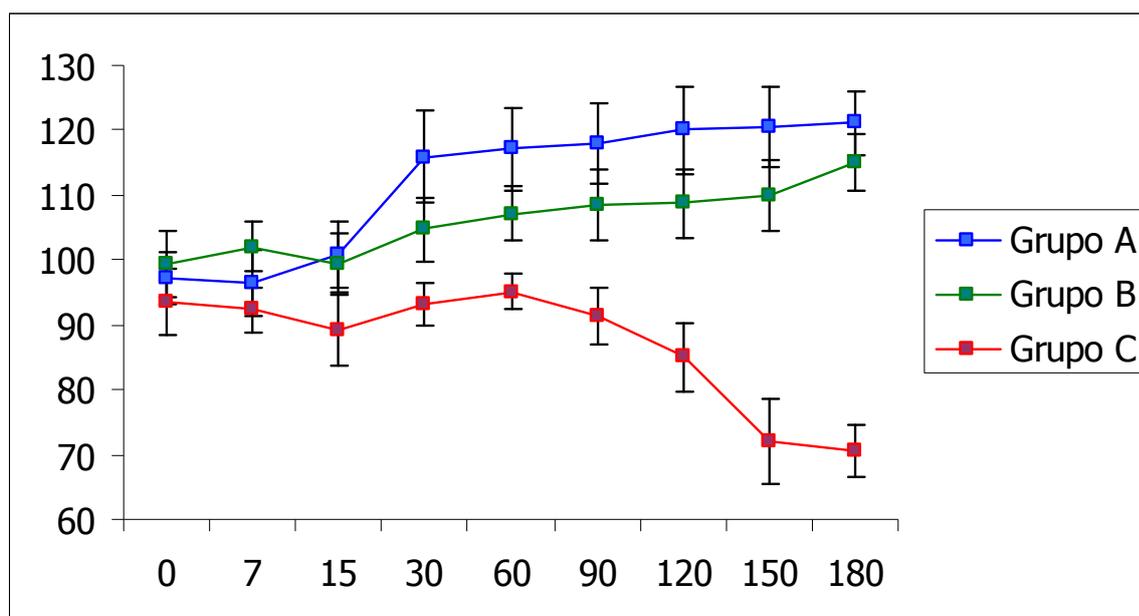


Gráfico III. 2.

Evolución del peso durante los 6 meses del ensayo (media \pm DE)

A continuación se hizo un ANOVA encontrando diferencias muy significativas entre los grupos ($p < 0,01$). Para analizar estas diferencias se utilizó el test de Scheffe, no encontrando diferencias entre los grupos hasta el día 15. Sin embargo a partir del día 30 había diferencias muy significativas ($p < 0,01$), entre el grupo de hembras lactantes infectadas y el de no lactantes infectadas, y entre el control negativo y el control positivo.

4.2.- Serología

El siguiente parámetro estudiado durante toda la prueba fue el nivel de anticuerpos anti-leishmania, mediante EasyDAT. El título de corte para considerar a un animal positivo se tomó en 1/20, la segunda dilución. Aunque el método general del test es similar en perros y en cricetos, las diluciones empleadas difieren, comenzando en estos últimos desde 1/10 y acabando en el último pocillo de la placa con 1/640.

En los dos primeros controles (días 0 y 7) ningún animal fue positivo, aunque 7 de los 20 animales del grupo de hembras lactantes infectadas y 16 de los 20 del grupo control positivo dieron una débil lectura 1/10. A partir del día 15 todos los hámsteres del grupo de infectados no lactantes fueron positivos (14 con un título 1/20 y 6 con un título 1/40). Ninguno de los animales del grupo A o B fue positivo. A partir de este control el título se fue elevando en los animales del grupo C, para mantenerse estable a partir del día 120 alrededor de 1/320-1/640. Los hámsteres de los grupos A y B se mantuvieron negativos durante todo el ensayo.

4.3.- Valoración de la respuesta inmune celular

Las dos pruebas utilizadas para la valoración de la respuesta inmune celular fueron la intradermorreacción con leishmanina y un ensayo de proliferación linfocítica.

Los resultados expresados en milímetros (media \pm DE) para la **intradermorreacción** están reflejados en la **Tabla III. 3**.

	0	90	180
Grupo A	4,6 \pm 2,5	8,1 \pm 3,5	7,8 \pm 2,9
Grupo B	4,4 \pm 1,8	3,3 \pm 1,6	2,3 \pm 0,9
Grupo C	4,3 \pm 2,0	4,5 \pm 2,2	4,5 \pm 2,4

Tabla III. 3.
Media (mm) \pm DE de grosor del habón formado 72 horas
después de la inoculación intradérmica

Con estos datos se realizó un ANOVA que encontró diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre los grupos. También se hizo un test de Scheffe que evidenció diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre el grupo de hembras lactantes infectadas y el grupo C control positivo en los días 90 y 180; además en el día 180 se encontraron estas diferencias entre el grupo B, control negativo, y el grupo C.

El ensayo de linfoproliferación in vitro se realizó los mismos días que la intradermorreacción. Los resultados se recogen en la **Tabla III. 4.** y están expresados en absorbancia, leída a 405nm (media \pm DE). La columna Prot p36 es la que refleja la proliferación específica frente a esta proteína de *Leishmania*; pero para conocer su valor real hay que restarle la cifra de la proliferación en ausencia de mitógeno (columna Sin Mitógeno). Los valores correspondientes a este resultado se encuentran reflejados en el **Gráfico III. 3.**

Valorando estadísticamente estos resultados mediante un ANOVA se encontraron diferencias muy significativas entre los grupos ($p < 0,01$). Empleando un test de Scheffe para concretarlas, se encontraron diferencias muy significativas entre el grupo A y el C en el día 90 y en el día 180 ($p < 0,01$) y entre el B, control negativo y el C, control positivo el día 180 ($p < 0,01$).

Día 0			
	Conc A	Sin mitógeno	Prot p36
Grupo A	1,54 \pm 0,32	1,11 \pm 0,41	1,23 \pm 0,82
Grupo B	1,89 \pm 0,64	1,48 \pm 0,51	1,32 \pm 0,91
Grupo C	1,74 \pm 0,79	1,13 \pm 0,65	1,28 \pm 0,79
Día 90			
Grupo A	1,43 \pm 0,53	1,03 \pm 0,64	2,74 \pm 0,73
Grupo B	1,44 \pm 0,38	1,21 \pm 0,77	1,40 \pm 0,84
Grupo C	1,58 \pm 0,67	1,19 \pm 0,83	1,33 \pm 0,43
Día 180			
Grupo A	1,36 \pm 0,70	1,20 \pm 0,66	2,54 \pm 0,71
Grupo B	1,51 \pm 0,63	1,36 \pm 0,61	1,48 \pm 0,75
Grupo C	1,54 \pm 0,58	1,10 \pm 0,65	1,12 \pm 0,49

Tabla III. 4.
Absorbancias (media \pm DS) obtenidas con
un mitógeno inespecífico (Concanavalina A), sin mitógeno (SM)
y para un proteína del parásito (Prot p36)

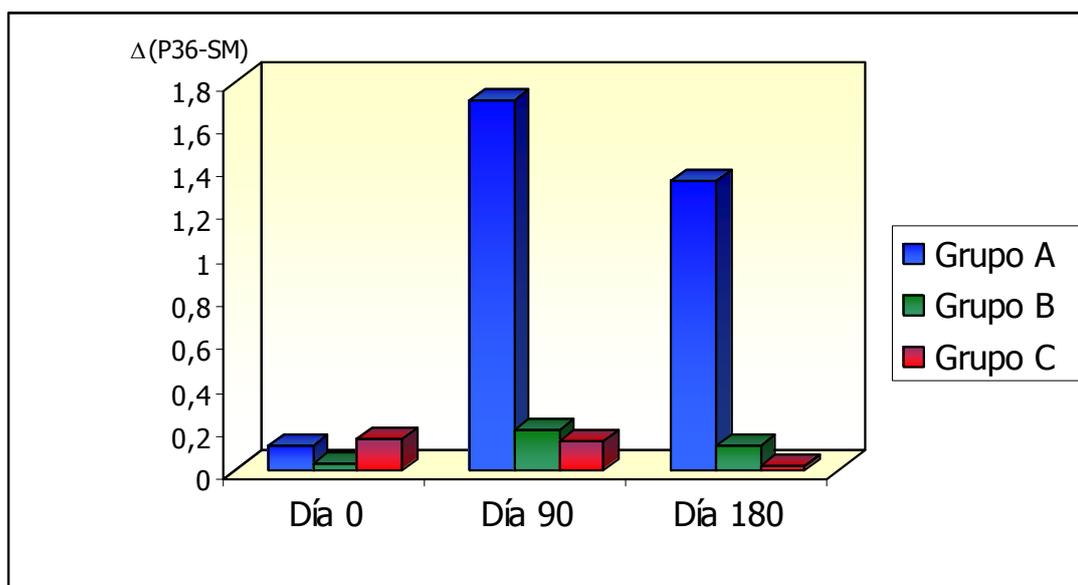


Gráfico III. 3.

Diferencia entre la Absorbancia obtenida con la p36 y sin mitógeno

4.4.- Necropsia

El día 180 se eutanasió a los animales realizándose la necropsia y a partir de las muestras recogidas se hicieron aislamientos en medio N-N-N, improntas y estudio anatomopatológico.

Antes de procesar los órganos para estas pruebas, se pesaron y midieron tanto el hígado como el bazo.

El peso del hígado (media \pm DE) está reflejado en el **Gráfico III. 4.**, el peso del bazo en el **Gráfico III. 5.**, y la longitud y anchura de este último en los **Gráficos III. 6. y III. 7.** respectivamente.

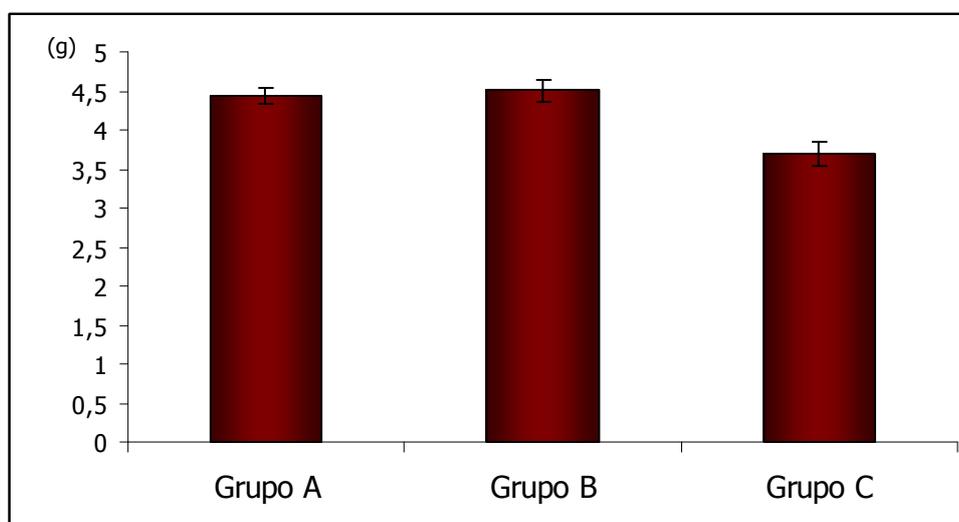


Gráfico III. 4.

Peso del hígado (media \pm DE) en los diferentes grupos

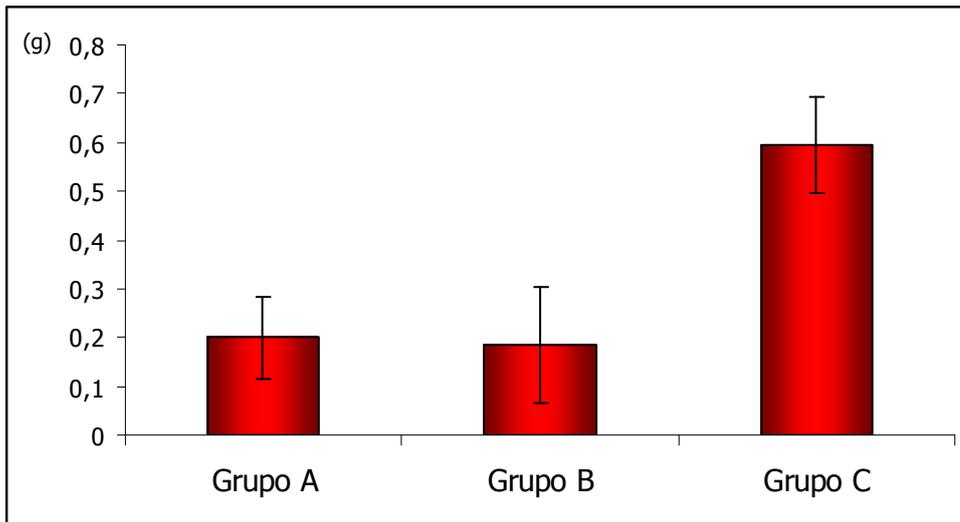


Gráfico III. 5.

Peso del bazo (media ± DE) en los diferentes grupos

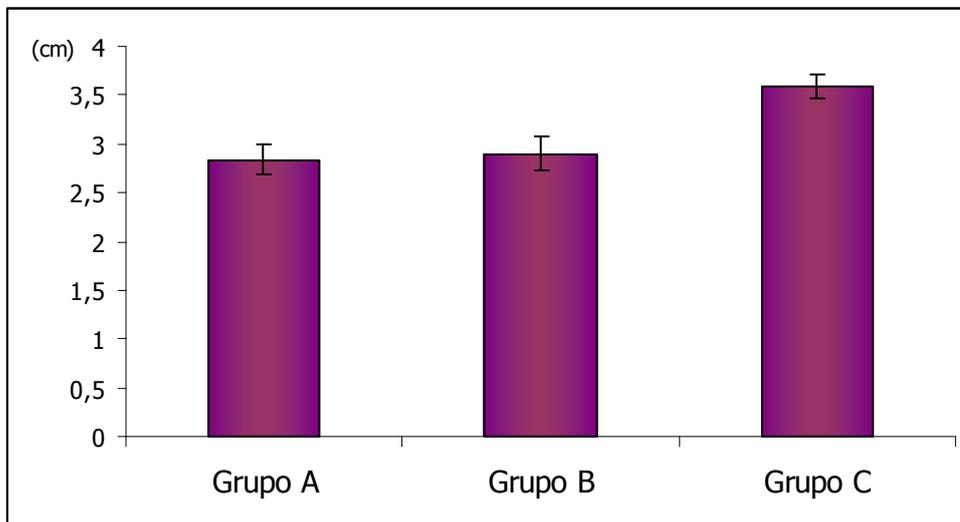


Gráfico III. 6.

Longitud del bazo (media ± DE) en los diferentes grupos

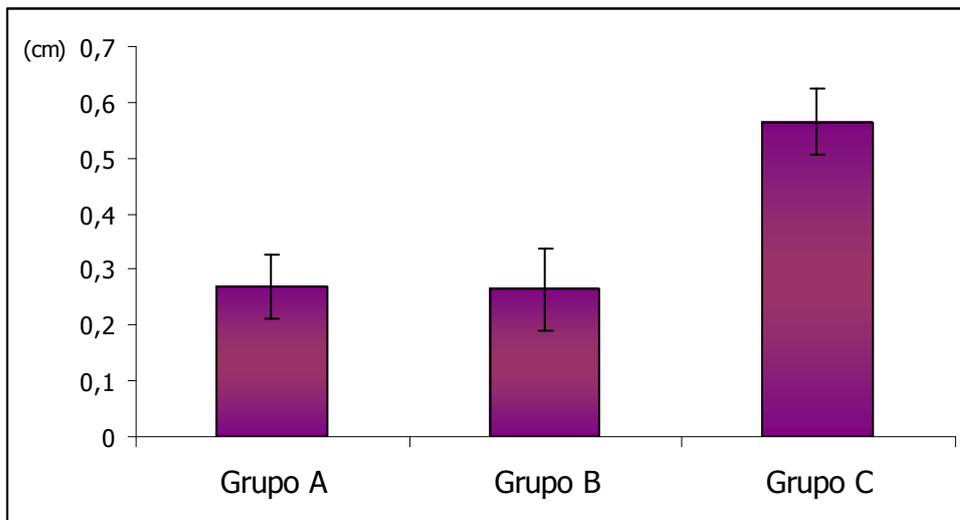


Gráfico III. 7.

Anchura del bazo (media ± DE) en los diferentes grupos

A partir de estos datos se hizo un ANOVA encontrándose diferencias muy significativas entre los grupos, y mediante un test de Scheffe se demostró para todas las variables una diferencia muy significativa entre el grupo de hembras lactantes infectadas y el grupo C de hembras no lactantes infectadas. Además se observaron las mismas diferencias entre el grupo B control negativo y el grupo C, no existiendo tales diferencias entre el grupo A y el B. En la **figura III.11.** se muestra la necropsia de un hámster del grupo C, control positivo.

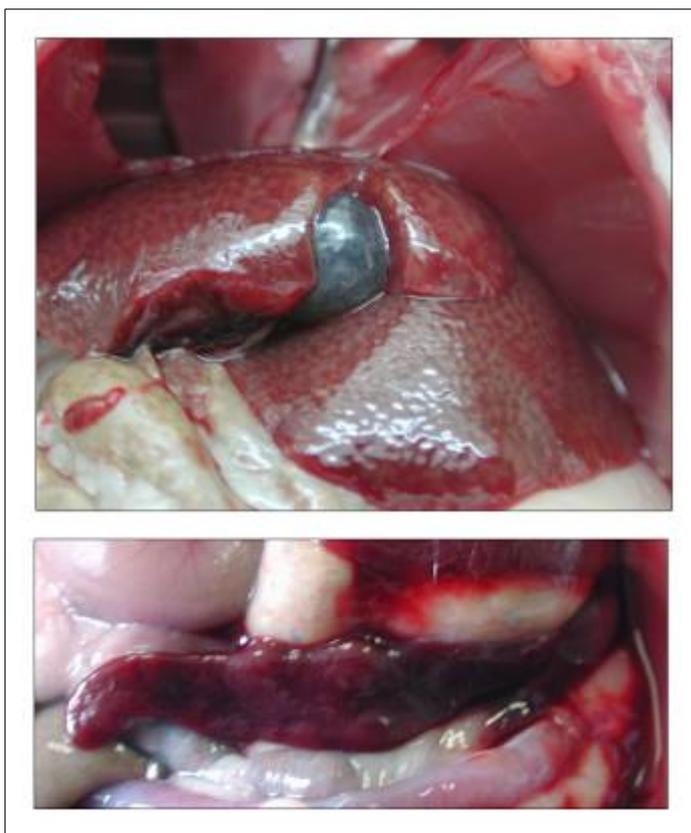


Figura III.11. En la parte superior hepatopatía con moderada infiltración grasa y en la parte inferior gran esplenomegalia con hiperplasia nodular

El aislamiento fue positivo en todos los animales del grupo C, al menos en un tejido. En 17 de los 20 animales se aisló en todos los tejidos, en los otros 3 se consiguió en hígado y bazo, y no en médula ósea. En ninguno de los animales de los grupos A y B se obtuvo un aislamiento positivo.

El estudio histológico del hígado y del bazo arrojó unos resultados similares. En el hígado de los hámsters del grupo C, infectados no lactantes, se encontró una hepatopatía

degenerativa en diferentes grados, con presencia de granulomas y abundantes amastigotes en el citoplasma de las células del sistema retículo endotelial.

En el bazo de los hámsters del grupo C se encontró una esplenomegalia reactiva, con hiperplasia nodular de la pulpa blanca de los cordones de Billroth, con gran cantidad de amastigotes en el interior de los macrófagos esplénicos, evidentes en la **figura III.12**.

Todos los estudios de los órganos de los hámsters de los grupos A y B fueron considerados normales, no encontrándose ninguna lesión compatible con el desarrollo de la enfermedad.

Dentro del capítulo de pruebas diagnósticas directas también se realizaron improntas de médula ósea, hígado y bazo, utilizadas para la visualización del parásito y para determinar la carga parasitaria en estos dos últimos órganos.

En todas las improntas de los hámsters del grupo C, infectados no lactantes, se visualizó el parásito libre o en el interior de los macrófagos. En las improntas del grupo A y B no se observó ninguna forma parasitaria. A continuación se determinó la carga parasitaria en hígado y bazo, con los siguientes resultados (media \pm DE) para el grupo C: carga parasitaria esplénica $1204 \times 10^6 \pm 392 \times 10^6$ amastigotes; carga parasitaria hepática $5832 \times 10^6 \pm 2315 \times 10^6$. La carga parasitaria en los animales de los grupos A y B fue nula.

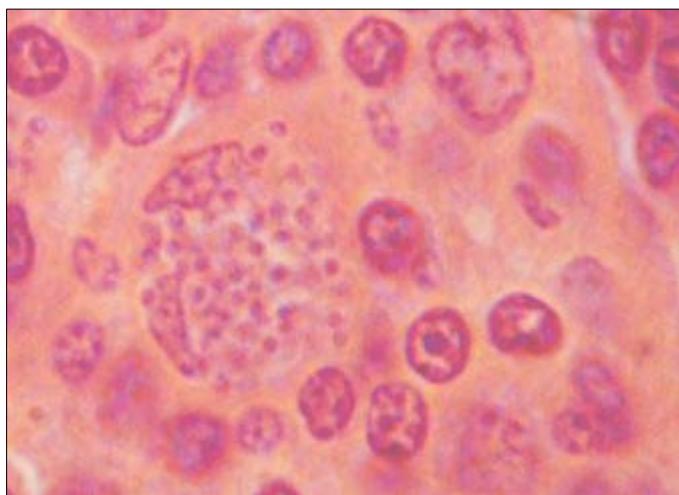


Figura III.12.

Histología esplénica: en el centro de la imagen se observan dos macrófagos con una gran cantidad de amastigotes en su interior

5.- RELACIÓN DE LA HIPERPROLACTINEMIA INDUCIDA POR DOMPERIDONA CON LA HEMATOPOYESIS Y LA FUNCIONALIDAD LEUCOCITARIA EN BEAGLES SANOS

El ensayo realizado con 20 perros Beagles, 10 machos y 10 hembras, tenía como principales objetivos demostrar la capacidad hiperprolactinemiante del fármaco, determinando la curva de liberación de prolactina en el primer día de administración de domperidona y estudiando parámetros relacionados con la hematopoyesis y la funcionalidad leucocitaria durante un mes de administración de 1mg/kg cada 12 horas de domperidona. Los parámetros elegidos para evaluar la hematopoyesis fueron el número y tipo de colonias cultivadas a partir de progenitores de sangre periférica en diferentes medios semisólidos y el crecimiento total, grado de confluencia y la relación macrófagos/fibroblastos en medio líquido. Además para valorar el estado de la permeabilidad y la actividad fagocitaria de los leucocitos se utilizó la prueba de la reducción de nitroazul de tetrazolio.

5.1.- Niveles séricos de prolactina

Se determinaron los niveles séricos de la hormona tras la administración oral de 1mg/kg de domperidona en comprimidos. La media de los niveles obtenidos en los diferentes muestreos está reflejada en el **Gráfico III. 8**.

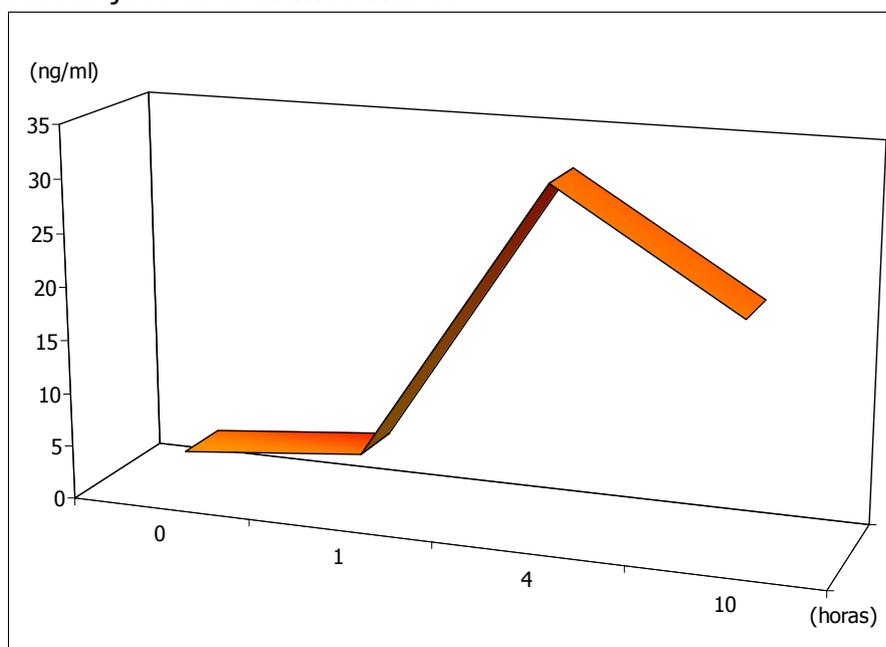


Gráfico III. 8.

Niveles séricos medios de prolactina (ng/ml) en los 20 beagles.

Se midieron a las 0, 1, 4 y 10 horas tras la administración de 1 mg/kg de domperidona

El análisis de estos resultados se centró en primer lugar en buscar diferencias mediante un test T de Student entre las elevaciones producidas en machos y en hembras. Como no hubo diferencias ($p > 0,05$) en ninguno de los muestreos se trataron los datos en bloque sin hacer distinciones de género. El incremento en los niveles de la hormona observados en el gráfico respecto al inicio son muy significativos ($p < 0,01$, T de Student) en cualquiera de los muestreos. También lo es la elevación entre la primera y la cuarta hora y entre la primera y la décima hora. Lo mismo sucede, ($p < 0,01$, T de Student) con el descenso observado a partir de la décima hora respecto al muestro anterior (4 horas).

5.2.- Cultivos de progenitores hematopoyéticos en medio semisólido y líquido

Después de estandarizar el cultivo de progenitores hematopoyéticos (descrito en el apartado 3 de Resultados) se intentó evaluar la influencia de la hiperprolactinemia producida por la domperidona sobre estos. Siguiendo la división empleada en el apartado 3 se desglosan los resultados en función del medio (sólido o líquido) empleado y dentro de cada uno se abordan los diferentes parámetros estudiados.

Medio semisólido

En este medio con base de metil celulosa se estudio el número y tipo de colonias GM y E observadas usando el medio MethoCult™ GF⁺ H4435, que contiene eritropoyetina recombinante humana y factor estimulante de colonias granulo macrofágicas recombinante humano, en los días 0, 5, 15 y 30 durante el mes de administración de la domperidona.

El número de **CFU-E** encontradas en estos 4 muestreos no estaba influido por el factor sexo. Esto se comprobó utilizando un test T de Student en el que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los días 0, 5, 15 y 30. El número de colonias (media \pm DE) se muestra en el **Gráfico III. 9.** en el que se observa un claro incremento a partir del día 5. Aplicando la misma herramienta estadística (T de Student) se encontraron diferencias muy significativas ($p < 0,01$), entre el número de colonias encontradas el día 0 y los demás días. No se encontraron diferencias en el número de colonias eritroides entre el resto de los días.

El número de **CFU-GM** observadas si que se vio influenciada por el factor género. Mediante el test de la T de Student se observaron diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre machos y hembras en los 4 muestreos realizados. A partir de este punto los datos

obtenidos para las colonias GM se trataron en dos grupos diferentes, como puede verse en el **Gráfico III. 10**.

El incremento en el número de colonias que se observa en el gráfico, tanto en machos como en hembras, comparando el muestreo en el día 0 con los otros tres, resultó ser muy significativo ($p < 0,01$). Sin embargo la comparación, tanto en machos como en hembras, del número de colonias GM del resto de los días (5, 15, 30) entre sí arrojó diferencias no significativas ($p > 0,05$)

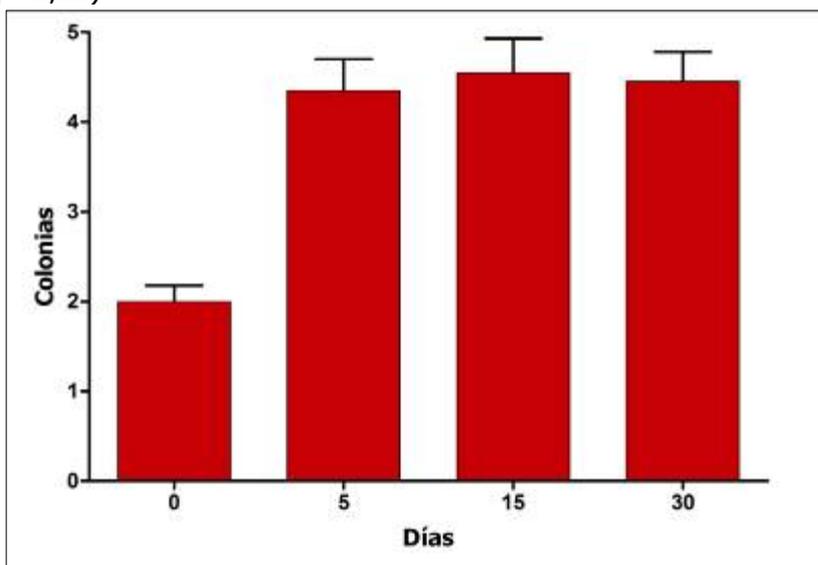


Gráfico III. 9.

Número de colonias eritroides (media ± DE) a partir de progenitores hematopoyéticos obtenidos de sangre periférica

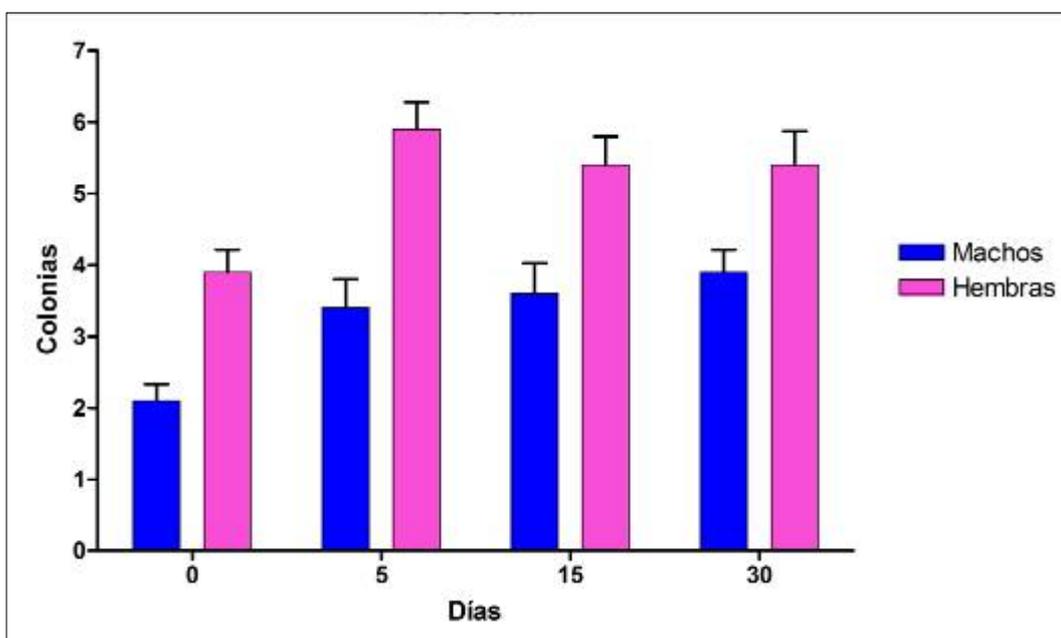


Gráfico III. 10.

Número de colonias granulo macrófágicas (media ± DE) a partir de progenitores hematopoyéticos obtenidos de sangre periférica

Medio líquido

Usando el medio de cultivo líquido (McCoy's 5a) se obtuvieron las mismas poblaciones celulares descritas en el apartado 3 de los Resultados, compuestas por una subpoblación macrofágica y otra conformada por células de aspecto fibroblástico. Los parámetros valorados fueron los mismos, crecimiento total, grado de confluencia y relación macrófagos/fibroblastos.

El **crecimiento total** obtenido en los diferentes muestreos está representado en el **Gráfico III. 11.** dividido en machos y hembras, ya que se encontró una diferencia muy significativa ($p < 0,01$) usando el test de la T de Student, en todos los días de la toma de muestras.

El incremento del crecimiento total observado en cada uno de los sexos es a su vez muy significativo cuando se comparan los datos del día 0 con los de los demás muestreos ($p < 0,01$ usando la T de Student), no encontrando diferencias a partir del quinto día hasta el final del mes.

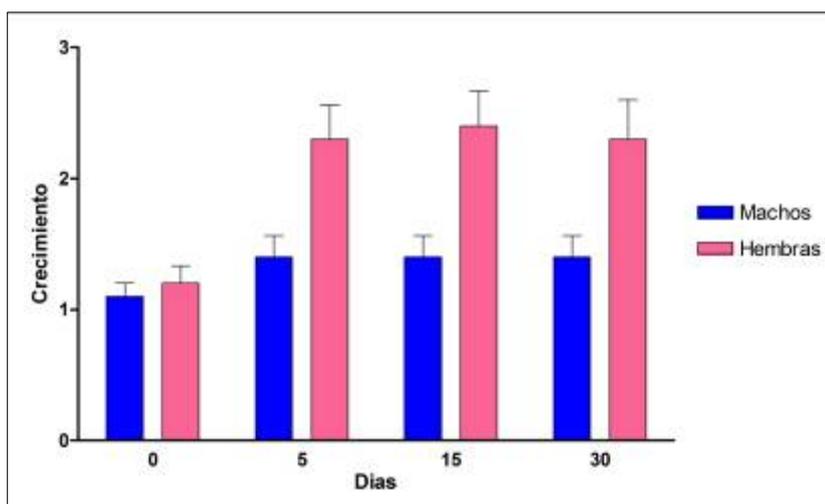


Gráfico III. 11.

Crecimiento total (media \pm DE) en machos y hembras de raza Beagle en medio líquido

El **grado de confluencia** fue muy variable a lo largo del ensayo. Por tratarse de un parámetro semicuantitativo muy influenciado por la subjetividad del observador únicamente se puede afirmar que hubo un aumento desde el 1,5% en el día 0 al 48%, 49,5% y al 48,5% de los días 5, 15 y 30 respectivamente.

La **relación macrófagos/fibroblastos** se expresó en fracciones enteras 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, aunque para su representación gráfica se utilizó el resultado de ésta. Así en cultivo con relación 2 predominan los macrófagos, y en otro con un valor inferior a 1 predominarían las

células fibroblásticas. En el **Gráfico III. 12.** (media \pm DE), se puede observar un viraje muy significativo (T de Student) desde una relación 2 a 1, hasta una relación próxima al 1. Estas diferencias son muy significativas ($p < 0,01$) comparando el día 0 con el 15 y el 30 y comparando el día 5 con el 15 y el 30. Sin embargo en los cinco primeros días no hubo diferencias.

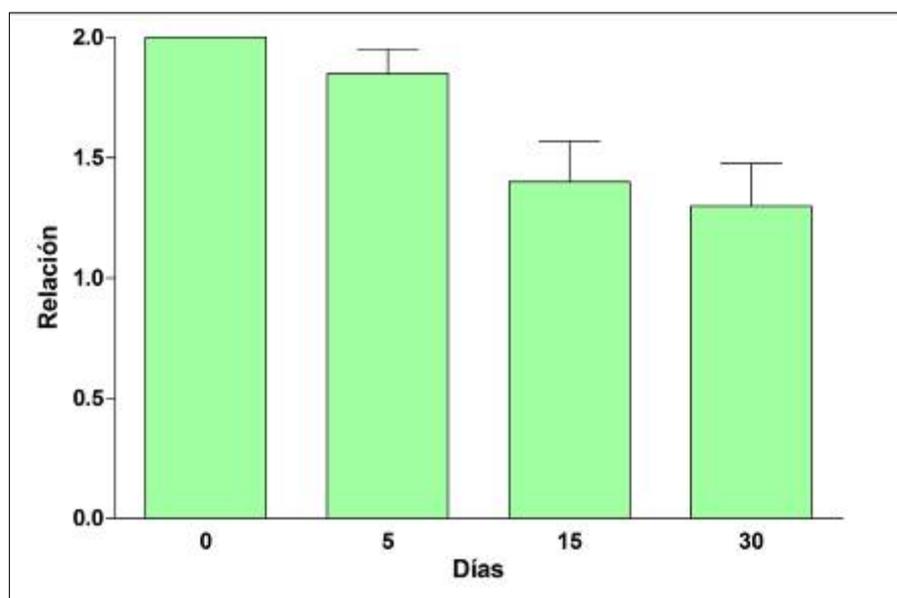


Gráfico III. 12.

Relación macrófagos/fibroblastos en cultivo de medio líquido (media \pm DE)

5.3.- Test de la reducción del nitroazul de tetrazolio

Esta prueba valora tanto la funcionalidad oxidativa leucocitaria como la permeabilidad o susceptibilidad fagocítica.

Las células positivas reducen en el interior de la vacuola fagocítica el NBT soluble (amarillo) a formazán (azul oscuro grisáceo), lo que se aprecia en las **figuras III.13.** y **III.14.**

En el **Gráfico III. 14.** se muestra (media \pm DE) el tanto por ciento de células positivas en sangre periférica en los días de muestreo.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (T de Student) entre machos y hembras en ninguno de los días.

Para valorar el incremento en la reducción observada en el gráfico se utilizó la T de Student con los siguientes resultados: Había diferencias muy significativas ($p < 0,01$) entre los datos obtenidos en el día 0 y cualquiera de los otros muestreos, y sin embargo no hubo diferencias al comparar los datos de los demás días (5, 15 y 30) entre si.

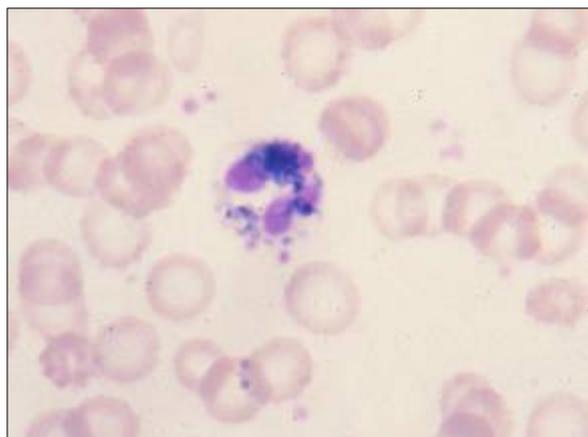


Figura III.13.

Extensión de sangre periférica:
Neutrófilo positivo al test de reducción del NBT

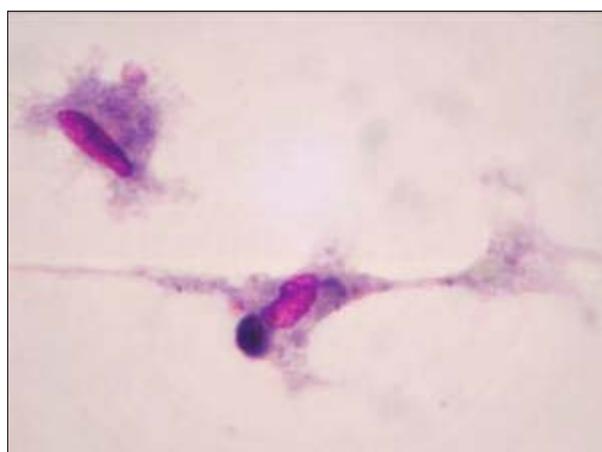


Figura III.14.

Célula fibroblástica de cultivo en medio líquido
positiva al test de reducción del NBT

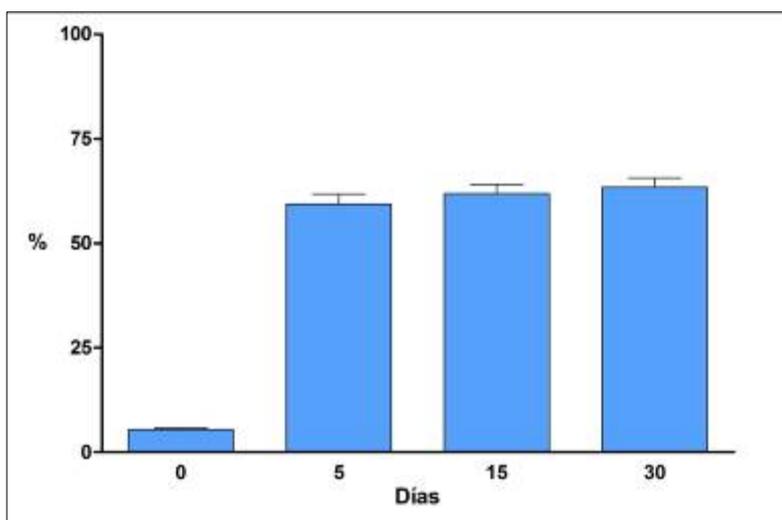


Gráfico III. 13.

Tanto por ciento (media \pm DE) de leucocitos positivos al NBT
en sangre periférica en perros de raza Beagle

6.- ESTUDIO DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE LA DOMPERIDONA EN PERROS ENFERMOS DE LEISHMANIOSIS

La prueba clínica consistió en el tratamiento de 98 perros leishmaniósicos con 1mg/kg de domperidona cada 12 horas y durante 1 mes. Los resultados obtenidos en esta prueba se han dividido en los dos grupos (A y B) que se hicieron para clasificar a los perros enfermos. En el primer grupo (A) se encuadraron perros con título bajo de anticuerpos, oligosintomáticos y sin alteraciones en la analítica sanguínea. En el grupo B se encuadraron a los animales polisintomáticos, con alteraciones en la analítica y con un título alto de anticuerpos. Por tratarse de etapas muy diferentes de la enfermedad con consecuencias clínicas tan distintas, no se han comparado en ningún momento los grupos entre sí. Además debido a la idiosincrasia del ensayo (prueba clínica) hay una gran cantidad de datos recogidos (ciertas determinaciones bioquímicas, algunos parámetros hematológicos ...) que no se han utilizado en el análisis estadístico por carecer de relación con la enfermedad. Todos estos parámetros se controlaron para obtener una valoración global del animal y para mantener intacta la confianza del propietario; por lo tanto únicamente se exponen en este apartado los resultados más relevantes que condicionan la evolución de la enfermedad.

6.1.- Grupo A

Sintomatología y Analítica hematológica y bioquímica

Los únicos síntomas que manifestaban los perros de este grupo eran linfadenopatías en diferentes grados (100%), dermatitis exfoliativa (17,14%), alopecias perioculares (12,86%), alopecias auriculares (10%) y onicogrifosis o excesivo crecimiento ungueal (2,86%). Durante los controles ninguno de los perros de este grupo manifestó ningún otro síntoma

A partir del día 90 todos los síntomas dérmicos habían desaparecido, quedando únicamente un 25,71% de perros con linfadenopatías moderadas o leves, y el 2,86% con onicogrifosis. En el último control sólo quedaban el 2,86% con onicogrifosis, no encontrando ningún animal con linfadenopatías.

Todos los parámetros hematológicos, bioquímicos y el proteinograma fueron totalmente estables durante todo el año, no encontrando en ninguno de los controles variación patológica alguna achacable a la posible evolución de la enfermedad.

Serología

No hubo en ninguno de los perros incremento del título de anticuerpos; por el contrario, se observó un descenso de la tasa de anticuerpos en el 74.3%, negativizándose un 40% (1/400 o menor). La tendencia en el último control (día 360) respecto al día 0 se observa en el **Gráfico III. 14**.

Valoración de la respuesta inmune celular

La valoración inmunológica arrojó resultados similares en el grupo A, observándose un incremento del grosor del habón en la intradermorreacción muy significativo (T de Student, $p < 0,01$) entre el día 0 y el 90, no encontrando diferencias entre el día 90 y el 360. Los resultados en mm de la intradermorreacción con leishmanina (media \pm DE) están reflejados en la **Tabla III. 5**.

En el test in vitro de estimulación linfocítica también se observó un incremento muy significativo (T de Student, $p < 0,01$) en la linfoproliferación específica (Prot 36) en los días 30, 180 y 360 respecto al día 0. La respuesta se mantuvo estable, no observándose diferencias entre los días 30, 180 y 360. Los resultados (media \pm DE) medidos en absorbancia están reflejados en la **Tabla III. 6**. y la linfoproliferación específica real (resta de Prot36 menos Sin Mitógeno) se observa en el **Gráfico III. 15**.

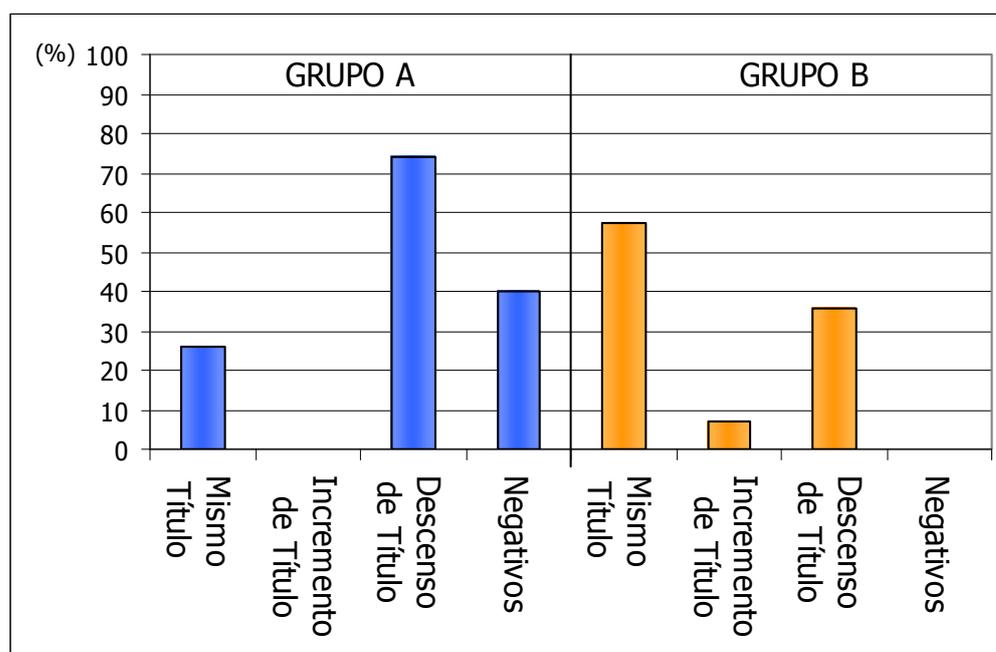


Gráfico III. 14.

Diferencia entre el título inicial y el final de anticuerpos medidos con EasyDAT, en los grupos A y B

	0	90	360
Grupo A	5,6 ± 2,7	9,1 ± 3,5	8,4 ± 2,9
Grupo B	3,8 ± 2,3	4,6 ± 2	5,3 ± 2,3

Tabla III. 5.

Mediciones del habón en mm (media ± DE) 72 horas después de la intradermorreacción. A partir de 5 mm se consideró positivo

Día 0			
	Conc A	Sin mitógeno	Prot p36
Grupo A	1,48 ± 0,28	1,05 ± 0,11	2,01 ± 0,22
Grupo B	1,32 ± 0,37	0,98 ± 0,17	1,49 ± 0,39
Día 30			
Grupo A	1,50 ± 0,15	1,22 ± 0,09	2,82 ± 0,31
Grupo B	1,28 ± 0,43	1,03 ± 0,12	1,78 ± 0,48
Día 180			
Grupo A	1,32 ± 0,22	1,26 ± 0,15	2,59 ± 0,29
Grupo B	1,17 ± 0,38	1,09 ± 0,21	1,83 ± 0,37
Día 360			
Grupo A	1,21 ± 0,17	1,15 ± 0,21	2,67 ± 0,16
Grupo B	1,23 ± 0,51	0,92 ± 0,19	1,72 ± 0,42

Tabla III. 6.

Absorbancia (media ± DE) leída a 405nm en la prueba de estimulación linfocítica en los días 0, 30, 180 y 360

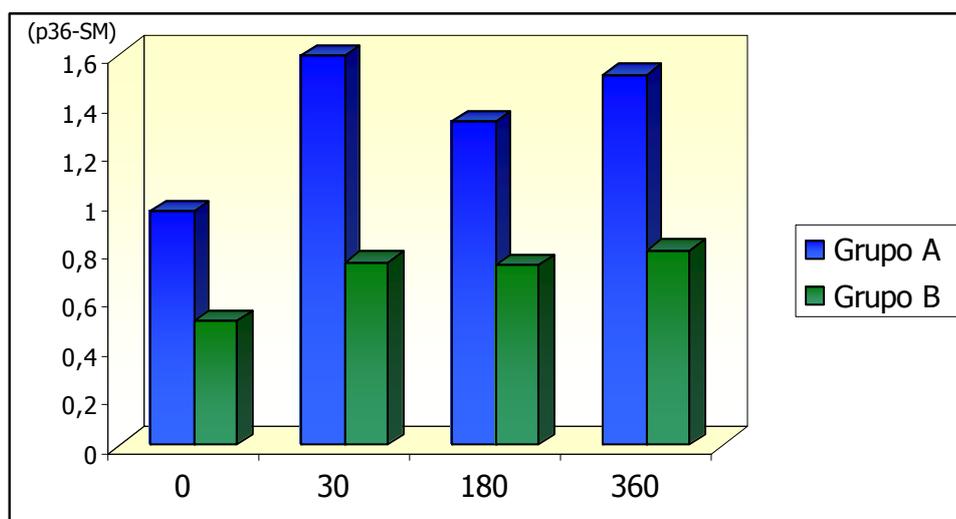


Gráfico III. 15.

Diferencia entre la Absorbancia obtenida con la p36 y sin mitógeno

6.2.- Grupo B

Sintomatología y Analítica hematológica y bioquímica

En el grupo B dos animales con insuficiencia renal crónica fueron eutanasiados en el día 30 y en el día 180, a petición de los propietarios. En la necropsia (**Figura III.15.**) se tomaron muestras de bazo, linfonodos e hígado para aislamiento en tubos de medio N-N-N, obteniendo resultados negativos.

Los síntomas desaparecieron en 24 de los 28 perros del grupo B (85.71%), encontrando asociada una mejoría analítica (normalización de los niveles de transaminasas hepáticas, aumento de la hemoglobina ...).

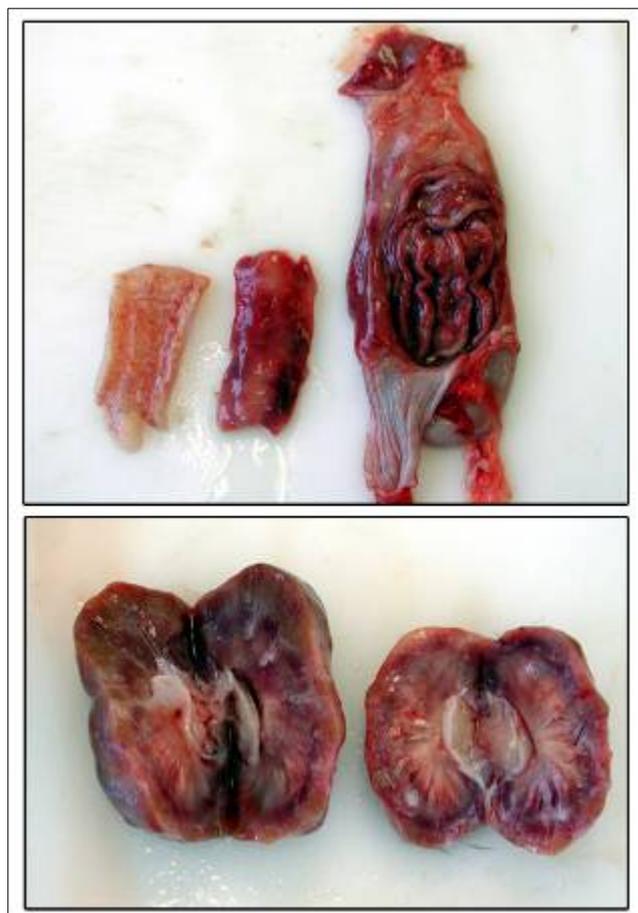


Figura III.15.

En la parte superior gastroenteritis hemorrágica producida por la uremia en el curso de la insuficiencia renal crónica.

En la parte inferior riñones fruncidos característicos de la avanzada insuficiencia renal.

Serología

En el grupo B se observó un incremento en el título de anticuerpos en tan sólo 2 perros (7,14%), ambos con insuficiencia renal crónica avanzada. El 32% mantuvo su titulación estable, disminuyendo en un 60% **Gráfico III. 14**. En todos los perros en los que se dio una disminución del título de anticuerpos se observó una mejoría asociada en el proteinograma (**Figura III.16.**).

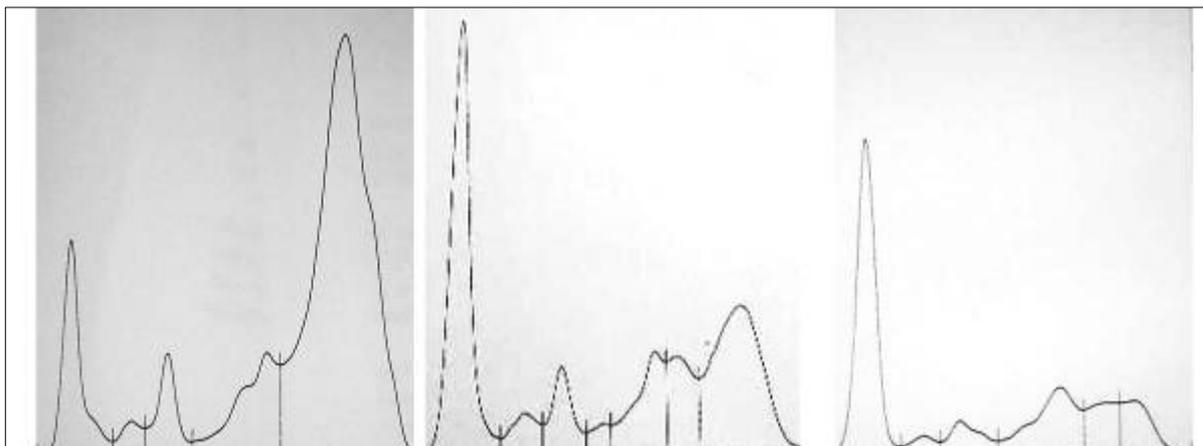


Figura III.16.

Evolución del proteinograma en uno de los perros del grupo B.

En la parte izquierda proteinograma inicial, se observa una elevación muy marcada en las fracciones beta y gamma. En el centro proteinograma correspondiente al día 90 y a la derecha al día 360 en el que el descenso de la beta-gammapatía es evidente.

Valoración de la respuesta inmune celular

La valoración de la respuesta celular al igual que en el grupo A se estudió en función de la intradermorreacción **Tabla III. 5.** y de la linfoproliferación **Tabla III. 6.** y **Gráfico III. 15.**

Estadísticamente (T de Student) se encontraron diferencias significativas en la intradermorreacción entre el día 0 y el 360, pero no entre el 0 y el 90 ni entre el 90 y el 360.

En el test in vitro de la linfoproliferación se encontraron diferencias muy significativas (T de Student, $p < 0,01$) entre cualquiera de los días y el día 0, no hallando diferencias al comparar los otros muestreos (30, 180 y 360) entre sí.

7.- AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA PROLACTINA CANINA

Una vez que las muestras fueron retro-transcriptas se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa-PCR (SuperScript™ III RT-PCR System, Invitrogene). Se diseñaron primers o cebadores degenerados, y posteriormente cebadores con bases de inosina.

Usando los cebadores degenerados, se realizó una PCR de 30 a 35 ciclos, según los primers utilizados, a partir del cDNA procedente de la hipófisis. Las condiciones del estudio incluyeron una etapa de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, una etapa de hibridación de 1 minuto y 30 segundos (la temperatura de hibridación fue variable en función del primer utilizado en cada caso particular), y 3 minutos de extensión a 72°C. Pevio a la reacción en cadena de la polimerasa las muestras de cDNA se desnaturalizaron a 94°C durante 1 minuto, y como etapa final se realizó una elongación a 72°C durante 10 minutos. El proceso se llevó a cabo adicionando 1 U de la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogene) y 2-3 µl del cDNA, procedente de la retrotranscripción, a cada tubo de reacción.

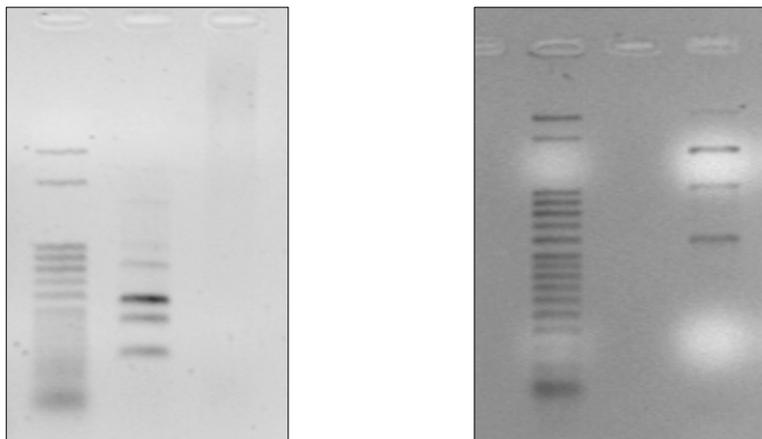


Figura III.17.

Dos amplificaciones usando los primers degenerados Forward y Reverse.

Se observan 4 bandas mayoritarias de unos 350, 450, 500 y 700 pares de bases

Los primers con bases de inosina, en lugar de las degeneraciones, se utilizaron siguiendo el siguiente programa en el termociclador: Una etapa de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, una etapa de hibridación de 1 minuto y 30 segundos a 40 °C, y 3 minutos de extensión a 72°C. Estas fases se repitieron durante 35 ciclos en dos vueltas. Además como paso previo a la reacción en cadena de la polimerasa las muestras de cDNA se desnaturalizaron a 94°C durante 1 minuto, y como etapa final se realizó una elongación a

72°C durante 10 minutos. El proceso se llevó a cabo adicionando 1 U de la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogene) y 2-3 μ l del cDNA, procedente de la retrotranscripción, a cada tubo de reacción.

Hay que recalcar que se diseñaron 4 primers con bases de inosina, PRL 1 y PRL 2 basados en los extremos 3' y 5' de prolactinas de otras especies y PRL 3 y PRL 4 de acuerdo a homologías centrales de las proteínas. En la **Figura III.18.** se observa el resultado de las primeras PCRs con los primers PRL 1 y PRL 2. En la **Figura III.19.** se utilizaron los 4 primers a la vez, obteniendo una única banda. La desaparición de amplificaciones inespecíficas cuando se utilizaron los 4 primers al mismo tiempo confirma que sólo puede tratarse de la prolactina canina. Además esta banda tiene un peso molecular similar, \approx 700 pares de bases, a las prolactinas de otras especies.

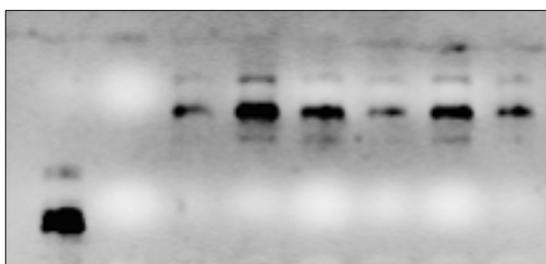


Figura III.18.

Producto de amplificación usando los cebadores PRL 1 y PRL 2.

Las bandas son más nítidas que las obtenidas con los primers degenerados

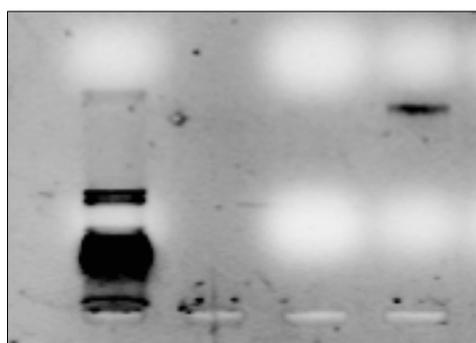


Figura III.19.

Producto de amplificación usando los 4 cebadores con bases de inosina.

Se observa una única banda de unos 700 pares de bases

7.1. Aislamiento de DNA de un gel de agarosa

Tras correr la muestra de DNA, producto de una PCR, en un gel de agarosa, y visualizar bajo una lámpara de UV (no excediendo el tiempo de exposición para evitar que la muestra se entrecruce con el gel y baje el rendimiento), se cortó la zona de interés situándola en un tubo de microcentrífuga. Se añadió 100 μ l de la solución, GENE CLEAN Turbo Salt Solution, solución salina de guanidinio que a una molaridad y pH adecuado permite la unión del DNA a la membrana GLASSMILK encajada en el GENE CLEAN Turbo Cartridges, por cada 0.1 μ g de gel. El tubo fue calentado en un baño de arena a 55 °C durante 5 minutos, o hasta que el gel estuvo completamente fundido, invirtiendo la mezcla hasta que ésta formó una solución homogénea, Tras lo cual, se transfirió la solución (volúmenes inferiores a 600 μ l) a un "cartucho" insertado a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, Turbo Catch Tube, centrifugando a 16000 xg durante 5 segundos. Si el volumen fue superior a 600 μ l se repitió el proceso hasta que todo el líquido atravesó el filtro, vaciando el tubo siempre que fue necesario. Cuando el producto atravesó por completo el filtro, se añadieron 500 μ l de la solución de lavado, GENE CLEAN Turbo Wash o solución salina con etanol, sobre el filtro, centrifugando a 16000 xg durante 5 segundos, hasta apurar el lavado y vaciar el tubo. Se repitió la etapa anterior de lavado, vaciando el tubo y centrifugando el tubo vacío a 14000 xg durante 4 minutos hasta eliminar todo rastro de alcohol. Para eluir el DNA del filtro, se añadieron 30 μ l de la solución de elución (GENE CLEAN Turbo Elution compuesta por agua libre de RNase, DNase, y pirogenos), que permite eluir el DNA fijado en el filtro, directamente sobre la membrana manteniéndola a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras lo cual se centrifugó a 16000 xg durante 1 minuto, hasta transferir el DNA al tubo, desechando el cartucho superior con el filtro o membrana.

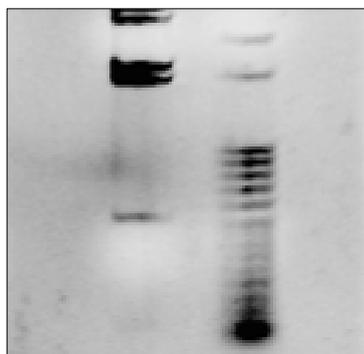


Figura III.20.

**Muestra enviada para secuenciación
obtenida con los primers Forward y Reverse**

7.2. Secuenciación del DNA

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR fue realizada por la Unidad de Genómica, Servicio Interdepartamental de Investigación (Universidad Autónoma de Madrid). Se utilizaron de 30-50 ng de DNA (concentración 10-50 ng/μl) y 3-5 pmol de primer (3-5 μM) por proceso de secuenciación, indicando la temperatura de meeting exacta (T_m) para cada uno de los oligos utilizados. Las muestras de DNA estaban en todos los casos purificadas, es decir, libres de restos de oligonucleótidos, sales, RNA, DNA genómico, etc.

El producto enviado después de las amplificaciones obtenidas con los primers degenerados dio como resultado una secuencia inespecífica que tan sólo compartía homología con el resto de prolactinas en unas decenas de pares de bases centrales.

Secuencia obtenida a partir de primers degenerados

```
atgnangnggggggggnnnngggngncggcggtcgggnaggagntcgagntcgggggggtgtgngngcngggcgcgcn
ngngcgggnngtgggggggggctngtgangtnggggtgaggggggagngggcggnnagngggacgggtggnnat
nangagngngctgggtggtnacagctgccacactctccggggggcgggcggggtgtcagggggggangtgatgnnccg
gggtngggcnnggntagtcgcganggacgccgggncggcagntngcgggtcgggtgntgnttccgcgcgtnntccgg
ggagnggggganggagggcggtgcnngctngggcggggggagngcgggngcngctnccggggngnnggggn
ggtgccagggcgggggcgganctngagagaaaacaagcngngggggcgtgngngcncnnggggggnntganggg
tgaggggatnagnggggggggngggggcgtnntngngngntngngggngggggngngngntnctngg
ggnggggaagcnataanctngcgnntnacgtgtnttccnggcnnnnaaanatggactgctgttccttatggcccaaa
ttgaggatgntnggggnagcnggnngtgaagagatgcntctangcnnntgncnaanaggagctaa
```

El proceso de aislamiento y de secuenciación se repitió varias veces obteniendo resultados similares. Para intentar solventar el problema se cambió de kit de extracción, sin obtener variación en el resultado. El centro de secuenciación de la Unidad de Genómica, Servicio Interdepartamental de Investigación (Universidad Autónoma de Madrid), necesitaba una concentración superior a la obtenida, achacando a esta baja cantidad de producto la incorrecta secuenciación.

Para circunvalar este contratiempo se recurrió a los primers con bases de inosina, obteniendo como se observa en las **Figuras III.18.** y **III.19.** bandas más definidas y con mayor concentración. Además las amplificaciones con los cuatro primers produjeron bandas más intensas que las obtenidas usando únicamente los cebadores PRL1 y PRL 2.

La secuencia final, en estado de registro, guarda una gran homología con el resto de prolactinas y en especial con la ovina.



Discusión

1.- Validación de la técnica de elaboración del antígeno EasyDAT

El EasyDAT es una técnica serológica, capaz de detectar anticuerpos frente a protozoos del género *Leishmania*, fundamentada en el test de aglutinación directo (DAT). El DAT tradicional es muy sensible y específico, pero tiene algunos inconvenientes que dificultan su realización rutinaria. El largo y laborioso proceso de elaboración del antígeno (dos días) y la utilización de material costoso (centrífuga refrigerada) impiden su implantación generalizada, viéndose desplazado por otras técnicas con un coste mucho mayor como la inmunofluorescencia indirecta, pero sin estas dificultades.

El EasyDAT consigue superar estos impedimentos a la vez que conserva las mismas características del DAT tradicional (misma sensibilidad, especificidad e idéntico tiempo de conservación del antígeno). Entre las ventajas más significativas están el ahorro de tripsina, formol y soluciones tampón, la utilización de una centrífuga convencional en vez de una centrífuga refrigerada, y sobre todo la reducción del proceso de elaboración del antígeno a sólo 5 horas, en lugar de los 2 días que requiere el DAT tradicional. Estas características hacen del EasyDAT la técnica de elección para el diagnóstico serológico de la leishmaniosis en cualquier circunstancia.

Este ensayo se diseñó para comparar los dos antígenos usando los mismos sueros, y por esa razón se emplearon perros positivos confirmados con métodos diagnósticos directos o parasitológicos. Esta prueba, como la mayoría de las pruebas serológicas, tiene el principal inconveniente en su incapacidad para discernir entre animales tratados que mantienen el título de anticuerpos, animales enfermos y animales con enfermedad subclínica. Además, aunque en el estudio la sensibilidad es del 100%, existen reacciones cruzadas con otras enfermedades como las tripanosomiasis que dificultan la interpretación.

Con la modificación realizada en el proceso de elaboración, el EasyDAT podría sustituir a la inmunofluorescencia indirecta como test serológico de referencia, ya que la complejidad en la interpretación y el mayor número de falsos positivos de la IFI, la convierten en una prueba mucho más subjetiva y desde luego menos útil para el veterinario clínico.

Después de la publicación en el mes de septiembre de 2003 del nuevo proceso de elaboración en la revista *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* de la Sociedad Americana de Microbiología diversos grupos de investigación y laboratorios de diagnóstico nacionales, brasileños, portugueses, indios, pakistaníes e ingleses han solicitado información de la puesta a punto de la técnica para su uso en el diagnóstico de las leishmaniosis animales y humanas.

2.- Estandarización del cultivo de progenitores hematopoyéticos en diferentes especies animales

El estudio de las células pluripotentes (PSC) supone una aportación significativa al conocimiento de la proliferación y diferenciación celular, y además proporciona modelos in vitro para la valoración de nuevos fármacos y para el diseño terapéutico frente a nuevas enfermedades.

En los últimos años se ha demostrado que existen PSC en numerosos tejidos adultos como el músculo esquelético (Asakura 2003), hígado (Zhang y cols. 2003), médula ósea (Tocci y Forte 2003) o incluso el sistema nervioso central (Bottai 2003), siendo más interesante, desde el punto de vista práctico, aquellas que se encuentran en los tejidos más accesibles. Un hallazgo reciente de gran interés demuestra que estas PSC se encuentran en sangre circulante periférica en humanos y que son capaces de diferenciarse in vitro en distintos tejidos como macrófagos, linfocitos, epitelio, endotelio, tejido nervioso y hepático, bajo la inducción de diferentes factores de crecimiento (Zhao y cols. 2003).

Aunque el cultivo de progenitores hematopoyéticos periféricos y medulares está ampliamente extendido en la medicina humana tanto para usos diagnósticos como terapéuticos, siempre se han detectado importantes dificultades para su estandarización, parcialmente resueltas en los últimos años. En los animales aun no hay una incorporación significativa de estos cultivos a la clínica, y son muy pocos los estudios que lo reflejan. Estos hechos ponen de relieve la necesidad de evaluar la idoneidad de los medios de cultivo, los métodos y la actuación de los factores estimulantes recombinantes utilizados en los cultivos humanos para su uso en el cultivo de progenitores hematopoyéticos de distintas especies.

Este trabajo demuestra que existen células promotoras circulantes en la sangre periférica de varias especies (ratón, rata, hámster, conejo, cerdo, perro y gato), y que además pueden ser fácilmente aisladas y cultivadas. La existencia de este tipo de células ya había sido descrito previamente en el hombre, demostrando mediante la adición de diferentes factores de crecimiento, que eran capaces de diferenciarse en macrófagos, linfocitos T, células epiteliales, células endoteliales, células neuronales y hepatocitos (Zhao y cols. 2003). En nuestro caso se observaron distintos subconjuntos celulares en las placas de cultivo: macrófagos, megacariocitos, células eritroides y células de morfología similar a los fibroblastos, las cuales exhibían el marcador CD34 propio de las stem cell hematopoyéticas (Abbas y cols. 2003). Son precisamente estas últimas células las que el equipo de Zhao señaló como células promotoras y responsables de la diferenciación hacia otros grupos celulares (Zhao y cols. 2003). La función fisiológica de estas células dispersas en todo el

organismo es todavía desconocida, aunque quizá su función sea la reparación de los diferentes tejidos dañados.

Hay que destacar el hecho de que las células diferenciadas presentes en la placa no provenían de la fusión con tejido adulto preexistente, posibilidad que apuntaron algunos autores en trabajos precedentes realizados *in vitro* (Terada y cols. 2002; Ying y cols. 2002).

Por otra parte, el crecimiento de células pertenecientes a la línea roja en algunos medios de cultivo carentes de Epo podría indicar que hay ciertas citoquinas que están estimulando a esas células precursoras hacia la línea roja, o bien que las células primigenias se encuentran en un estadio muy primitivo, momento en el que no necesitan ser estimuladas por Epo para diferenciarse en células de la serie roja, y que estaría de acuerdo con el hecho de que pudieran diferenciarse hacia líneas celulares muy distintas como demostró el equipo de Zhao en medicina humana.

Estos resultados tuvieron una gran repetibilidad para cada una de las especies estudiadas, obteniendo los mayores crecimientos relativos en hámster, cerdo y perro, lo que puede significar que poseen un mayor número de células precursoras circulantes o que los medios de cultivo utilizados son más adecuados para estas especies que para las células provenientes de las otras. En cualquier caso, es reseñable el hecho de que los medios utilizados son medios comerciales estandarizados con factores estimulantes recombinantes de origen humano y ampliamente utilizados en la clínica humana. Su utilización en estudios futuros permitiría la estandarización de las condiciones experimentales, que facilita la comparación de resultados. De la misma manera, y en este mismo punto, también es importante hacer hincapié en el hecho de que las células promotoras de las especies estudiadas son capaces de crecer en medios de cultivos que no contienen citoquinas específicas de cada especie – sólo contienen citoquinas humanas-, y además conviene reseñar que no hubo crecimiento en las placas del medio que no contenía los factores de crecimiento, subrayando la capacidad estimulante y la utilidad de las citoquinas recombinantes humanas en todas las especies animales.

La presencia de estas células promotoras en la sangre circulante de estos animales, y la sencillez y estandarización del método para obtenerlas, abre las puertas a distintas posibilidades como la aplicación a la clínica veterinaria y la investigación sobre la toxicidad o efectos de fármacos. Además muchas de estas especies son los modelos animales de enfermedades humanas resultando de aplicación en el ámbito de la terapia celular.

3.- Relación entre lactación y leishmaniosis en la infección experimental con un modelo criceto

En este ensayo se pretendía relacionar la lactación con un estado de hiperinmunidad asociado. Ya en 1989 Grossman concebía el dimorfismo sexual inmunológico y la lactación como un mecanismo compensatorio del estrés producido por la gestación y el parto. Años más tarde esta afirmación se confirmaba al descubrir la mayor resistencia de las mujeres al shock hemorrágico traumático (Angele y cols. 2000).

En el campo de los protozoarios, y en concreto el de la leishmania, no existe ninguna referencia bibliográfica al respecto; quizá los dos únicos ensayos relacionados fueron los llevados a cabo por Di Carlo y cols. en 1993 y por Meli y cols. en 1996. En el primero se observó una mejoría en ratones infectados con *Salmonella typhimurium* tratados con prolactina ovina, y en el segundo se hablaba de protección frente al mismo patógeno en ratones previamente tratados con prolactina recombinante humana. Aunque únicamente había la referencia de estos dos experimentos con el modelo murino se decidió usar para nuestro ensayo el modelo criceto, porque el hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) es sin lugar a dudas el mejor modelo de la leishmaniosis visceral humana (Melby y cols. 1998), y además nuestro grupo está familiarizado con el manejo de estos animales, lo que condicionó su elección para este ensayo.

Otro aspecto ciertamente controvertido es la vía de infección de los animales y la dosis de inóculo. Muchos grupos prefieren la inyección intracardiaca del parásito por considerarla una vía efectiva de diseminación sistémica. En nuestro caso el daño miocárdico que produce esta vía y el estrés que genera hizo descartarla. Por el contrario la vía intraperitoneal parece conseguir una dispersión menos efectiva del parásito, sin embargo nuestro datos sugieren que es similar a la vía natural en la que el parásito se enfrenta a una primera barrera constituida por la inmunidad cutánea equivalente a los macrófagos presentes en el peritoneo. Además la permeabilidad y la vascularización del epiplón permiten la migración de los macrófagos infectados al resto del organismo.

La dosis infectiva que se utilizó 25×10^6 promastigotes, puede parecer excesiva comparada con la utilizada por otros grupos en otros ensayos, pero queríamos asegurar la aparición de la enfermedad en todos los hámsters del grupo control positivo, ya que es un problema habitual en los ensayos con *Leishmania*, al tratarse de una enfermedad tan relacionada con el sistema inmune, que algunos animales de los grupos controles positivos no desarrollen la enfermedad. De acuerdo con los resultados obtenidos está claro que esta dosis es suficiente para circunvalar este problema.

Todos los parámetros evaluados se consideraron específicos de la evolución de la enfermedad y por tanto encaminados a la monitorizar el status de los animales. El peso, quizá el menos específico, refleja sin embargo la realidad de la enfermedad. La correlación de éste con la ausencia de títulos positivos en la serología en el grupo A, hembras infectadas lactantes, perfila la conclusión palpable alrededor de este ensayo. Ciertamente la ausencia de anticuerpos en el grupo A fue sin lugar a dudas el resultado más interesante de este experimento. Este hallazgo concuerda con los encontrados por Di Carlo y cols. en 1993 en los que afirman que la hiperprolactinemia incrementa la fagocitosis y la destrucción intracelular de los macrófagos peritoneales, sin modificar el número de leucocitos en sangre periférica, excluyendo así la movilización desde otras localizaciones. De esta forma creemos que esta hiperactividad de los macrófagos peritoneales y de las células NK, máximos exponentes de la inmunidad inespecífica regulada por la prolactina, consiguen circunscribir y aislar al parásito impidiendo su diseminación y progresión. Quizá la afirmación de la ausencia de respuesta humoral sea incorrecta, ya que en el día 15, 7 de los 20 hámsters del grupo A dieron una débil lectura 1/10, debiendo considerar la presencia de ésta, pero de una forma débil desde la perspectiva de nuestros métodos de detección. Resulta curioso observar como el parásito consigue polarizar la respuesta de los animales no lactantes (grupo C) hacia la producción masiva de anticuerpos, del todo inefectivos frente a un microorganismo intracelular como *Leishmania*, y como mantienen una preponderancia de la respuesta celular los hámsters lactantes del grupo A.

Las pruebas utilizadas para la valoración de la inmunidad celular, la intradermorreacción y el ensayo de linfoproliferación, puedan parecer burdas respecto a otras como la determinación del perfil citoquínico mediante RT-PCR o el marcaje linfocitario con anticuerpos monoclonales, pero eran las disponibles en ese momento ya que todavía no se había conseguido aplicar de un manera fiable y práctica las otras determinaciones. Tanto el test de intradermorreacción con leishmanina como la proliferación linfocítica realizada en sangre total aportan una visión global del status inmunológico del animal. Resulta evidente la anergia inmunitaria presente en los animales del grupo C, infectados no lactantes, en los que no se observa respuesta inmune celular ni en la intradermorreacción ni en la linfoproliferación y que además su deterioro se hace patente a lo largo del ensayo, mientras que en el grupo A de lactantes infectados, la inmunidad celular está activada y muestra unos resultados in vivo e in vitro concordantes con una respuesta totalmente efectiva frente al parásito.

Los resultados obtenidos a partir de la necropsia no hacen más que confirmar lo observado durante todo el experimento. La ausencia de lesiones macroscópicas y microscópicas en los órganos diana de los animales lactantes infectados ratifica la hipótesis del aislamiento y la

falta de progresión del parásito. Todas las pruebas evidencian la ausencia del parásito en los tejidos analizados, y aunque improbable, no puede descartarse el posible acantonamiento de éste en otros tejidos o en células como fibroblastos.

4.- Relación de la hiperprolactinemia inducida por Domperidona con la hematopoyesis y la funcionalidad leucocitaria en Beagles sanos

La relación entre la prolactina y la función hematopoyética es evidente como reflejan las diversas publicaciones citadas en el apartado de Revisión Bibliográfica, pero no existe ningún trabajo relacionando la hiperprolactinemia inducida por la domperidona y la hematopoyesis.

La estandarización del cultivo de progenitores hematopoyéticos aporta una herramienta óptima para la evaluación de la actividad hematopoyética y el hallazgo de células pluripotentes en sangre periférica adiciona accesibilidad a la toma de muestras, situación que no ocurre con el empleo de médula ósea que dificultaría la recogida de muestras y disminuiría la repetibilidad del ensayo.

Sun y cols. en 2002 encontraron un aumento de la celularidad en la médula ósea en ratones tratados con prolactina, lo que justifica el empleo de los cultivos para intentar correlacionarlo con una variación en la presencia de células pluripotentes en sangre periférica. Estas células descritas por el equipo de Zhao pueden servir como células regeneradoras de tejidos, aunque todavía no se conoce su función real.

Los resultados obtenidos en este ensayo confirman la hipótesis y relacionan la hiperprolactinemia inducida con domperidona con un aumento general de la hematopoyesis y de la presencia de células precursoras en sangre periférica. Es interesante, observando los resultados en medio semisólido, el pico de estimulación que se produce tanto en el número de CFU-E como de CFGU-GM entre los días 5 y 15; este máximo se mantiene o incluso desciende, pero en ningún caso sigue aumentando. Quizá manteniendo la dosis de fármaco se llegue a un estado refractario incapaz de conseguir más estimulación, para comprobarlo serían necesarios nuevos estudios variando la dosis y la pauta de administración de la domperidona.

Posiblemente los condicionantes genéticos y los factores ambientales también estén implicados confiriendo tal vez un dintel máximo hematopoyético a cada animal, como ocurre con la respuesta inmune, que sea imposible rebasar aunque aumente el factor estimulante.

Otro factor, que debido a la naturaleza del ensayo, no se ha tenido en cuenta es el estado reproductivo en las hembras. Este puede influir en la liberación de prolactina (Gobello y cols. 2001) y por tanto creemos que también en la hematopoyesis. En el trabajo mencionado realizado por Gobello y cols. en 2001 se divide a las hembras en dos grupos en función de la liberación de prolactina con un mismo estímulo, encontrando en perras en anoestro niveles altos y bajos, además también se menciona la raza como otro factor a tener en cuenta en los niveles circulantes de hormona.

El test de reducción del NBT había sido descrito en perros por Poli y cols. en 1973, pero no se ha introducido en la práctica veterinaria ni es una prueba utilizada en la valoración de la inmunidad. Únicamente en algún trabajo con infección de macrófagos in vitro (Gueron y cols. 1993, Mallinson y Coombs 1989) es utilizado para valorar la integridad de la cadena oxidativa. Todos ellos muestran un descenso en la reducción del colorante en los macrófagos infectados, catalogándolo como un test fundamental para monitorizar la evolución del estado de la cadena oxidativa y por tanto de la competencia de los macrófagos. Aunque se debe subrayar la importancia de la relación entre el parásito y la cadena oxidativa, Passwell y cols. en 1994 demostraron que el macrófago estimulado por el INF- γ tiene otras vías para acabar con el parásito.

La reducción del nitroazul de tetrazolio debe ser considerada una prueba de gran potencia, como demuestran los resultados obtenidos, en la valoración de la respuesta efectiva frente a *Leishmania*. Al ser un test cuantitativo aporta datos objetivos de la evolución de la competencia macrofágica en la enfermedad. Además su desarrollo y puesta a punto es sencillo y no requiere elementos sofisticados.

También se ha usado recientemente esta prueba para observar la función macrofágica en el testaje de diferentes vacunas (Strasser y cols. 2003), lo que remarca la versatilidad de este test, que podría ser introducido en la práctica veterinaria diaria para la valoración de numerosas patologías infecciosas e incluso tumorales. Una interrogante que puede surgir al examinar el ensayo es la falta de valoración de la respuesta inmune celular con las mismas herramientas de ensayos anteriores (intradermorreacción y linfoproliferación).

Se debe recordar que ambas evalúan de acuerdo a un contacto preexistente con el parásito, siendo específicas para esta patología. Al no existir dicho contacto, animales sanos, estas pruebas carecen de utilidad. Podrían haberse planteado determinaciones del nivel de INF- γ o de poblaciones linfocitarias, pero todos los trabajos realizados que utilizan animales sanos, están de acuerdo en la baja o nula estimulación producida por la prolactina en ausencia de un stress patológico (Dorshkind y Horseman 2000). Por lo tanto para poder evaluar estos parámetros deberíamos haber provocado un desafío al sistema inmune de los animales mediante un estímulo estresante como un shock térmico o provocando una infección experimental. El complejo sistema inmunitario multifactorial de los cánidos, unido a diversas consideraciones éticas resultó decisivo para decantarnos por la valoración única de la hematopoyesis y de la funcionalidad leucocitaria dejando la valoración de la inmunidad celular para la prueba clínica con animales infectados de manera natural.

5.- Estudio de la eficacia terapéutica de la domperidona en perros enfermos de leishmaniosis

En este estudio, ya desde la revisión bibliográfica, se intuye la relación entre la leishmaniosis y la prolactina, aunque ya se haya estructurado en bloques individualizados. Esta desunión se debe a la ausencia de referencias bibliográficas que la apoye, ya que únicamente Pearson en 2002 en una nota corta aparecida en *Trends in parasitology* divagaba acerca de una posible relación entre la malaria y la prolactina, citando otras posibles enfermedades parasitarias que podrían estar relacionadas, y entre ellas reseñada la leishmaniosis. Los efectos que ejercen sobre el sistema inmune la leishmaniosis canina y un estado de hiperprolactinemia están resumidos en la **Tabla IV. 1**. Los efectos claramente contrapuestos hacían de la prolactina una posible arma terapéutica frente a esta enfermedad endémica en toda la cuenca mediterránea.

Leishmaniosis Visceral	Hiperprolactinemia
↓ Th1	↑ Th1
↓ IL-2, IL-12	↑ IL-2, IL-12
↓ INF-gamma	↑ INF-gamma
↓ TNF-alfa	↑ TNF-alfa
↑ Th2	↓ Th2
↑ TGF-beta	↓ TGF-beta

Tabla IV. 1.
Ambientes inmunológicos y citoquínicos
observados en la leishmaniosis visceral y
en situaciones de hiperprolactinemia

La prolactina ya había sido relacionada sin embargo con otras enfermedades parasitarias. Se creía que la lactación en un animal parasitado aumentaba la eliminación de huevos por parte de los parásitos intestinales, denominándose a este fenómeno *peripartum rise*. En 1990 Jeffcoate y cols. llegaron a la conclusión de que el puerperio no va ligado a un incremento en la eliminación de huevos de parásitos en los animales de abasto; sin embargo más recientes son los hallazgos totalmente contrapuestos de Chartier y cols. en 1998 que correlacionan los niveles de prolactina sanguínea en cabras con la cantidad de huevos

expulsados. Se trata por tanto de un tema controvertido y además totalmente alejado de este trabajo, no siendo comparables la respuesta inmune que organiza el hospedador frente a un parásito multicelular como un verme intestinal con el sistema defensivo contra un parásito intracelular como *Leishmania infantum*.

En Europa esta enfermedad es un serio problema y se calcula que por lo menos 7 millones de perros están en riesgo de padecerla (Reithinger y cols. 2001). Dada la actual prevalencia, el mejor método para luchar contra la enfermedad tanto en el humano como en el perro sería el desarrollo de una vacuna (Dye 1996), y muchos grupos están probando diferentes tipos de vacunas (Ramiro y cols. 2003), pero hasta ahora no hay en el mercado una terapia profiláctica efectiva, y es necesario buscar otras vías frente a la enfermedad. El tratamiento actual posee una eficacia limitada y desde luego no impide las recaídas (Gradoni 2001), por lo tanto la inmunomodulación es actualmente la clave frente a la leishmaniosis canina.

La inmunomodulación en la leishmaniosis se viene empleando desde hace años con diferentes productos, ya comentados en el apartado Revisión Bibliográfica. Sin embargo la utilización de estos fármacos es en la mayoría de las ocasiones empírica y sin evidencias científicas básicas. Sirva de referencia el hecho de que no existe ningún trabajo con estos fármacos en el que se haya empleado sólo, sin combinar con algún otro fármaco leishmanicida. Por tanto podemos afirmar que este es el primer trabajo que evalúa de forma independiente una droga inmunomoduladora, sin asociarla a ningún otro tratamiento.

La primera dificultad de este experimento es la falta de otros como referencia, y la segunda es sin duda la propia estructura, la prueba clínica. Este tipo de ensayos de campo aporta dinamismo y aplicabilidad a los resultados, pero están fuertemente condicionados por numerosos factores externos que se escapan al control minucioso. Además hay que añadir que debido a la idiosincrasia de la enfermedad, se pueden encontrar innumerables estadios clínicos que dificultan la agrupación de los perros en grupos semejantes. A pesar de estos inconvenientes se planteó esta prueba clínica como base para posteriores estudios, considerando los resultados de mayor utilidad que los de un estudio de infección experimental cerrado.

El siguiente paso fue determinar el fármaco que se iba a administrar y la dosis. La prolactina ovina, disponible comercialmente, u otra prolactina recombinante hubieran sido en buena lógica la primera elección como inmunoestimulante directo. El elevado coste, que debía asumir el propietario, la incómoda vía de administración y las posibles reacciones de sensibilización frente a una proteína no específica hicieron descartar esta opción, pasando a considerar como primera opción la utilización de fármacos estimulantes de la liberación de prolactina. Las drogas más accesibles, más cómodas de administrar y con mayor número de referencias apoyando su potencial hiperprolactinemiante fueron la metoclopramida

(Zellweger y cols. 1998; Knoferl y cols. 2000) y la domperidona. Se eligió la segunda porque no atraviesa la barrera hematoencefálica y por lo tanto no puede producir efectos adversos nerviosos extrapiramidales como la primera.

La dosis y la pauta de administración se fundamentaron en los resultados obtenidos en el ensayo con perros Beagles. Al observarse que los niveles séricos de prolactina seguían elevados a las 10 horas después de administrar por vía oral 1mg/kg de domperidona, se decidió establecer una toma cada 12 horas. Como la cantidad absoluta a administrar en perros de más de 30 kg nos pareció excesiva se rebajó a 0,75mg/kg. De todas formas hay que volver a hacer hincapié en que se trata del primer estudio centrado en este fármaco y que se deben explorar otras dosis y pautas de administración.

Los resultados conseguidos usando esta dosificación y esta pauta son esperanzadores y señalan a la domperidona como una nueva estrategia inmunoestimulante frente a esta enfermedad, y la valoración de los parámetros clínicos, así como la impresión del propietario valorando la evolución de su perro, aunque subjetivo y difícilmente mesurable e imposible de plasmar en un gráfico, resultan cruciales y son los que determinan tanto la eficacia como la aplicabilidad de los tratamientos. Resulta evidente que los perros del grupo A, menor título de anticuerpos y oligosintomáticos, presentan una mejor evolución que los del grupo B. En este punto es crucial la presencia de lesión renal, considerándola como un punto crítico en el enfoque terapéutico del animal. Otra de las ventajas de este fármaco, es precisamente, que puede administrarse en perros con insuficiencia renal crónica frente a los fármacos leishmanicidas convencionales en los que están desaconsejados.

Dentro de la prueba clínica también se valoraron parámetros (intradermorreacción y linfoproliferación) que evaluaron la respuesta celular frente al parásito. Globalmente se observa una estabilidad inmunitaria durante todo el año, lo que avala la dosificación mensual del fármaco con variaciones transitorias individuales. Además profundizando en los resultados se detectó una disonancia en los perros del grupo B entre la respuesta celular medida con el ensayo linfoproliferativo y la intradermorreacción. Aunque no es el objetivo de este trabajo establecer comparaciones entre las diferentes pruebas, se observó una mayor estimulación *in vitro* que no se concretaba en un aumento claro del grosor del habón en la intradermorreacción. La estimulación obtenida en la linfoproliferación refleja la proliferación linfocitaria, mientras que la intradermorreacción engloba además la respuesta macrofágica, lo que puede indicar un posible fallo de presentación antigénica, de receptores o de función macrofágica en estos animales.

Las consideraciones generales sobre el ensayo incluyen en primer lugar la necesidad de resaltar la naturaleza prospectiva y básica del estudio, que debe continuarse con otros que prueben otras pautas y dosis, e incluso la asociación a otros fármacos y la inclusión en éstos

de nuevos parámetros como la determinación citoquímica y la tipificación de subpoblaciones linfocitarias. En segundo lugar hay que citar el status infectivo en el que quedan estos animales tras el tratamiento. No es este un ensayo epidemiológico, pero tratándose de una zoonosis hay que mencionar que se deberían realizar en pruebas posteriores ensayos de PCR en muestras cutáneas o de xenodiagnóstico indirecto para indagar esta materia. La valoración global de los resultados obtenidos, que incluye la mejor evolución de los animales en un estadio inicial de la enfermedad, el ensayo de los hámsters lactantes (Gómez Ochoa y cols. 2003) y las experiencias en ratones que demuestran el papel protector de la prolactina frente a una infección con *Salmonella*, abre la pertinencia del diseño de nuevos estudios que investiguen el papel profiláctico de la hiperprolactinemia inducida por este fármaco.

6.- Clonaje y secuenciación del gen de la prolactina canina

El clonaje y secuenciación de la prolactina canina puede parecer un ensayo inconexo dentro del esquema general de la tesis; sin embargo todas las aplicaciones derivadas enlazan con todo lo tratado en apartados anteriores. Como ya se ha comentado la primera opción terapéutica en la que se pensó al plantear la prueba clínica fue en el uso de prolactina específica. Resulta curioso que después de buscar en varias bases de datos encontramos secuenciadas prolactinas de especies tan dispares como el pavo, la cabra, el hámster sirio o el gato y sin embargo los cDNAs del perro no se hubieran secuenciado, por lo que la obtención de esta secuencia puede ser de gran utilidad en esta especie conocido el potencial inmunoestimulante de la prolactina.

Un punto sobre el que se debe incidir en este apartado es la utilización de diferentes tipos de cebadores para lograr la secuenciación del gen. En primer lugar se recurrió a cebadores degenerados, obteniendo cuatro bandas, dos de las cuales eran compatibles en peso molecular con la proteína y después de varios intentos de secuenciación sólo se obtuvieron resultados incoherentes, como se describe en los resultados. Es quizá la falta de cantidad de producto amplificado lo que frustró esta vía, decantándonos por el uso de 4 cebadores con bases de inosina. Al añadir dos cebadores constituidos a partir de similitudes internas de la proteína entre las diferentes especies se ganó en especificidad, obteniendo una única banda de amplificación, lo que demostró que los cebadores con bases de inosina resultan más específicos y son capaces de conseguir un mayor amplificado.

La banda amplificada comparte una gran homología con los cDNAs de las proteínas de las demás especies, lo que sugiere casi con total seguridad que se trata de la secuencia correspondiente a la prolactina canina. De todas formas trabajos posteriores completarán esta secuencia que podría ser insertada en un plásmido para intentar conseguir proteína bioactiva.

Una de las aplicaciones de esta secuencia podría ser su uso como adyuvante en vacunas caninas. Desde hace tiempo nuestro grupo de investigación trabaja en la elaboración de una vacuna recombinante a partir de la proteína p36 LACK a la leishmaniosis canina. Este vacuna ya ha conseguido unos resultados esperanzadores reflejados en varias Tesis Doctorales (Zárate 2002, Ramiro 2003) y en una publicación en la revista *Vaccine* (Ramiro y cols. 2003). Brevemente, esta vacuna consta del ADN correspondiente a la proteína LACK dentro de un virus. Gracias al virus este fragmento de ADN se integra en el genoma del animal que produce la proteína sin generar sensibilización. Añadiendo a ese plásmido el gen de la prolactina se estimularía de una forma directa la respuesta inespecífica, favoreciendo mediante 2 vías la eliminación del parásito en caso de una posible infección. Estas

aplicaciones requerirán de tiempo y de muchos ensayos, pero la secuenciación de este gen establece las bases previas.



Conclusiones

1. El EasyDAT es la prueba serológica de elección para el trabajo de campo porque tiene el mismo nivel de sensibilidad y especificidad que el DAT pero es más sencilla y su elaboración requiere menos medios técnicos.
2. Se ha demostrado la presencia en sangre periférica de rata, ratón, hámster, conejo, cerdo, gato y perro de células pluripotentes que exhiben el marcador CD34, capaces de diferenciarse hacia células eritroides, granulomacrofágicas y megacariocitos.
3. El uso de medios semisólidos que contienen citoquinas y factores estimulantes del crecimiento recombinantes de origen humano representa un método eficaz y sencillo para el cultivo de estas células.
4. La lactación en hembras de Hámster sirio impide el asentamiento de la infección con *Leishmania infantum*.
5. La administración de 1mg por kg de peso vivo de domperidona oral en perros sanos, consigue estimular la hematopoyesis y la actividad leucocitaria.
6. La hiperprolactinemia inducida por la domperidona, un fármaco fácil de administrar, que no produce reacciones adversas y es económico, debería ser considerado en el manejo terapéutico de la leishmaniosis canina.
7. La inmunomodulación conseguida mediante la administración de 1 mg por kg de peso vivo cada 12 horas y durante 1 mes de domperidona oral en perros con un estadio inicial de leishmaniosis, resulta efectiva para frenar la evolución de la enfermedad.
8. La administración de este fármaco con la misma pauta en perros con un estadio avanzado de la enfermedad consigue mejorar los síntomas y en muchos casos virar la respuesta inmune Th2 a Th1.
9. Los RNAs extraídos de la hipófisis de perro permitieron la amplificación y secuenciación de una banda de 726 pares de bases compatible con el cDNA de la prolactina canina.



Bibliografía

1.- Leishmaniosis

- Abboud, H. E. 1993. Growth factor in glomerulonephritis. *Kidney Int.* 43:252-267.
- Abranches, P., Santos-Gomez, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L.F. & C.L. Jaffe. 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasit. Immunol.* 13: 537-550.
- Abranches, P., Silva-Pereira, M. C. D., Conceição-Silva, F. M., Santos, G. M. & J. G. Janz. 1991a. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77: 557-561.
- Adler, S & O.Theodor. 1930. Infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead with *Leishmania infantum*. *Nature*, 127:437.
- Adler, S. .1929 An analysis of the *Leishmania* sandfly problem. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 23: 289-300.
- Alexander, J. & D. G. Russell. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31:176-231.
- Alvar, J. 1997. Las leishmaniasis: de la biología al control. En: Junta de castilla y León (Ed.). pp:11-150.
- Alvar, J. 2001. Las leishmaniasis: de la biología al control. En:(Ed) Laboratorios Intervet. Pp:17-194.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. & J. H. Mc Kerrow. 1992. Tumor necrosis factor alfa restores granulomas and induces parasite-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, 356: 604-606.
- Antczak, D. F. & N. T. Gorman. 1989. Cellular interactions in immune responses En: Halliwell-Gorman (editor). *Veterinary Clinical Immunology*. Saunders, Filadelfia, pp: 107-134.
- Aoun, K., Bouratbine, A., Harrat, Z., Guizani, I., Mokni, M., Bel Hadj, S., Ben Osman, A., Belkaid, M., Dellagi, K. & R. Ismail. 2000. Epidemiologic and parasitologic data concerning sporadic cutaneous leishmaniasis in northern Tunisia. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 93(2): 101-103.

Badaro, R., Falcoff, E., Badaro, F. S., Carvalho, E. M., Pedral-Sampaio, D., Barral, A., Carvalho, J. S., Barral-Netto, M., Brandley, M., Silva, L., Bina, J. C., Teixeira, R., Falcoff, R., Rocha, H., Ho, J.L., Johnson, W. D. & D. Jr. Johnson. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *New England. J. Med.* 322: 16-21.

Bee, A. Culley, F. J. Alkhalife, I. S. Bodman-Smith, K. B. Raynes, J. G. & P. A. Bates. 2001. Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein. *Parasitology*, 122: 521-529.

Bejarano, E. E. Uribe, S. Rojas, W. & I. D.Vélez. 2001. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 27-28.

Benavides, I., Morrillas, F. González Castro, J. Reyes, A. & A. Valero. 1985. Aislamiento de *Leishmania* spp. en *Rattus rattus* en la provincia de Granada. En: IV. Congreso Nacional de Parasitología., Tenerife, p:224.

Berberich, C., Requena, J. M. & C. Alonso. 1997. Cloning of Genes and Expression and Antigenicity Analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 Protein. *Exp. Parasitol.* 85: 105-108.

Blakwell, J.M. 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology*, 112:S67-S74.

Boelaert, M. Criel, B. Leeuwenburg, J. Van Damme, W. Le Ray, D. & P. Van der Stuyft. 2000. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 465-471.

Boelaert, M., El Safi, S., Goetghebeur, E., Gomes-Pereira, S., Le Ray, D. y P. Van der Stuyft. 1999. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and international Health*, 4(5):395-401.

Boelaert, M., El Safi, S., Jacquet, D., De Muynck., Van der Stuyft, P. & D. Le Ray. 1999a. Operational Validation of The Direct agglutination Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(1): 129-134.

Bories, C., Coffin, C., Mathieu, D., Bories, P.N., Scherman, E., Rivollet, D. & M. Deniau. 1998. Lack of nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 92(6): 685-692.

- Boswell, J. M., Yui, M. A., Burt, D. W. & V. E. Kelley. 1988. Increased tumor necrosis factor and IL-1 beta gene expression in the kidneys of mice with lupus nephritis. *J. Immunol.* 141:3050-3054.
- Bourdeau, P. 1988. Éléments de la relation hôte-parasite au cours de l'infection leishmanienne et conséquences. *Prac. Med. Chir. L'Anim. Cie.* 55: 57-72.
- Bourdeau, P. 1994. Physiopathologie de la leishmaniose canine a *Leishmania infantum*. *Médecine et Armées*, 22(1): 15-22.
- Bourdoiseau, G. Marchal, T. & J.P. Magnol. 1997. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J. Vet. Diag. Invest.* 9: 439-440.
- Bradley. D. J. 1974. Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature*, 250:353.
- Bravo, L., Frank, L. A. & K. A. Breneman. 1993. Canine Leishmaniasis in the United States. *The Compendium*, 15 (5): 699-708.
- Bruna, M. 1994. Interleukin 12. *J. Leukocyte Biol.* 55: 280-288.
- Bulle, B., Millon, L., Bart, J. M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C. L., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J. M. & Piarroux, R. 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol.* 40(9): 3391-7.
- Burns, J. M., Scott, Jm., Carvalho, E. M., Russo, D. M., March, C. J. Van Ness, K. P. & S. G. Reed. 1991. Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 775-779.
- Cabral, M. O'Grady, J. E. & J. Alexander. 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 14: 531-539.
- Campino, L. Santos-Gomes, G. Riça Capela, J. M. Cortes, S. & P. Abraches. 2000. Infectivity of amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for Leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 92: 269-275.
- Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J.C., Rodrigues, M. & Cabral, M. 1998. Use of leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet. Parasitol.* 79: 213-220.

Carrasco, L., M de Lara, F. C., Martin, E., Hervás, J., Molleda, J. M., Gomez-Villamandos, J.C. & R. López. 1997. Acute Haemorrhagic pancreatitis associated whit canine visceral leishmaniasis. *Vet. Rec.* 141(20): 519-521.

Carrera, L., Fermín, M. L., Tesouro, M., García, P., Rollán, E., Gonzáles, J. L., Méndez, S., Cuquerella, M. & J. M. Alunda. 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* 82: 139-146.

Carroll, M.C., Katzman, P., Alicot, E.M., Koller, B.H., Geraghty, D.E., Orr, H.T., Strominger, J.L. & T. Spies. 1987. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 84: 8535-8539.

Carvalho, E.M.; Filho, D.C.; Bacellar, O.; Almeida, R.P.; Lessa, H. & Rocha, H. 1995. Caracterizacion of the inmune response is subjects wiht self-healing cutaneous Leishmaniasis. . *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 53(3): 273-277.

Cavaliero, T. Arnold, P. Mathis, A. Glaus, T. Hofmann-Lehmann, R. P. Deplazes. 1999. Clinical, serological, and Parsitologic Follow-Up after Long-Term Allopurinol Therapy of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *J.Vet. Intern. Med.* 13:330-334.

Charley, B. & F. Blecha. 1991. Les cytokines: leur rôle dans la regulation du système immunitaire, leur utilisation potentielle chez l'animal. *Le Point Veterinaire*, 23 (139): 71-77.

Chatelain, R., Varkila, K. & R.L. Coffman. 1992. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania* major-infected mice. *J. Immunol.* 148: 1182-1187.

Cheimi, J., Starr, S., Frank, I., Rengaraju, M., Jackson, S.L., Llanes, C., Kobayashi, M., Perussia, B., Young, D., Nickbarg, E., Wolf, S.F. & G.Trinchieri.1992. Natural killer (NK) cell stimulatory factor increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and human immunodeficiency virus infected patients. *J. Exp. Med.* 175: 789.

Chiaramonte, M.G., Schopf, L.R., Neben, T.Y., Cheever, A., Donaldson, D.D. & T.A. Wynn. 1999. IL-13 is a Key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation anf IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Immunol.* 162: 920-930.

Christadoss, P. & E. Goluszko. 2002. Tratament of experimental autoimmune myasthenia gravis with recombinant human tumor necrosis receptor Fc protein. *J. Neuroimmunol.* 122(1-2): 186-190.

Ciaramella, P., Olivia, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A. & A. Persechino. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Lesihmania infantum*. *Vet. Rec.* 141: 539-543.

Ciaramella, P. & M. Corona. 2003. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. *Comp Cont Edu.* 25 (5): 358-368

Coffman, R.L., Seymour, B.W., Lebman, D.A., Hiraki, D.D., Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Savelkoul, H.F.J., Finkelman, F.D., Bond, M.W. & T.R. Mosmann. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102: 5-28.

Davidson, R.N., Yardley, V., Croft, S. L., Konecny, P. & N. Benjamin. 2000. A topical nitric oxide-generating therapy for cutaneous leishmaniasis. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 319-322.

De Kossoda, S., Grau, G.E., Louis, J.A. & I. Muller. 1994. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and TNF- β and their receptors in experimental cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62: 1414-1419.

De Luna, R., Vutto, M.L., Ielpo, M.T.L., Ambrosio, R., Piantedosi, D., Moscatiello, V., Ciaramella, P., Scalone, A., Gradoni, L. & D. Mancino. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 70:95-103.

Dedet, J.P. Pratlong, F., Pradinaud., R. & B. Moreau. 1999. Delayed culture of *Leishmania* in skin biopsies. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 673-674.

Deplazes, P.; Smith, N.C.; Arnold, P.; Lutz, H. & J.Eckert. 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17: 451-458.

Dereure, J., Pratlong, F. & J.P. Dedet. 1999. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. En: *Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum.* Barcelona, Spain. pp.18-25.

Derouich-Guergour, D., Brenier-Pinchart, M.P., Ambroise-Thomas, P. & H. Pelloux. 2001. Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int. J. Parasitol.* 31(8): 763-769.

Eisenberger, C.L. & C.L. Jaffe. 1999. *Leishmania*: Identification of Old World species Using a Permissively Primed Intergenic Polymorphic-Polymerase Chain Reaction. *Exp. Parasitol.* 91: 70-77.

Eldridge, B.F. & J.D. Edman. 2000. En: *Medical Entomology.* (Kluwer Academic Publishers). pp: 236-261.

Endris, R.G., Young, D.G., & P.V. Perkins. 1987. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera:Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 24: 412-414.

Engwerda, C. R. & P. M. Kaye. 2000. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol. Today*, 21:73-78.

Enk, A.H. & S.I. Katz. 1992. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J. Immunol.* 149: 92-95.

Evans, D. 1989. En: Handbook on Isolation Characterization and Cryopreservation of *Leishmania*. En: UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Geneva. pp.1-45.

Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T. & A. Cerami. 1985. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227(4693): 1485-1487.

Fausto, A. Mario, M. & M. Mazzini. 1992. Ootaxonomy and eggshell ultrastructure of *Phlebotomus* sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 6:201-208.

Fernandez-Pérez, F.J.; Méndez, S.; de la Fuente, C.; Gómez-Muñoz, M.T.; Cuquerella, M. & J.M. Alunda. 1999. Short Report: Improved diagnosis and Follow-Up of Canine Leishmaniasis using Amastigote-Based Indirect Immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(4) 652-653.

Fernandez-Perez, F. J., Gomez-Munoz, M. T., Mendez, S. & Alunda, J. M. 2003. Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* 86(1): 83-91.

Ferrer, L.M. 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. En: Canine Leishmaniasis an update. *Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum*. Barcelona, Spain. pp.6-10.

Finkelman, F.D., Wynn, T.A., Donaldson, D.D. & J.F. Urban. 1999. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 420-432.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & T.R. Mosmann. 1989. Two types of mouse T helper cell Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081-2095.

Fondevila, D., Vilafranca, M. & Ferrer, L. 1997. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 56(3-4): 319-27.

Ghalib, H.W., Piuvezam, M.R., Skeiky, Y.A.W., Siddig, M., Hashim, F.A., El-Hassan, A.M., Russo, D.M. & S.G. Reed. 1993. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J. Clin. Invest.* 92 (1): 324-329.

Ghose, A. C., Mookerjee, A., Sengupta, K., Ghosh, A. K., Dasgupta, S. & P. K. Ray. 1999. Therapeutic and prophylactic uses of protein A in the control of *Leishmania donovani* infection in experimental animals. *Immunol. Lett.* 65: 175-181.

Girginkardeşler, N., Balcioğlu, C., Yareli, K., Özbilgin A. & Y. Özbel. 2001. Cutaneous Leishmaniasis infection in Balb/c mice using a *Leishmania tropica* strain isolated from Turkey. *J. Parasitol.* 87(5): 1177-1178.

Gonzalez-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet, A. & V. Larraga. 1999. Molecular cloning, cell localisation and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *L.infantum*. *Eur. J. Biochem.* 259(3): 909-916.

Grabstein, K.H., Urdal, D.L., Tushinski, R.J., Mochizuki, D.Y., Price, V.L., Cantrell, M.A., Gillis, S. & P.J. Conlon. 1986. Induction of macrophage tumoricidal activity by Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor. *Science*, 232: 506-508.

Gradoni, L. 1999. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. En: *Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain.* pp.32-39.

Gramiccia, M.; Smith, D.F.; Angelici, M.C.; Ready, P.D. & L. Gradoni. 1992. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitology.* 105: 29-34.

Griffiths, W.A.D. 1987. Old World cutaneous leishmaniosis. En: *The Leishmaniasis in Biology and medicine.* Peters & Killick-Kendrick eds. Academic Press. Pp: 456-479.

Grimm, F., Brun, R. & L. Jenni. 1991. Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 77:185-191.

Guarga, J.L. 1998. Inmunquimioterapia específica de la Leishmaniosis canina. Seguimiento inmunológico y Entológico. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(4): 229-243.

Heinzl, F.P. 1994. Interleukin 12 and the regulation of CD4+ T-cell subset responses during murine leishmaniasis. *Parasitol. Today*, 10 (5): 190-192.

Heinzel, F.P., Sadick, M. D., Mutha, S. S. & R. M. Locksley. 1991. Production of interferon- γ , interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7011-7015.

Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, L.E. & M.K. Gately. 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 177: 1505-1509.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakiyama, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. & T. Kishimoto. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF₂) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324: 73-76.

Ho, J., Badaro, R., Schwartz, A., Dinarello, C.A., Gelfand, J.A., Sobel, J., Barral, A., Netto, M.B. & R. Carvalho. 1992. Diminished in vitro production of interleukine 1 and tumor necrosis factor alpha during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *J. Inf. Dis.* 165 (6): 1094-1102.

Ho, J., Reed, S.G., Sobel, J., Arruda, S., He, S.H., Wick, E.A. & K.H. Grabstein. 1992a. Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. *Infet. Immun.* 60: 2331-2337.

Ho, J.L.; Badaro, R.; Hatzigeorgiou; D.; Reed, G. & W.D. Jr. Johnson. 1994. Cytokines in the treatment of leishmaniasis: from studies of immunopathology to patient therapy. *Biotherapy*, 7: 223-235.

Hoare, C.A. & F.G. Wallace. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*, 212: 1385-1386.

Holaday, B. J., de Lima Pompeu, M. M., Evans, T., de Melo Braga, D.N., Texeira, M. J., de Quiroz Sousa, A., Sadick, M. D., Vasconcelos, A. W., Abrams, J.S., Pearson, R. D. & R. M. Locksley. 1993. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. *J. Infect. Dis.* 167(1): 411-417.

Hommel, M., Jaffe, C. L., Travi, B. and G. Milon. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-*Leishmanial* vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89(1): 55-73.

Howard, M.K. 1985. Host immunity to leishmania. En: *Human Parasitic Diseases*. (Elsevier Science Publishers) Amsterdam. Vol.I.pp:139-162.

Hsieh, Ch.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolff, S.F., O'Garra, A. & K.M. Murphy. 1993. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 260: 547-549.

Hu, X.S., Yang, W., Lu, H., Yan, H., Cheng, J., Ma, Y., Jin, B. & T. Zhang. 2000. Sequencing a specific kinetoplast dna fragment of leishmania donovani for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J. Parasitol.* 86(4): 822-826.

James, S.L. & C. Nacy. 1993. Effector functions of activated macrophages against parasites *Current. Opinion Immunology*, 5: 518-523.

Jimenez-Ruiz, A., Boceta, C., Bonay, P., Requena, J.M. & C. Alonso. 1998. Cloning, sequencing and expression of the leucine-rich repeat containing PAS antigen genes from *Leishmania infantum*. *Eur. J. Biochem.* 251:389-397.

Karupiah, G., Blanden, R.V. & A.I. Ramshaw. 1990. Interferon-gamma is involved in the recovery of athymic nude mice from recombinant vaccinia virus/interleukin-2 infection. *J. Exp. Med.* 172: 1495-1503.

Katakura, K.; Kawazu, S.; Naya, T.; Nagakura, K.; Ito, M.; Aikawa, M.; Qu, J.; Guan, L.; Zou, X.; Chai, J.; Chang, K.; & Y. Matsumoto. 1998. Diagnosis of Kala-Azar by Nested PCR Based on Amplification of the *Leishmania* Mini-Exon Gene. *J. Clin. Microbiol.* 36(8): 2173-2177

Kaye. P. M., Gorak, P., Murphy, M. and S. Ross. 1995. Strategies for immune: intervention in visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89(1): 75-81.

Keithly, J. S. 1976. Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamster. *J. Protozool.* 23: 244-245.

Kelso, A. 1998. Cytokines: principles and prospects. *Immunol. Cell. Biol.* 76:3 00-317.

Kemp, M., Theander, T.G. & A. Kharazmi. 1996. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. *Immunol. Today*, 17 (1): 13-16.

Kenney, R. T., Sacks, D. L., Sypek, J. P., Vilela, L., Gam, A. A. & K. Evans-Davis. 1999. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 163: 4481-4488.

Khaskhely, N. M., Maruno, M., Takamiyagi, A., Uezato, H., Kasem, K. M., Hosokawa, A., Kariya, K., Hashiguchi, Y., Landires, E. A. & S. Nonaka. 2001. Pre-exposure with low-dose UVA suppresses lesion development and enhances Th1 response in BALB/c mice infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Dermatol. Sci.* 26(3): 217-32

Killick-Kendrick, R. 1990. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4: 1-24.

Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H. & R.W. Ashford. 1974. *Leishmania* in phlebotomid sand flies. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc. Roy. Soc. Entomol.* 187: 409-419.

Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., Leaney, A.J. & Rioux. 1979. Aspects of the life-cycle of *Leishmania* in the sandfly. En: *Proceeding of the second European Multicolloquy of Parasitology*. Prosveta, Belgrade, Yugoslavia. pp. 89-95.

Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A. & K. G. Plevraki. 1999. Clinical considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece: A Retrospective Study of 158 Cases (1989-1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35: 376-383.

Kraneveld, A.D., Folkerts, G., Van-Oosterhout, A.J.M. & F.P. Nijkamp. 1997. Airway hyperresponsiveness: First eosinophils and then neuropeptides. *International Journal of Immunopharmacology*, 19 (9-10): 517-527.

Lariviere, M., Beauvais, B., Derouin, F. & F. Traore. 1987. *Parasitologie Medicale*. En: (Ellipses) Francia. pp: 55-62.

Launois, P., Himmelrich, H., Tachini-Cottier, F., Milton, G. & J.A. Louis. 1999. New insight in to the mechanisms underlying Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 1:59-65.

Lawyer, P.G., Young, D.C., Butler, J.F. & D.E. Akin. 1987. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 24: 347-355.

Lechaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., Lamonthe, J. & P. Bastien. 2001. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral Leishmaniasis using peripheral blood. 2001. *J. Clin. Microbiol.* 39(2): 613-617.

Lechaud, L., Dereure, J., Chabbert, E., Reynes, J., Mauboussin, J.m., Oziol, E., Dedet, J.P. & P. Bastien. 2000. Optimized PCR Using Patient Blood Samples For Diagnosis and Follow-Up of Visceral Leishmaniasis, with Special Reference to AIDS Patients. *J. Clin. Microbiol.* 38(1): 236-240.

Leonard, W.J., Depper, J.M., Crabtree, G.R., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Robb, R.J., Kronke, M., Svetlik, P.B., Peffer, N.J., Waldmann, T.A., y col.1984. Molecular cloning and expression of cDNA's for the human interleukin-2 receptor. *Nature*, 311: 626-631.

Lezama-Dávila, C.M. & G. Gallagher, 1995. CD4⁺ CD8⁺ and CD4⁻ CD8⁻ T cells can confer protection against *Leishmania m. mexicana* infection. *Men. Inst. Osw. Cruz*. 90: 51-58.

Liew, F. Y. & C.A. O'Donnell. 1993. Immunology of leishmaniasis. En: *Adv.Parasitol.* (Academic Press) vol.32.pp: 161-259.

Lightner, L.K., Chulay, J.D. & A.D.M. Bryceson. 1983. Comparasion of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* fron spenic aspirates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:296-299.

Limoncu, M.E. Balcioğlu, İ.C. Yereli, K. Özbel, Y. & A. Özbilgin. 1997. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species. *J. Clin. Microbiol.* 35(9): 2430-2431.

Lotvall, J. & T. Pullerits. 1999. Treating asthma with anti-IgE or anti-IL5. *Curr. Pharm.Des.* 5(10): 757-770.

Manetti, R., Parronchi, P., Grazia-Giudizi, M., Piccini, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G. & S. Romagnani.1993. Natural Killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177: 1199-1204.

Martín Iniesta, F., Martín Iniesta, E. & F. Martín Luengo.1982. Papel de perros y lobos como reservorio de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Revista Ibérica de Parasitología*, 42: 307-313.

Martínez, J.E., Valderrama, L., Gama, V., Leiby, D.A. & N.G. Saravia. 2000. Clonal diversity in the experssion and satbility of the metastatic capabiliti of *Leishmania guyanensis* in the golden hamster. *J. Parasitol.* 86(4):792-799.

Martínez-Moreno, A. Martínez-Moreno, T. Martínez-Moreno, F.J. Acosta, I. & S. Hernández. 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48: 209-220.

Martín-Sanchez, J.; Lepe, J.A.; Toledo, A.; Ubeda, J.M.; Guevara, D.C.; Morrillas-Márquez, F. & M. Gramiccia. 1999.*Leishmania* (*Leishmania*) *Infantum* enzymatic variants causing canine leishmaniasis in the Huelva province (south-west Spain). *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 93: 495-496.

Matas Mir, B & J. Rovira de Alos. 1989. In: Estudio epidemiológico de la Leishmaniosis canina en la isla de Mallorca. En: Gobierno Balear. Cancillería de sanidad y seguridad Social. p: 110.

Maüel, J. & R. Behin. 1981. Immunology of Leishmaniasis. En " Biochemistry and Physiology of Protozoa" Second edition. (Academic Press) vol.4. pp: 385-429.

Mauricio, I. L., Gaunt, M.W., Stothard, J. R. & M.A. Miles.2001. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*. 122: 393-403.

Mazza, G.; Whiting, A.H.; Day, M.J. & W.P.H. Duffus. 1994 Development of an enzyme-likend immunosobent assay for the detection of IgG subclasses in the serum of normal and diseased dogs. *Res. Vet. Sci*. 57: 133-139.

Mc Conville, M.J.; Truco, S.J.; Ferguson, M.A. & D.L. Sacks.1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO. J*. 11(10): 3593-600.

Mc Kenzi, G.J., Emson, C.L., Bell, S.L., Anderson, S., Fallon, P., Zurawski, G., Murray, R., Grecnis, R. & A.N.J. McKenzie. 1998. Impaired development of TH2 cell in IL-13- deficient mice. *Immunity*. 9: 420-426.

Mendonca, S. C. F., de Luca, P. M., Mayrink, W., Restom, T. G., Conceicao-Silva, F., Da Cruz, A. M., Bertho, A. L., Da Costa, C. A., Genaro, O., Toledo, V. P. C. P. & S. G. Coutinho. 1995. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 53: 195-201.

Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermott, D.F., Finkelman, F.D. & H.W. Murray. 1994 Th1 and Th2 cell-associated cytoquines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun*. 62 (3): 1058-1063.

Miro, G. & C. Fraire.1999. Leishmaniosis canina revisión práctica. *Consulta*. 7(56): 63-74.

Molina, R. 1991. Laboratory adaptation of an autochtonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res. Rev. Parasitol*. 51: 87-89.

Molina, R. 1994. Capacidad vectorial de una colonia de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 en la leishmaniosis visceral. Tesis Doctoral. Facultad de Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San Andrés, M., Gonzalez, F., Castillo, J.A., Lucientes, J. & J. Alvar. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* 88 (4): 491-493.
- Molina, R. & J. Alvar. 1996. A simple protocol for the indirect xenodiagnosis of *Leishmania infantum* in the blood of HIV-infected patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 6: 639-640.
- Molyneux, D.H. & R. Killick-Kendrick. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles, En: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol.I. Peters W y Killick-Kendrick (Academic Press) London pp: 121-176.
- Molyneux, D.H. & R.W. Ashford. 1983. *The biology of the Trypanosoma and Leishmania*, En: *parasites of man and domestic animals*. Ed. Taylor and Francis. New York.p: 294.
- Morales, G., Carrillo, G., Requena, J.M., Guzmán, F., Gómez, L.C., Patarroyo, M.E. & C. Alonso. 1997. Mapping of antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during visceral leishmaniasis. *Prasitology*, 114: 507-516.
- Morris, L., Troutt, A. B., Handman, E. & A. Kelso. 1992. Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN- γ secreting CD4+ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 149: 2715-2721.
- Morris. L., Troutt, A. B., McLeod, K. S., KeJso, A., Handman, E. & T. Aebischer. 1993. Interleukin-4 but not interferon- γ production correlates with the severity of disease in murine cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 61: 3459-3465.
- Mosmann, T.R. & R.L. Coffman. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46: 111-147.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T-cell clone and definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
- Murray, H.W., Masur, H. & J.S. Keithly. 1982. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *J. Immunol.* 129: 344-350.
- Murray, H.W., Spitalny, G.W. & C.F. Nathan. 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J. Immunol.* 134: 1619-1622.

Murray, H.W., Stern, J.J., Welte, K., Rubin, B.Y., Carreiro, S.M. & C.F. Nathan. 1987. Experimental visceral leishmaniasis: production of Interleukin-2 and interferon- γ , tissue immune reaction and response to treatment with interleukin-2 and interferon- γ . *J. Immunol.* 138: 2290-2297.

Murray, H.W. 1990. Gamma interferon, cytokine induced macrophage activation, and antimicrobial host defense: in vitro, in animal models, and in humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 411-421.

Murray, H.W. 1990a. Effect of continuous administration of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 161: 992-994.

Murray, H.W. 1994. Interferon-gamma in host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am. J. Med.* 97: 459-467.

Murray, H.W. & J. Hariprasad. 1995. Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: Experimental visceral leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 181: 387-391.

Nacy, C.A. & S.M. Meltzer. 1991. T-cell-mediated activation of macrophages. *Current Opinion in Immunology.* 3: 330-335.

Narumi, S., Finke, J.H. & T.A. Hamilton. 1990. Interferon gamma and Interleukin 2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 265: 7036-7041.

Neogy, A.B., Vouldoukis, I., O.A, Silva., Tselentis, Y., Lascombe, J.C., Segalen, T., Rzepka, D. y L. Monjour. 1992. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47(6): 772-777

Nikaido, T., Shimizu, A., Ishida, N., Sabe, H., Teshigawara, K. & M. Maedo. 1984. Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature*, 311: 631-635.

Noormohammadi, A.H., Hochrein, H., Curtis, J.M., Baldwin, T.M. & E. Handman. 2001. Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen. *Vaccine*, 19(28-29): 4043-4052.

Noyes, H.A., Belli, A.A. & R. Maingon. 1996. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA - polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55(1): 98-105.

Noyes, H.A.; Reybun, H.; Bailey, J.W. & D. Smith. 1998. A Nested-PCR based Schizodeme method for identifying Leishmania Kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of epidemiology of Leishmania tropica in pakistan. J. Clin. Microbiol. 36(10): 2877-2881.

Oliveira, G.G.S., Santoro, F. & M. Sadigursky. 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dog. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 88: 243-248.

Oskam, L., Nieuwenhuijs, J.L. y A.Hailu. 1999. Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-leishmania antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93:275-277.

Osman, O.F., Oskam, L., Zijlstra, E. E., El-Hassan, A. M., El-Naeim, D. A. & P. A.. Kager. 1998. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92: 397-400.

Ozbel, Y., Oskam, L., Ozensoy, S., Turgay, N. Alkan, M. Z., Jaffe, C. L. & M. A. Ozcel. 2000. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. Acta Tropica, 74: 1-6.

Pace, J. L., Russell, S. W., Torres, B. A., Johnson, H. M. & P. W. Gray. 1983. Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. J. Immunol. 130: 2011-2013.

Park, A. Y. & P. Scott. 2001. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. Scand J Immunol. 53(6): 529-32.

Parrot, L., Donatien, A. & F. Lestoquard. 1930. Sur le développement du parasite de la leishmaniose canine viscérale chez Phlebotomus major var. Perniciosus Newstead. Bull. Soc. Pathol. Exot. 23: 724-725.

Pearson, R.D., Wheeler, D.A., Harrison, L.H. & H.D. Kay. 1983. The immunobiology of Leishmaniasis. En: Reviews of infection diseases. (University of Chicago) Vol.5 (5). pp: 907-927.

Peters, W. & R. Killick-Kendrick. 1987. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. En: Vol I y II (Ed) Academic Press, New York, pp.941

Pinelli, E., Gebhard, D., Mommaas, A.M., van Hoeij, M., Langermans, J.A., Ruitenber, E.J. & V.P. Rutten. 2000. Infection of canine macrophage cell with Leishmania infantum: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. Vet. Parasitol. 92(3): 181-189.

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J. Bernadina, W., Del Real, G. & J. Ruitenberg. 1994. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally infected With *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62: 229-235

Pinelli, E., Victor, P.M. Rutten, G. & E. J. Ruitenberg. 1999. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. En: *Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum*. Barcelona, Spain. pp.60-64.

Piramez, C.; Trajano, V.; Paes-Olivera, M.N.; Cruz, A.M.; Goncalves, S.C.; Catanho, M.; Degrave, W. & O. Fernandes. 1999. Use of PCR in Diagnosis of Human American Tegumentary Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 37(6): 1819-1823.

Portús, M. 1987. Diagnóstico de la leishmaniosis canina. EXPOAVIGA 87. Jornadas técnicas sobre pequeños animales.

Powrie, F.; Menon, S. & R.L. Coffman. 1993. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* 23 (9): 2223-2229.

Preston, P. M. & D. C. Dumonde. 1976. Experimental cutaneous leishmaniasis. V Protective immunity in subclinical and selfhealing infection in the mouse. *Clin. Exp Immunol.* 23:126-138.

Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A. & Larraga, V. 2003. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine.* 21(19-20): 2474-84.

Ramiro, M.J. 2003. Diferencias en la protección frente a la leishmaniasis canina mediante la inmunización homóloga/heteróloga con vehículos recombinantes que expresan el antígeno LACK. Tesis Doctoral, Madrid. Universidad Complutense de Madrid.

Rao, C.M. Salotra, P. & K. Datta. 1999. Possible role the 34-Kilodalton hyaluronic acid-binding protein in visceral Leishmaniasis. *J. Parasitol.* 85(4): 682-687.

Reed, S. G. & P. Scott. 1993. T cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology*, 5: 524-531.

Reiner, N.E. & J.H. Finke. 1983. Interleukin 2 deficiency in murine *Leishmania donovani* and its relationship to depressed spleen cell responses to phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 131: 1487-1491.

Reithinger, R. Teodoro, U. & C.R. Davies. 2001. Topical insecticide treatment to protect dogs from sand fly vectors of Leishmaniasis. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (5): 872-876.

Requena, J.M., Soto, M., Doria, M.D. & A. Alonso. 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet. Immunol.Immunopathol.* 76:269-281

Rhalem, A., Sahibi, H., Guessous-Idrissi, N., Lasri, S., Natami, A., Riyad, M. & B. Berrag. 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 81:173-184.

Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S. & C.L. Jaffe. 1999a. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71: 69-76.

Rioux, J.L., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes.Suggestion for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum Comp.* 65(3): 111-125.

Rizzo, L. V., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. & R. R. Caspi. 1995. Regulation of the interaction between Th1 and Th2 T cell clones to provide help for antibody production in vitro. *Eur. J. Immunol.* 25: 708-716.

Rodgers, M.R. Popper, S.J. & D.F. Wirth. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 71: 267-275.

Rodríguez Sosa, M., Rosas, L. E., Mc Kenezie, A. N. J. and A. R. Satoskar. 2001. IL-13 gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *L. mexicana* infection. *Eur. J. Immunol.* 31:3255-3260.

Rodríguez, N., Aguilar, C.M., Barrios, M.A. & C.D. Barker.1999 Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.* 93: 47-49.

Roura, X., Sánchez, A. & L. Ferrer. 1999. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet. Rec.* 144: 262-264.

Sacks, D.L. Modi, G. Rowton, E. Spath, G. Epstein L. Turco, S.J. & S.M. Beverley. 2000. The role of phosphoglycan in *Leishmania*-sand fly interactins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 4: 406-411.

- Sadick, M.D., Locksley, R.M., Tubbs, C. & H.V. Raff. 1986. Murine cutaneous leishmaniasis resistance correlates with the capacity to generate interferon-gamma in response to *Leishmania* antigens in vitro. *J. Immunol.* 136: 655-661.
- Scott, P. 1993. IL-12: Initiation Cytokine for Cell-Mediated Immunity. *Science*, 260: 496-497.
- Shreffler, W. G., Burns, J.J, Badaro, R., Ghalib, H.W., Button, L.L. McMaster, W.R. & S. G. Reed.1993. Antibody response of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J. Infect. Dis.* 167: 426-430.
- Simpson, C. F. Harvey, J. W. & T.W. French. 1982. Ultrastructure of amastigotes of *Leishmania donovani* in the bone marrow of a dog. *American Journal of Veterinary Reserch.* 43: 1684-1686.
- Slappendel, R.J. & C.E. Green. 1990. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* En: Ed. C.E. Green. Philadelphia, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA 19106,pp.769-777.
- Slappendel, R.J. 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 10(1): 1-17.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J. & Ferrer, L. 2000. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 90(1-2): 37-45.
- Solano Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. & L. Ferrer. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39(2): 560-563.
- Solano Gallego, Llull, J., Arboix, M., Ferrer, L. & J. Alberola. 2001a. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 102: 163-166.
- Solbach, W. & T. Laskay. 2000. The host response to Leishmania infection. *Adv. Immunol.* 74: 275-317.
- Stauber, L. A. 1966. The origin and significance of the distribution of parasites in visceral leishmaniasis. *Trans. New York Acad. Sci.* 28: 635-643.
- Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E., Subramanyam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., R.G. Schwab. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 177: 1797-1802.

- Tone, M., Thompson, S. A. J., Tone, Y., Fairchil, P. J. & H. Waldmann. 1997. Regulation of IL-18 (IFN γ - inducing factor) gene expression. *J. Immunol.* 159: 6156-6163.
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L. & F.W. Jennings. 1996. *Veterinary Parasitology*. En: Ed. Blackwell Science. pp. 218-220.
- Uzonna, J. E. & P. A. Bretscher. 2001. Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Eur. J. Immunol.* 31: 3175-3184.
- Valladares, J. E., Riera, C., Pastor, J., Gállego, M., Portús, M. & M. Arboix. 1997. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 141: 574-575.
- Varela, F. & J. E. Valladares. 1997. Respuesta inmunitaria en la Leishmaniosis canina. *Canis et Felis*, 29: 21-30.
- Vieth, M., Will, A., Schröppel, K., Röllinghoff, M. & A. Gessner. 1994. Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Scand. J. Immunol.* 40: 403-409.
- Ward, R. D. & P. A. Ready. 1975. Chronic sculpturing in some sandfly eggs (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 50: 127-134.
- Ward, R. D. 1985. *Vector biology and Control: Leishmaniasis*. En: Chang, K.P. Bray, R.S. (Ed) Elsevier, Amsterdam. pp. 199-212.
- Warren, M. K. & S. N. Vogel. 1985. Opposing effects of glucocorticoids on interferon-gamma-induced murine macrophage Fc receptor and Ia antigen expression. *J. Immunol.* 134: 2462-2469.
- WHO. 1990. *Control of Leishmaniasis. Report of WHO expert comitee. Technical report series 793.* WHO, Geneva.
- WHO. 1996. *Manual on Visceral Leishmaniasis Control. WHO/LEISH/96.40, Geneva.* pp. 51-70.
- Wynn, T. A., Houn, J. E., Oswald, I. P., Cheever, A. W. & A. Sher. 1994. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and endogenous IL-12 both inhibits and immuizes against egg pathology. *J. Exp. Med.* 179: 1551-1561.

Yamakami, K., Akao, S., Sato, M., Nitta, Y., Miyazaki, J. & T. Tadakuma. 2001. A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing interleukin-12 protects BALB/c mice from *Leishmania major* infection. *Parasitol. Int.* 50(2): 81-91

Zárate, J.J. 2002. Papel protector del antígeno P36/LACK frente a la infección experimental por *Leishmania infantum*. Evaluación clínico diagnóstica. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

Zárate, J.J., Castillo, J.A. Blasco, J.C., Cortés, Y., Sáenz de Buruaga, M., Gortázar, C., Fernández de Luco, D. & J. Lucientes. 2000. Serological study of Leishmaniasis (*Leishmania* spp.) in Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). En: 4^{to} Meeting of European Wildlife Disease Association. (Abstr) p:66.

Zijlstra, E. El-Hassan, A. Ismael, A. & H. W. Ghalib. 1994. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 826-836.

Zimmerman, J. H. Newson, H. D. Hooper, G.R. & H. A. Christensen. 1977. A comparison of eggs surface structure of six anthropophilic phlebotomine sand flies (*Lutzomyia*) with scanning electron microscope. *J. Med. Entomol.* 13: 574-579.

Zurwaski, G. & J. E. De Vries. 1994. Interleukin 13, an interleukin-4 like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cell. *Immunol. Today*, 15: 19-26.

2.- Prolactina, domperidona y pruebas complementarias

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pober, J.S. 2002. Inmunología celular y molecular. Cuarta Edición. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid.

Abdel-Meguid, S. S., Shieh, H. S., Smith, W. W., Dayringer, H. E., Violand, B. N. & Bentle, L. A. 1987. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(18): 6434-7.

Abkowitz, J. L., Schaison, G., Boulad, F., Brown, D. L., Buchanan, G. R., Johnson, C. A., Murray, J. C. & Sabo, K. M. 2002. Response of Diamond-Blackfan anemia to metoclopramide: evidence for a role for prolactin in erythropoiesis. *Blood.* 100(8): 2687-91.

Agnati, L. F., Fuxe, K., Giardino, L., Calza, L., Zoli, M., Battistini, N., Benfenati, F., Vanderhaeghen, J. J., Guidolin, D., Ruggeri, M. & et al. 1985. Evidence for cholecystokinin-dopamine receptor interactions in the central nervous system of the adult and old rat. Studies on their functional meaning. *Ann N Y Acad Sci.* 448(315-33).

Angele, M. K., Schwacha, M. G., Ayala, A. & Chaudry, I. H. 2000. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock.* 14(2): 81-90.

Anisman, H., Baines, M. G., Berczi, I., Bernstein, C. N., Blennerhassett, M. G., Gorczynski, R. M., Greenberg, A. H., Kisil, F. T., Mathison, R. D., Nagy, E., Nance, D. M., Perdue, M. H., Pomerantz, D. K., Sabbadini, E. R., Stanisz, A. & Warrington, R. J. 1996. Neuroimmune mechanisms in health and disease: 2. Disease. *Cmaj.* 155(8): 1075-82.

Anisman, H., Baines, M. G., Berczi, I., Bernstein, C. N., Blennerhassett, M. G., Gorczynski, R. M., Greenberg, A. H., Kisil, F. T., Mathison, R. D., Nagy, E., Nance, D. M., Perdue, M. H., Pomerantz, D. K., Sabbadini, E. R., Stanisz, A. & Warrington, R. J. 1996. Neuroimmune mechanisms in health and disease: 1. Health. *Cmaj.* 155(7): 867-74.

Arbogast, L. A. & Voogt, J. L. 1993. Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology.* 58(5): 501-10.

Arey, B. J., Kanyicska, B. & Freeman, M. E. 1991. The endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion is present in the lactating rat. *Neuroendocrinology.* 53(1): 35-40.

Arey, B. J. & Freeman, M. E. 1992. Activity of vasoactive intestinal peptide and serotonin in the paraventricular nucleus reflects the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology.* 131(2): 736-42.

Arkins, S., Dantzer, R. & Kelley, K. W. 1993. Somatolactogens, somatomedins, and immunity. *J Dairy Sci.* 76(8): 2437-50.

Ashburn, P., Cooper, M. R., McCall, C. E. & DeChatelet, L. R. 1973. Nitroblue tetrazolium reduction. False positive and false negative results. *Blood.* 41(6): 921-5.

Arslan, M., Pohl, C. R., Smith, M. S. & Plant, T. M. 1992. Studies of the role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in the hypothalamic control of prolactin secretion. *Life Sci.* 50(4): 295-300.

Asakura, A. (2003) Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med* 13,123-8

Atanackovic, D., Brunner-Weinzierl, M. C., Kroger, H., Serke, S. & Deter, H. C. 2002. Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species. *Immunol Invest.* 31(2): 73-91.

Auchtung, T. L., Kendall, P. E., Salak-Johnson, J. L., McFadden, T. B. & Dahl, G. E. 2003. Photoperiod and bromocriptine treatment effects on expression of prolactin receptor mRNA in bovine liver, mammary gland and peripheral blood lymphocytes. *J Endocrinol.* 179(3): 347-356.

Aylsworth, C. F., Hodson, C. A., Berg, G., Kledzik, G. & Meites, J. 1979. Role of adrenals and estrogen in regression of mammary tumors during postpartum lactation in the rat. *Cancer Res.* 39(7 Pt 1): 2436-9.

Baehner, R. L. & Nathan, D. G. 1967. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science.* 155(764): 835-6.

Baker, B. L. & Gross, D. S. 1978. Cytology and distribution of secretory cell types in the mouse hypophysis as demonstrated with immunocytochemistry. *Am J Anat.* 153(2): 193-215.

Bauernhofer, T., Kuss, I., Friebe-Hoffmann, U., Baum, A. S., Dworacki, G., Vonderhaar, B. K. & Whiteside, T. L. 2003. Role of prolactin receptor and CD25 in protection of circulating T lymphocytes from apoptosis in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 88(8): 1301-9.

Bellone, G., Astarita, P., Artusio, E., Silvestri, S., Mareschi, K., Turletti, A., Buttiglieri, S., Emanuelli, G. & Matera, L. 1997. Bone marrow stroma-derived prolactin is involved in basal and platelet-activating factor-stimulated in vitro erythropoiesis. *Blood.* 90(1): 21-7.

Ben-Jonathan, N. 1985. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev.* 6(4): 564-89.

- Berczi, I., Baragar, F. D., Chalmers, I. M., Keystone, E. C., Nagy, E. & Warrington, R. J. 1993. Hormones in self tolerance and autoimmunity: a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Autoimmunity*. 16(1): 45-56.
- Berczi, I. 1994. The role of the growth and lactogenic hormone family in immune function. *Neuroimmunomodulation*. 1(4): 201-16.
- Berczi, I., Bertok, L. & Chow, D. A. 2000. Natural immunity and neuroimmune host defense. *Ann N Y Acad Sci*. 917(248-57).
- Bern, H. A. & Nicoll, C. S. 1968. The comparative endocrinology of prolactin. *Recent Prog Horm Res*. 24(681-720).
- 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.
- Bewley, T. A. & Li, C. H. 1972. Circular dichroism studies on human pituitary growth hormone and ovine pituitary lactogenic hormone. *Biochemistry*. 11(5): 884-8.
- Biesiada, L., Krasomski, G. & Tchorzewski, H. 2001. [Current opinions on immunological processes in rheumatoid arthritis during pregnancy]. *Pol Merkuriusz Lek*. 10(60): 477-9.
- Biswas, R. & Chattopadhyay, U. 1992. Altered prolactin response of the lymphocytes of tumor-bearing mice. *Int J Cancer*. 50(1): 93-8.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. & Kelly, P. A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 19(3): 225-68.
- Bottai, D. (2003) Neural stem cells: plasticity and therapeutic potential. *J Neurochem*. 85,13
- Bouchard, B., Ormandy, C. J., Di Santo, J. P. & Kelly, P. A. 1999. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J Immunol*. 163(2): 576-82.
- Boulay, J. L. & Paul, W. E. 1992. The interleukin-4-related lymphokines and their binding to hematopoietin receptors. *J Biol Chem*. 267(29): 20525-8.
- Brand, J. M., Schmucker, P., Breidhardt, T. & Kirchner, H. 2001. Upregulation of IFN-gamma and soluble interleukin-2 receptor release and altered serum cortisol and prolactin concentration during general anesthesia. *J Interferon Cytokine Res*. 21(10): 793-6.

Brann, D. W., Bhat, G. K., Lamar, C. A. & Mahesh, V. B. 1997. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*. 65(6): 385-95.

Brann, D. W. & Mahesh, V. B. 1997. Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev*. 18(5): 678-700.

Breidthardt, T., Frohn, C., Luhm, J., Kirchner, H. & Brand, J. M. 2002. Prolactin induces enhanced interferon gamma release in peripheral whole blood after stimulation with either PHA or LPS. *Immunobiology*. 206(4): 424-31.

Bridges, R. S., Numan, M., Ronsheim, P. M., Mann, P. E. & Lupini, C. E. 1990. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(20): 8003-7.

Brisken, C., Kaur, S., Chavarria, T. E., Binart, N., Sutherland, R. L., Weinberg, R. A., Kelly, P. A. & Ormandy, C. J. 1999. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol*. 210(1): 96-106.

Bruce, H. M. 1966. Smell as an exteroceptive factor. *J Anim Sci*. 25 Suppl(83-9).

Brunetti, L., Ragazzoni, E., Preziosi, P. & Vacca, M. 1995. A possible role for nitric oxide but not for prostaglandin E2 in basal and interleukin-1-beta-induced PRL release in vitro. *Life Sci*. 56(15): PL277-83.

Buckley, A. R. & Buckley, D. J. 2000. Prolactin regulation of apoptosis-associated gene expression in T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 917(522-33).

Buskila, D., Sukenik, S. & Shoenfeld, Y. 1991. The possible role of prolactin in autoimmunity. *Am J Reprod Immunol*. 26(3): 118-23.

Buskila, D. & Shoenfeld, Y. 1996. Prolactin, bromocriptine and autoimmune diseases. *Isr J Med Sci*. 32(1): 23-7.

Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J. C., Rodrigues, M. & Cabral, M. 1998. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol*. 79(3): 213-20.

Caron, M. G., Beaulieu, M., Raymond, V., Gagne, B., Drouin, J., Lefkowitz, R. J. & Labrie, F. 1978. Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. Correlation of [³H]dihydroergocryptine binding with the dopaminergic control of prolactin release. *J Biol Chem*. 253(7): 2244-53.

- Carter-Su, C. & Smit, L. S. 1998. Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. *Recent Prog Horm Res.* 53(61-82; discussion 82-3).
- Castanon, N., Dulluc, J., le Moal, M. & Mormede, P. 1992. Prolactin as a link between behavioral and immune differences between the Roman rat lines. *Physiol Behav.* 51(6): 1235-41.
- 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(1): 67-75.
- Cesario, T. C., Yousefi, S., Carandang, G., Sadati, N., Le, J. & Vaziri, N. 1994. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 205(1): 89-95.
- Chabot, J. G., Enjalbert, A., Pelletier, G., Dubois, P. M. & Morel, G. 1988. Evidence for a direct action of neuropeptide Y in the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology.* 47(6): 511-7.
- Chakraborty, A., Chakraborty, N. G. & Chattopadhyay, U. 1996. Prolactin response of NK cells, but not of LAK cells, is deficient in patients with carcinoma of oral cavity and during aging. *Int J Cancer.* 66(1): 65-9.
- Chartier, C., Hoste, H., Bouquet, W., Malpoux, B., Pors, I. & Koch, C. 1998. Periparturient rise in fecal egg counts associated with prolactin concentration increase in French Alpine dairy goats. *Parasitol Res.* 84(10): 806-10.
- Chen, C. L. & Meites, J. 1970. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 86(3): 503-5.
- Chen, Y. & Johnson, A. G. 1993. In vivo activation of macrophages by prolactin from young and aging mice. *Int J Immunopharmacol.* 15(1): 39-45.
- Chikanza, I. C. 1999. Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Ann N Y Acad Sci.* 876(119-30).
- Chikanza, I. C. 2002. Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform. *Ann N Y Acad Sci.* 966(39-48).
- Cincotta, A. H. & Meier, A. H. 1989. Reductions of body fat stores and total plasma cholesterol and triglyceride concentrations in several species by bromocriptine treatment. *Life Sci.* 45(23): 2247-54.

Cincotta, A. H., Knisely, T. L., Landry, R. J., Miers, W. R., Gutierrez, P. J., Esperanza, P. & Meier, A. H. 1995. The immunoregulatory effects of prolactin in mice are time of day dependent. *Endocrinology*. 136(5): 2163-71.

Clevenger, C. V., Russell, D. H., Appasamy, P. M. & Prystowsky, M. B. 1990. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(16): 6460-4.

Compton, C. C., Rizk, I., Regauer, S., Burd, E., Holaday, J. & Kenner, J. 1994. The effect of bromocryptine-induced hypoprolactinemia on xenogeneic and allogeneic skin graft survival in a mouse model. *J Burn Care Rehabil*. 15(5): 393-400.

Cooke, N. E., Coit, D., Weiner, R. I., Baxter, J. D. & Martial, J. A. 1980. Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *J Biol Chem*. 255(13): 6502-10.

Cooke, N. E., Coit, D., Shine, J., Baxter, J. D. & Martial, J. A. 1981. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem*. 256(8): 4007-16.

Coppola, J. A., Leonardi, R. G., Lippmann, W., Perrine, J. W. & Ringler, I. 1965. Induction of pseudopregnancy in rats by depletors of endogenous catecholamines. *Endocrinology*. 77(3): 485-90.

Creese, I., Schneider, R. & Snyder, S. H. 1977. 3H-Spiroperidol labels dopamine receptors in pituitary and brain. *Eur J Pharmacol*. 46(4): 377-81.

Crumevolle-Arias, M., Latouche, J., Jammes, H., Djiane, J., Kelly, P. A., Reymond, M. J. & Haour, F. 1993. Prolactin receptors in the rat hypothalamus: autoradiographic localization and characterization. *Neuroendocrinology*. 57(3): 457-66.

Cunha-Filho, J. S., Gross, J. L., Vettori, D., Dias, E. C. & Passos, E. P. 2001. Growth hormone and prolactin secretion after metoclopramide administration (DA2 receptor blockade) in fertile women. *Horm Metab Res*. 33(9): 536-9.

Dardenne, M., de Moraes Mdo, C., Kelly, P. A. & Gagnerault, M. C. 1994. Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytofluorometry. *Endocrinology*. 134(5): 2108-14.

Dardenne, M. & Savino, W. 1996. Interdependence of the endocrine and immune systems. *Adv Neuroimmunol*. 6(4): 297-307.

De Luna, R., Vuotto, M. L., Ielpo, M. T., Ambrosio, R., Piantedosi, D., Moscatiello, V., Ciaramella, P., Scalone, A., Gradoni, L. & Mancino, D. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 70(1-2): 95-103.

De Paul, A. L., Pons, P., Aoki, A. & Torres, A. I. 1997. Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochem.* 99(3): 277-89.

Devins, S. S., Miller, A., Herndon, B. L., O'Toole, L. & Reisz, G. 1992. Effects of dopamine on T-lymphocyte proliferative responses and serum prolactin concentrations in critically ill patients. *Crit Care Med.* 20(12): 1644-9.

DeVito, W. J. 1988. Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocrinology.* 47(4): 284-9.

Di Carlo, R. & Meli, R. 1991. Interactions between prolactin and immune processes. *Acta Neurol (Napoli).* 13(4): 380-5.

Di Carlo, R., Meli, R., Romano Carratelli, C., Galdiero, M., Nuzzo, I. & Bentivoglio, C. 1992. Interference of prolactin on some processes of nonspecific immunity. *Pharmacol Res.* 26 Suppl 2(32-3).

Di Carlo, R., Meli, R., Galdiero, M., Nuzzo, I., Bentivoglio, C. & Carratelli, C. R. 1993. Prolactin protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. *Life Sci.* 53(12): 981-9.

Dijkstra, C. D., van der Voort, E. R., De Groot, C. J., Huitinga, I., Uitdehaag, B. M., Polman, C. H. & Berkenbosch, F. 1994. Therapeutic effect of the D2-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Psychoneuroendocrinology.* 19(2): 135-42.

DiMattia, G. E., Gellersen, B., Bohnet, H. G. & Friesen, H. G. 1988. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology.* 122(6): 2508-17.

Dingledine, R., Myers, S. J. & Nicholas, R. A. 1990. Molecular biology of mammalian amino acid receptors. *Faseb J.* 4(9): 2636-45.

Dorshkind, K. & Horseman, N. D. 2000. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr Rev.* 21(3): 292-312.

- Draca, S. 1995. Prolactin as an immunoreactive agent. *Immunol Cell Biol.* 73(6): 481-3.
- Draca, S. & Levic, Z. 1996. The possible role of prolactin in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Med Hypotheses.* 47(2): 89-92.
- Dulchin, M. C., Oquendo, M. A., Malone, K. M., Ellis, S. P., Li, S. & Mann, J. J. 2001. Prolactin response to dl-fenfluramine challenge before and after treatment with paroxetine. *Neuropsychopharmacology.* 25(3): 395-401.
- Duran Chavez, C. & Diaz Cristerna, A. 1993. [Endocrine regulation of the immune response. Prolactin and its function]. *Rev Alerg.* 40(2): 27-32.
- Dutt, A., Kaplitt, M. G., Kow, L. M. & Pfaff, D. W. 1994. Prolactin, central nervous system and behavior: a critical review. *Neuroendocrinology.* 59(5): 413-9.
- Duvilanski, B. H., Zambruno, C., Seilicovich, A., Pisera, D., Lasaga, M., Diaz, M. C., Belova, N., Rettori, V. & McCann, S. M. 1995. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(1): 170-4.
- Edwards, C. K., 3rd, Ghiasuddin, S. M., Yungler, L. M., Lorence, R. M., Arkins, S., Dantzer, R. & Kelley, K. W. 1992. In vivo administration of recombinant growth hormone or gamma interferon activities macrophages: enhanced resistance to experimental *Salmonella typhimurium* infection is correlated with generation of reactive oxygen intermediates. *Infect Immun.* 60(6): 2514-21.
- Elbourne, K. B., Keisler, D. & McMurray, R. W. 1998. Differential effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 7(6): 420-7.
- Enjalbert, A., Ruberg, M., Arancibia, S., Fiore, L., Priam, M. & Kordon, C. 1979. Independent inhibition of prolactin secretion by dopamine and gamma-aminobutyric acid in vitro. *Endocrinology.* 105(3): 823-6.
- Fahim, A., Rettori, V. & McCann, S. M. 1990. The role of calcitonin gene-related peptide in the control of growth hormone and prolactin release. *Neuroendocrinology.* 51(6): 688-93.
- Falconer, I. R., Langley, J. V. & Vacek, A. T. 1983. Effect of prolactin on ⁸⁶Rb⁺ uptake, potassium content and [³H]ouabain binding of lactating rabbit mammary tissue. *J Physiol.* 334(1-17).
- Figuroa, F., Carrion, F., Gonzalez, G., Rivero, S., Arteaga, E. & Mamani, I. 1993. [Pharmacological modification of prolactinemia. Effects on cellular immune function in normal subjects]. *Rev Med Chil.* 121(9): 975-81.

- Figueroa, F., Carrion, F., Martinez, M. E., Rivero, S., Mamani, I. & Gonzalez, G. 1998. [Effects of bromocriptine in patients with active rheumatoid arthritis]. *Rev Med Chil.* 126(1): 33-41.
- Foster, M. P., Jensen, E. R., Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., Horseman, N. & Dorshkind, K. 2000. Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormone. *Clin Immunol.* 96(2): 140-9.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. & Nagy, G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80(4): 1523-631.
- Freemark, M., Nagano, M., Edery, M. & Kelly, P. A. 1995. Prolactin receptor gene expression in the fetal rat. *J Endocrinol.* 144(2): 285-92.
- Fuxe, K., Hokfelt, T., Eneroth, P., Gustafsson, J. A. & Skett, P. 1977. Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science.* 196(4292): 899-900.
- Gabay, M. P. 2002. Galactogogues: medications that induce lactation. *J Hum Lact.* 18(3): 274-9.
- Gala, R. R. 1990. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* 46(20): 1407-20.
- Gala, R. R. 1991. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med.* 198(1): 513-27.
- Gala, R. R. & Shevach, E. M. 1994. Evidence for the release of a prolactin-like substance by mouse lymphocytes and macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med.* 205(1): 12-9.
- Galli, M., Gervasoni, C., Ridolfo, A. L., Trabattoni, D., Santambrogio, S., Vaccarezza, M., Meroni, L., Trifiro, G., Moroni, M., Norbiato, G. & Clerici, M. 2003. Cytokine production in women with antiretroviral treatment-associated breast fat accumulation and limb wasting. *Aids.* 17 Suppl 1(S155-61).
- Gaytan, F., Romero, J. L., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C. & Aguilar, E. 1994. Effects of growth hormone and prolactin on testicular macrophages in long-term hypophysectomized rats. *J Reprod Immunol.* 27(1): 73-84.
- Gellersen, B., DiMattia, G. E., Friesen, H. G. & Bohnet, H. G. 1989. Phorbol ester stimulates prolactin release but reduces prolactin mRNA in the human B-lymphoblastoid cell line IM-9-P3. *Mol Cell Endocrinol.* 66(2): 153-61.

Gellersen, B., Bonhoff, A., Hunt, N. & Bohnet, H. G. 1991. Decidual-type prolactin expression by the human myometrium. *Endocrinology*. 129(1): 158-68.

Gerli, R., Rambotti, P., Nicoletti, I., Orlandi, S., Migliorati, G. & Riccardi, C. 1986. Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia. *Clin Exp Immunol*. 64(2): 399-406.

Giguere, V., Meunier, H., Veilleux, R. & Labrie, F. 1982. Direct effects of sex steroids on prolactin release at the anterior pituitary level: interactions with dopamine, thyrotropin-releasing hormone, and isobutylmethylxanthine. *Endocrinology*. 111(3): 857-62.

Giusti, M., Foppiani, L., Fazzuoli, L., Molinari, E., Guido, R., Valenti, S. & Giordano, G. 1999. [An increased prevalence of thyroid echographic and autoimmune changes in hyperprolactinemic women on therapy with dopaminergic drugs]. *Recenti Prog Med*. 90(3): 147-51.

Gobello, C., Bolognani, F., de la Sota, R.L., & Goya, R.G. 2001. Twenty-four hour profiles of serum prolactin and luteinizing hormone in anoestrous crossbred bitches. *Reprod Dom Anim*. 36: 41-45.

Goffin, V., Martial, J. A. & Summers, N. L. 1995. Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. *Protein Eng*. 8(12): 1215-31.

Goffin, V., Bouchard, B., Ormandy, C. J., Weimann, E., Ferrag, F., Touraine, P., Bole-Feysot, C., Maaskant, R. A., Clement-Lacroix, P., Edery, M., Binart, N. & Kelly, P. A. 1998. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann N Y Acad Sci*. 840(498-509).

Goffin, V., Binart, N., Clement-Lacroix, P., Bouchard, B., Bole-Feysot, C., Edery, M., Lucas, B. K., Touraine, P., Pezet, A., Maaskant, R., Pichard, C., Helloco, C., Baran, N., Favre, H., Bernichtein, S., Allamando, A., Ormandy, C. & Kelly, P. A. 1999. From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genet Anal*. 15(3-5): 189-201.

Gonzalez, M. C., Linares, J. D., Santos, M. & Llorente, E. 1996. Effects of nitric oxide donors sodium nitroprusside and 3-morpholino-sydnonimine on prolactin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett*. 203(3): 167-70.

Gorman, J. M., Warne, P. A., Begg, M. D., Cooper, T. B., Novacenko, H., Williams, J. B., Rabkin, J., Stern, Y. & Ehrhardt, A. A. 1992. Serum prolactin levels in homosexual and bisexual men with HIV infection. *Am J Psychiatry*. 149(3): 367-70.

Grandison, L. & Meites, J. 1976. Evidence for adrenergic mediation of cholinergic inhibition of prolactin release. *Endocrinology*. 99(3): 775-9.

Grattan, D. R. & Averill, R. L. 1991. Role of the placenta in the control of the ante-partum surge of prolactin in the rat. *J Endocrinol.* 130(3): 401-7.

Greenwald, G. S. 1967. Further observations on the luteotropic complex of the hamster. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 56(3): 281-91.

Gribaldo, L., Malerba, I., Collotta, A., Casati, S. & Pessina, A. 2000. Inhibition of CFU-E/BFU-E by 3'-azido-3'-deoxythymidine, chlorpropamide, and protoporphirin IX Zinc (II): A comparison between direct exposure of progenitor cells and long-term exposure of bone marrow cultures. *Toxicol Sci* 58: 96-101.

Grossman, C. 1989. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J Steroid Biochem.* 34(1-6): 241-51.

Grossman, C. J., Roselle, G. A. & Mendenhall, C. L. 1991. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40(4-6): 649-59.

Grosvenor, C. E. & Whitworth, N. S. 1983. Accumulation of prolactin by maternal milk and its transfer to circulation of neonatal rat--a review. *Endocrinol Exp.* 17(3-4): 271-82.

Gualillo, O., Lago, F., Garcia, M., Menendez, C., Senaris, R., Casanueva, F. F. & Dieguez, C. 1999. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology.* 140(11): 5149-53.

Guerineau, N., Drouhault, R., Corcuff, J. B., Vacher, A. M., Vilayleck, N. & Mollard, P. 1990. Galanin evokes a cytosolic calcium bursting mode and hormone release in GH3/B6 pituitary cells. *FEBS Lett.* 276(1-2): 111-4.

Gueron, E., Isakov, N. & el-On, J. 1993. *Leishmania major*: respiratory burst response of infected murine macrophages treated with paromomycin. *Exp Parasitol.* 76(4): 371-6.

Gushchin, G. V., Cheney, C., Glaser, R. & Malarkey, W. B. 1995. Temporal relationships and IL-2 dependency of prolactin-induced lymphocyte proliferation. *J Neuroimmunol.* 60(1-2): 93-8.

Gutierrez, M. A., Molina, J. F., Jara, L. J., Cuellar, M. L., Garcia, C., Gutierrez-Urena, S., Gharavi, A. & Espinoza, L. R. 1995. Prolactin and systemic lupus erythematosus: prolactin secretion by SLE lymphocytes and proliferative (autocrine) activity. *Lupus.* 4(5): 348-52.

Haskins, J. T., Gudelsky, G. A., Moss, R. L. & Porter, J. C. 1981. Iontophoresis of morphine into the arcuate nucleus: effects on dopamine concentrations in hypophysial portal plasma and serum prolactin concentrations. *Endocrinology.* 108(3): 767-71.

Heesen, C., Schulz, H., Schmidt, M., Gold, S., Tessmer, W. & Schulz, K. H. 2002. Endocrine and cytokine responses to acute psychological stress in multiple sclerosis. *Brain Behav Immun.* 16(3): 282-7.

Hiestand, P. C., Mekler, P., Nordmann, R., Grieder, A. & Permmongkol, C. 1986. Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(8): 2599-603.

Hill, J. B., Nagy, G. M. & Frawley, L. S. 1991. Suckling unmasks the stimulatory effect of dopamine on prolactin release: possible role for alpha-melanocyte-stimulating hormone as a mammatrope responsiveness factor. *Endocrinology.* 129(2): 843-7.

Hinterberger-Fischer, M. 2000. [Prolactin as pro-inflammatory cytokine--considerations on consolidated immunotherapy after high dosage therapy]. *Acta Med Austriaca.* 27 Suppl 52(16-20).

Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., Sekiguchi, M., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H. & Fujino, M. 1998. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature.* 393(6682): 272-6.

Ho, T. W., Greenan, J. R. & Walker, A. M. 1989. Mammatroph autoregulation: the differential roles of the 24K isoforms of prolactin. *Endocrinology.* 124(3): 1507-14.

Hooghe-Peters, E. L. & Hooghe, R. 1998. Introduction: hormones, blood cells and immunity, with special reference to prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Cell Mol Life Sci.* 54(10): 1057-8.

Horseman, N. D. & Yu-Lee, L. Y. 1994. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr Rev.* 15(5): 627-49.

Horseman, N. D., Zhao, W., Montecino-Rodriguez, E., Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S. J., Smith, F., Markoff, E. & Dorshkind, K. 1997. Defective mammatopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *Embo J.* 16(23): 6926-35.

Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L. & Spurlock, M. E. 1998. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci.* 76(5): 1405-20.

Hu, Z. Z. & Dufau, M. L. 1991. Multiple and differential regulation of ovarian prolactin receptor messenger RNAs and their expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 181(1): 219-25.

- Huhman, K. L., Mougey, E. H., Moore, T. O. & Meyerhoff, J. L. 1995. Stressors, including social conflict, decrease plasma prolactin in male golden hamsters. *Horm Behav.* 29(4): 581-92.
- Ibars, C. B., Rodriguez, A. B., Skwarlo-Sonta, K. & Lea, R. W. 1997. Mitogenic effect of naturally occurring elevated plasma prolactin on ring dove lymphocytes. *Dev Comp Immunol.* 21(1): 47-58.
- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B. & Silvennoinen, O. 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci.* 19(5): 222-7.
- Jara, L. J., Vera-Lastra, O., Miranda, J. M., Alcalá, M. & Alvarez-Nemegyei, J. 2001. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 10(10): 748-56.
- Jeffcoate, I. A., Fishwick, G., Bairden, K., Armour, J. & Holmes, P. H. 1990. Pathophysiology of the periparturient egg rise in sheep: the role of prolactin. *Res Vet Sci.* 48(3): 295-300.
- Jones, T. H. & Kennedy, R. L. 1993. Cytokines and hypothalamic-pituitary function. *Cytokine.* 5(6): 531-8.
- Kacsoh, B., Toth, B. E., Avery, L. M., Yamamuro, Y. & Grosvenor, C. E. 1991. Molecular heterogeneity of prolactin in lactating rats and their pups: biological and immunological activities in pituitary gland, serum and milk. *Endocr Regul.* 25(1-2): 98-110.
- Kadioglu, P., Acbay, O., Demir, G., Gazioglu, N. & Gundogdu, S. 2001. The effect of prolactin and bromocriptine on human peripheral immune status. *J Endocrinol Invest.* 24(3): 147-51.
- Kadowaki, J., Ku, N., Oetting, W. S. & Walker, A. M. 1984. Mammoth autoregulation: uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion. *Endocrinology.* 114(6): 2060-7.
- Kanyicska, B., Nguyen, D. N., Arey, B. J. & Freeman, M. E. 1990. Hysterectomy-induced alterations in prolactin secretion of lactating rats. *Endocrinology.* 126(4): 2021-6.
- Kanyicska, B., Burris, T. P. & Freeman, M. E. 1991. Endothelin-3 inhibits prolactin and stimulates LH, FSH and TSH secretion from pituitary cell culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 174(1): 338-43.
- Karabulut, A. K. & Pratten, M. K. 1998. Species-specificity of growth-promoting effects of prolactin during rat embryogenesis. *J Anat.* 192 (Pt 1)(1-12).

Kato, Y., Nakai, Y., Imura, H., Chihara, K. & Ogo, S. 1974. Effect of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) on plasma prolactin levels in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 38(4): 695-7.

Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R. & Thomson, J. A. 2001. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 10716-10721.

Keir, M., Fiddes, R., Biggs, J. C. & Kearney, P. P. 2000. Sensitivity of c-erbB positive cells to a ligand toxin and its utility in purging breast cancer cells from peripheral blood stem cell (PBSC) collections. *Stem Cells.* 18: 422-427.

Kelley, K. W., Arkins, S. & Li, Y. M. 1992. Growth hormone, prolactin, and insulin-like growth factors: new jobs for old players. *Brain Behav Immun.* 6(4): 317-26.

Kiess, W. & Belohradsky, B. H. 1986. Endocrine regulation of the immune system. *Klin Wochenschr.* 64(1): 1-7.

Kim, B. G. & Brooks, C. L. 1993. Isolation and characterization of phosphorylated bovine prolactin. *Biochem J.* 296 (Pt 1)(41-7.

Kim, T. W., Moon, H. B. & Kim, S. J. 2003. Interleukin-10 is up-regulated by prolactin and serum-starvation in cultured mammary epithelial cells. *Mol Cells.* 16(2): 168-72.

Kizer, J. S., Zivin, J. A., Jacobowitz, D. M. & Kopin, I. J. 1975. The nyctohemeral rhythm of plasma prolactin: effects of ganglionectomy, pinealectomy, constant light, constant darkness or 6-OH-dopamine administration. *Endocrinology.* 96(5): 1230-40.

Knigge, U., Matzen, S. & Warberg, J. 1990. Histamine as a neuroendocrine regulator of the stress-induced release of peripheral catecholamines. *Endocrinology.* 126(3): 1430-4.

Knoferl, M.W., Angele, M.K., Ayala, A., Cioffi, W.G., Bland, K.I. & Chaudry, I.H. 2000. *Am J Physiol Cell.* 279(1): 72-82.

Ko, J. Y., Ahn, Y. L. & Cho, B. N. 2003. Angiogenesis and white blood cell proliferation induced in mice by injection of a prolactin-expressing plasmid into muscle. *Mol Cells.* 15(2): 262-70.

Koller, M., Kotzmann, H., Clodi, M., Riedl, M. & Luger, A. 1997. Effect of elevated serum prolactin concentrations on the immunophenotype of human lymphocytes, mitogen-induced proliferation and phagocytic activity of polymorphonuclear cells. *Eur J Clin Invest.* 27(8): 662-6.

- Kooijman, R., Gerlo, S., Coppens, A. & Hooghe-Peters, E. L. 2000. Growth hormone and prolactin expression in the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 917(534-40).
- Lamberts, S. W. & MacLeod, R. M. 1978. The interaction of the serotonergic and dopaminergic systems on prolactin secretion in the rat. The mechanism of action of the "specific" serotonin receptor antagonist, methysergide. *Endocrinology.* 103(1): 287-95.
- LaRosee, P., Johnson, K., O'Dwyer, M. E. & Druker, B. J. 2002. In vitro studies of the combination of imatinib mesylate (Gleevec) and arsenic trioxide (Trisenox) in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 30: 729-737.
- Lavalle, C. 1991. Role of prolactin in autoimmune diseases and autoimmunity. *Br J Rheumatol.* 30(6): 476.
- Lavalle, C. 1992. Prolactin--a hormone with immunoregulatory properties that leads to new therapeutic approaches in rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 19(6): 839-41.
- Lawson, D. M. & Gala, R. R. 1975. The influence of adrenergic, dopaminergic, cholinergic and serotonergic drugs on plasma prolactin levels in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Endocrinology.* 96(2): 313-8.
- Leanos, A., Pascoe, D., Fraga, A. & Blanco-Favela, F. 1998. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. *Lupus.* 7(6): 398-403.
- Leanos Miranda, A., Quintal Alvarez, M. G., Cervera Castillo, H. & Blanco Favela, F. 1997. [Prolactin as an immunomodulator]. *Rev Alerg Mex.* 44(5): 116-23.
- Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P. A. & Djiane, J. 1991. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(3): 824-8.
- Li, C. H., Dixon, J. S., Lo, T. B., Schmidt, K. D. & Pankov, Y. A. 1970. Studies on pituitary lactogenic hormone. XXX. The primary structure of the sheep hormone. *Arch Biochem Biophys.* 141(2): 705-37.
- Li, C. H. 1976. Studies on pituitary lactogenic hormone. The primary structure of the porcine hormone. *Int J Pept Protein Res.* 8(2): 205-24.
- Lincoln, G. A. & Clarke, I. J. 1994. Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol.* 6(3): 251-60.

Lissoni, P., Rovelli, F., Tisi, E., Ardizzoia, A., Perlangeli, V., Barni, S. & Tancini, G. 1992. Endocrine effects of human recombinant interleukin-3 in cancer patients. *Int J Biol Markers*. 7(4): 230-3.

Loeffler, J. P., Kley, N., Pittius, C. W. & Holtt, V. 1985. gamma-Aminobutyric acid decreases levels of messenger ribonucleic acid encoding prolactin in the rat pituitary. *Neurosci Lett*. 53(1): 121-5.

Login, I. S. 1990. Direct stimulation of pituitary prolactin release by glutamate. *Life Sci*. 47(24): 2269-75.

Lucas, B. K., Ormandy, C. J., Binart, N., Bridges, R. S. & Kelly, P. A. 1998. Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*. 139(10): 4102-7.

Lulich, J.P. & Osborne, C.A. 1990. Interpretation of Urine Protein-Creatinine ratios in dogs with glomerular and non glomerular disorders. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet*. 12: 59-73.

Lyson, K. & McCann, S. M. 1991. The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology*. 54(3): 262-6.

Majumder, B., Biswas, R. & Chattopadhyay, U. 2002. Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *Int J Cancer*. 97(4): 493-500.

Mallinson, D. J. & Coombs, G. H. 1989. Interaction of leishmania metacyclics with macrophages. *Int J Parasitol*. 19(6): 647-56.

Mann, D. R., Akinbami, M. A., Gould, K. G. & Ansari, A. A. 2000. Seasonal variations in cytokine expression and cell-mediated immunity in male rhesus monkeys. *Cell Immunol*. 200(2): 105-15.

Maney, D. L., Hahn, T. P., Schoech, S. J., Sharp, P. J., Morton, M. L. & Wingfield, J. C. 1999. Effects of ambient temperature on photo-induced prolactin secretion in three subspecies of white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys*. *Gen Comp Endocrinol*. 113(3): 445-56.

Maney, D. L., Schoech, S. J., Sharp, P. J. & Wingfield, J. C. 1999. Effects of vasoactive intestinal peptide on plasma prolactin in passerines. *Gen Comp Endocrinol*. 113(3): 323-30.

Mann, D. R., Akinbami, M. A., Gould, K. G. & Ansari, A. A. 2000. Seasonal variations in cytokine expression and cell-mediated immunity in male rhesus monkeys. *Cell Immunol*. 200(2): 105-15.

- Martinelli, G. P., Liu, H., Clarke, W. P., Heisenleder, D. J. & Knight, R. J. 1996. Prolactin suppression enhances the effects of perioperative donor-specific blood transfusions on graft survival. *J Surg Res.* 64(2): 190-7.
- Maslar, I. A. & Ansbacher, R. 1986. Effects of progesterone on decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium. *Endocrinology.* 118(5): 2102-8.
- Matalaka, K. Z. 2003. Neuroendocrine and cytokines-induced responses to minutes, hours, and days of mental stress. *Neuroendocrinol Lett.* 24(5): 283-92.
- Matera, L., Ciccarelli, E., Cesano, A., Veglia, F., Miola, C. & Camanni, F. 1989. Natural killer activity in hyperprolactinemic patients. *Immunopharmacology.* 18(2): 143-6.
- Matera, L. 1997. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation.* 4(4): 171-80.
- Matera, L., Contarini, M., Bellone, G., Forno, B. & Biglino, A. 1999. Up-modulation of interferon-gamma mediates the enhancement of spontaneous cytotoxicity in prolactin-activated natural killer cells. *Immunology.* 98(3): 386-92.
- 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(1): 29-36.
- Matera, L. & 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).
- Matera, L., Mori, M., Geuna, M., Buttiglieri, S. & Palestro, G. 2000. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J Neuroimmunol.* 109(1): 47-55.
- Matera, L., Mori, M. & Galetto, A. 2001. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus.* 10(10): 728-34.
- Matsuyama, S., Chang, K. T., Kanuka, H., Ohnishi, M., Ikeda, A., Nishihara, M. & Takahashi, M. 1996. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol Reprod.* 54(6): 1245-51.
- McAveney, K. M., Gimble, J. M. & Yu-Lee, L. 1996. Prolactin receptor expression during adipocyte differentiation of bone marrow stroma. *Endocrinology.* 137(12): 5723-6.

McMurray, R., Keisler, D., Kanuckel, K., Izui, S. & Walker, S. E. 1991. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J Immunol.* 147(11): 3780-7.

McMurray, R. W. 2001. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacol.* 1(6): 995-1008.

McNeilly, A. S. 1997. Lactation and fertility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2(3): 291-8.

Melby, P. C., Tryon, V. V., Chandrasekar, B. & Freeman, G. L. (1998) Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66,2135-42.

Meli, R., Raso, G. M., Bentivoglio, C., Nuzzo, I., Galdiero, M. & Di Carlo, R. (1996). Recombinant human prolactin induces protection against *Salmonella typhimurium* infection in the mouse: role of nitric oxide. *Immunopharmacology.* 34(1): 1-7.

Meli, R., Bentivoglio, C., Nuzzo, I., Mattace Raso, G., Galdiero, E., Galdiero, M., Di Carlo, R. & Carratelli, C. R. 2003. Th(1)-Th(2) response in hyperprolactinemic mice infected with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Eur Cytokine Netw.* 14(3): 186-191.

Meltzer, H. Y., Maes, M. & Lee, M. A. 1993. The cimetidine-induced increase in prolactin secretion in schizophrenia: effect of clozapine. *Psychopharmacology (Berl).* 112(1 Suppl): S95-104.

Mena, F. & Grosvenor, C. E. 1968. Effect of number of pups upon suckling-induced fall in pituitary prolactin concentration and milk ejection in the rat. *Endocrinology.* 82(3): 623-6.

Mena, F. & Grosvenor, C. E. 1972. Effect of suckling and of exteroceptive stimulation upon prolactin release in the rat during late lactation. *J Endocrinol.* 52(1): 11-22.

Minami, S. & Sarkar, D. K. 1997. Transforming growth factor-beta 1 inhibits prolactin secretion and lactotropic cell proliferation in the pituitary of oestrogen-treated Fischer 344 rats. *Neurochem Int.* 30(4-5): 499-506.

Montero, A., Giovannoni, A. G. & Sen, L. 2000. [Immunological properties of prolactin]. *Medicina (B Aires).* 60(4): 515-20.

Montgomery, D. W., Zukoski, C. F., Shah, G. N., Buckley, A. R., Pacholczyk, T. & Russell, D. H. 1987. Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem Biophys Res Commun.* 145(2): 692-8.

- Morales, P., Carretero, M. V., Geronimo, H., Copin, S. G., Gaspar, M. L., Marcos, M. A. & Martin-Perez, J. 1999. Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell Growth Differ.* 10(8): 583-90.
- Morikawa, K., Oseko, F. & Morikawa, S. 1994. Immunosuppressive activity of bromocriptine on human T lymphocyte function in vitro. *Clin Exp Immunol.* 95(3): 514-8.
- Morishige, W. K. & Rothchild, I. 1974. Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology.* 95(1): 260-74.
- Murphy, W. J., Rui, H. & Longo, D. L. 1995. Effects of growth hormone and prolactin immune development and function. *Life Sci.* 57(1): 1-14.
- Murphy, W. J., Tsarfaty, G. & Longo, D. L. 1992. Growth hormone exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts the myelosuppressive effects of azidothymidine. *Blood.* 80(6): 1443-7.
- Nagano, M. & Kelly, P. A. 1994. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem.* 269(18): 13337-45.
- Nagy, G. & Halasz, B. 1983. Time course of the litter removal-induced depletion in plasma prolactin levels of lactating rats. An immediate full blockade of the hormone release after separation. *Neuroendocrinology.* 37(6): 459-62.
- Narnaware, Y. K., Kelly, S. P. & Woo, N. Y. 1998. Stimulation of macrophage phagocytosis and lymphocyte count by exogenous prolactin administration in silver sea bream (*Sparus sarba*) adapted to hyper- and hypo-osmotic salinities. *Vet Immunol Immunopathol.* 61(2-4): 387-91.
- Nasello, A. G., Vanzeler, M. L., Madureira, E. H. & Felicio, L. F. 1997. Effects of acute and long-term domperidone treatment on prolactin and gonadal hormone levels and sexual behavior of male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 58(4): 1089-94.
- Neidhart, M. 1998. Prolactin in autoimmune diseases. *Proc Soc Exp Biol Med.* 217(4): 408-19.
- Neill, J. D. 1972. Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology.* 90(5): 1154-9.
- Nelson, R. J. & Demas, G. E. 1996. Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol.* 71(4): 511-48.

Neurath, M.F., Finotto, S. & Glimcher, L.H. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med.* 8(6): 567-573.

Nevid, N. J. & Meier, A. H. 1995. Timed daily administrations of hormones and antagonists of neuroendocrine receptors alter day-night rhythms of allograft rejection in the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Gen Comp Endocrinol.* 97(3): 327-39.

Niall, H. D., Hogan, M. L., Sauer, R., Rosenblum, I. Y. & Greenwood, F. C. 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(4): 866-70.

Nickel, E. A., Schwacha, M. G., Schneider, C. P., Bland, K. I. & Chaudry, I. H. 2002. Trauma-haemorrhage-induced alterations in thymic prolactin receptor expression: implications in immune dysfunction. *Cytokine.* 18(3): 127-32.

Nicoletti, I., Gerli, R., Orlandi, S., Migliorati, G., Rambotti, P. & Riccardi, C. 1989. Defective natural killer cell activity in puerperal hyperprolactinemia. *J Reprod Immunol.* 15(2): 113-21.

Oberholtzer, E., Contarini, M., Veglia, F., Cossarizza, A., Franceschi, C., Geuna, M., Provinciali, M., Di Stefano, G., Sissom, J., Brizzi, M. F., Pegoraro, L. & Matera, L. 1996. Prolactin increases the susceptibility of primary leukemia cells to NK and LAK effectors. *Adv Neuroimmunol.* 6(3): 233-47.

O'Neal, K. D., Montgomery, D. W., Truong, T. M. & Yu-Lee, L. Y. 1992. Prolactin gene expression in human thymocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 87(1-3): R19-23.

Ormandy, C. J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Ederly, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N. & Kelly, P. A. 1997. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 11(2): 167-78.

Ortega, E., Forner, M. A. & Barriga, C. 1996. Effect of prolactin on the in vitro phagocytic capacity of macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 19(2): 139-46.

Ortega, E., Rodriguez, M. J., Barriga, C. & Forner, M. A. 1996. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. *Int J Sports Med.* 17(2): 149-55.

Palacio, J., Liste, F. & Gascón, M. 1995. Urinary protein creatinin ratios in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 137: 567-568.

- Parra, A., Ramirez-Peredo, J., Coutino, B., Lagunes, B., Marin, A., Ponce de Leon, S. & Ruiz-Arguelles, G. J. 1999. Impaired metoclopramide-induced pituitary prolactin release in men with human immunodeficiency virus infection. *J Lab Clin Med.* 133(1): 70-4.
- Passwell, J. H., Shor, R., Smolen, J. & Jaffe, C. L. 1994. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *Int J Exp Pathol.* 75(4): 277-84.
- Patel, Y. C. & Srikant, C. B. 1986. Somatostatin mediation of adenohipophysial secretion. *Annu Rev Physiol.* 48(551-67).
- Pearson, R. D., Marcus, J. L., Roberts, D. & Donowitz, G. R. 1983. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J Immunol.* 131(4): 1994-9.
- Pearson, R. D. 2002. Chemokines, prolactin and parasite interactions. *Trends Parasitol.* 18(9): 386.
- Phelps, C. P., Dong, J. M., Chen, L. T. & Menzies, R. A. 2001. Plasma interleukin-1beta, prolactin, ACTH and corticosterone responses to endotoxin after damage of the anterior hypothalamic area. *Neuroimmunomodulation.* 9(6): 340-51.
- Pichler, W. J. 1987. [Impairment of the immune system caused by drugs]. *Schweiz Med Wochenschr.* 117(12): 433-7.
- Poli, G., Nicoletti, G. & Faravelli, G. 1973. [Nitroblue tetrazolium-(NBT) test in dogs]. *Folia Vet Lat.* 3(2): 215-39.
- Prystowsky, M. B. & Clevenger, C. V. 1994. Prolactin as a second messenger for interleukin 2. *Immunomethods.* 5(1): 49-55.
- Rao, Y. P., Buckley, D. J., Olson, M. D. & Buckley, A. R. 1995. Nuclear translocation of prolactin: collaboration of tyrosine kinase and protein kinase C activation in rat Nb2 node lymphoma cells. *J Cell Physiol.* 163(2): 266-76.
- Raso, G. M., Meli, R., Gualillo, O., Pacilio, M. & Di Carlo, R. 1999. Prolactin induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J Neurochem.* 73(6): 2272-7.
- Reber, P. M. 1993. Prolactin and immunomodulation. *Am J Med.* 95(6): 637-44.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S. & Jaffe, C. L. 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol.* 71(1): 69-76.

Richards, J. S. & Williams, J. J. 1976. Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH): regulation by LH and PRL. *Endocrinology*. 99(6): 1571-81.

Richards, S. M. & Murphy, W. J. 2000. Use of human prolactin as a therapeutic protein to potentiate immunohematopoietic function. *J Neuroimmunol*. 109(1): 56-62.

Richards, S. M., Garman, R. D., Keyes, L., Kavanagh, B. & McPherson, J. M. 1998. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol*. 184(2): 85-91.

Riddick, D. H., Luciano, A. A., Kusmik, W. F. & Maslar, I. A. 1978. De novo synthesis of prolactin by human decidua. *Life Sci*. 23(19): 1913-21.

Riskind, P. N., Massacesi, L., Doolittle, T. H. & Hauser, S. L. 1991. The role of prolactin in autoimmune demyelination: suppression of experimental allergic encephalomyelitis by bromocriptine. *Ann Neurol*. 29(5): 542-7.

Robertson, M. C., Schroedter, I. C. & Friesen, H. G. 1991. Molecular cloning and expression of rat placental lactogen-IV, a variant of rPL-I present in late pregnant rat placenta. *Endocrinology*. 129(5): 2746-56.

Rodriguez, A. B., Barriga, C. & Lea, R. W. 1996. Effect of prolactin, in vivo and in vitro, upon heterophil phagocytic function in the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Dev Comp Immunol*. 20(6): 451-7.

Rosser, A. E., Remfry, C. J. & Keverne, E. B. 1989. Restricted exposure of mice to primer pheromones coincident with prolactin surges blocks pregnancy by changing hypothalamic dopamine release. *J Reprod Fertil*. 87(2): 553-9.

Rovensky, J., Buc, M., Lojda, Z., Ruzickova, M., Blazickova, S., Rauova, L., Mistina, T., Vidas, M. & Lackovic, V. 1995. Effect of domperidone-induced hyperprolactinemia on selected immune parameters in healthy women. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 43(3-4): 221-7.

Ruggenenti, P., Gaspari, F., Perna, A. & Remuzzi, G. 1998. Cross sectional longitudinal study of spot morning urine protein:creatinin ratio, 24 hour urine protein excretion rate, glomerular filtration rate, and end stage renal failure in chronic renal disease in patients without diabetes. *BMJ*. 316: 504-509.

Russell, D. H. 1989. New aspects of prolactin and immunity: a lymphocyte-derived prolactin-like product and nuclear protein kinase C activation. *Trends Pharmacol Sci*. 10(1): 40-4.

Sagrillo, C. A. & Voogt, J. L. 1991. Endogenous opioids mediate the nocturnal prolactin surge in the pregnant rat. *Endocrinology*. 129(2): 925-30.

- Sakaguchi, K., Tanaka, M., Ohkubo, T., Doh-ura, K., Fujikawa, T., Sudo, S. & Nakashima, K. 1996. Induction of brain prolactin receptor long-form mRNA expression and maternal behavior in pup-contacted male rats: promotion by prolactin administration and suppression by female contact. *Neuroendocrinology*. 63(6): 559-68.
- Samson, W. K., Lumpkin, M. D. & McCann, S. M. 1986. Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology*. 119(2): 554-60.
- Sassin, J. F., Frantz, A. G., Kapen, S. & Weitzman, E. D. 1973. The nocturnal rise of human prolactin is dependent on sleep. *J Clin Endocrinol Metab*. 37(3): 436-40.
- Sato, K. & Watanabe, Y. G. 1998. Corticosteroids stimulate the differentiation of growth hormone cells but suppress that of prolactin cells in the fetal rat pituitary. *Arch Histol Cytol*. 61(1): 75-81.
- Schneider, S. L., Gollnick, S. O., Grande, C., Pazik, J. E. & Tomasi, T. B. 1996. Differential regulation of TGF-beta 2 by hormones in rat uterus and mammary gland. *J Reprod Immunol*. 32(2): 125-44.
- Schradin, C. & Anzenberger, G. 1999. Prolactin, the Hormone of Paternity. *News Physiol Sci*. 14(223-231).
- Schwartz, J. & Cherny, R. 1992. Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocr Rev*. 13(3): 453-75.
- Selmanoff, M. 1985. Rapid effects of hyperprolactinemia on basal prolactin secretion and dopamine turnover in the medial and lateral median eminence. *Endocrinology*. 116(5): 1943-52.
- Shah, G. V., Shyr, S. W., Grosvenor, C. E. & Crowley, W. R. 1988. Hyperprolactinemia after neonatal prolactin (PRL) deficiency in rats: evidence for altered anterior pituitary regulation of PRL secretion. *Endocrinology*. 122(5): 1883-9.
- Shen, G. K., Montgomery, D. W., Ulrich, E. D., Mahoney, K. R. & Zukoski, C. F. 1992. Up-regulation of prolactin gene expression and feedback modulation of lymphocyte proliferation during acute allograft rejection. *Surgery*. 112(2): 387-93; discussion 393-4.
- Shennan, D. B. 1994. Regulation of water and solute transport across mammalian plasma cell membranes by prolactin. *J Dairy Res*. 61(1): 155-66.
- Shida, M. M., Jackson-Grusby, L. L., Ross, S. R. & Linzer, D. I. 1992. Placental-specific expression from the mouse placental lactogen II gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(9): 3864-8.

Shifrine, M., Taylor, N. J., Rosenblatt, L. S. & Wilson, F. D. 1978. Comparison of whole blood and purified canine lymphocytes in a lymphocyte-stimulation microassay. *Am J Vet Res.* 39(4): 687-90.

Shome, B. & Parlow, A. F. 1977. Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol Metab.* 45(5): 1112-5.

Sinha, Y. N. & Gilligan, T. A. 1984. A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology.* 114(6): 2046-53.

Sinha, Y. N., DePaolo, L. V., Haro, L. S., Singh, R. N., Jacobsen, B. P., Scott, K. E. & Lewis, U. J. 1991. Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Mol Cell Endocrinol.* 80(1-3): 203-13.

Sinha, Y. N. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev.* 16(3): 354-69.

Skwarlo-Sonta, K. 1990. Mitogenic effect of prolactin on chicken lymphocytes in vitro. *Immunol Lett.* 24(3): 171-7.

Skwarlo-Sonta, K. 1992. Prolactin as an immunoregulatory hormone in mammals and birds. *Immunol Lett.* 33(2): 105-21.

Snyder, J., Wilfinger, W. & Hymer, W. C. 1976. Maintenance of separated rat pituitary mammotrophs in cell culture. *Endocrinology.* 98(1): 25-32.

Soares, M. J., Colosi, P., Ogren, L. & Talamantes, F. 1983. Identification and partial characterization of a lactogen from the midpregnant mouse conceptus. *Endocrinology.* 112(4): 1313-7.

Solano-Gallego, L., Lull, J., Arboix, M., Ferrer, L. & Alberola, J. 2001. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 102(1-2): 163-6.

Sorensen, P. & Sheffield, L. G. 1997. Involvement of c-src in beta-casein expression by mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 241(3): 710-3.

Southard, J. N., Campbell, G. T. & Talamantes, F. 1987. Hamster placental lactogens: gestational profiles and high molecular weight forms. *Endocrinology.* 121(3): 900-6.

- Spangelo, B. L., Hall, N. R., Ross, P. C. & Goldstein, A. L. 1987. Stimulation of in vivo antibody production and concanavalin-A-induced mouse spleen cell mitogenesis by prolactin. *Immunopharmacology*. 14(1): 11-20.
- Spiegel, K., Leproult, R. & Van Cauter, E. 2003. [Impact of sleep debt on physiological rhythms]. *Rev Neurol (Paris)*. 159(11 Suppl): 11-20.
- Stoecklin, E., Wissler, M., Moriggl, R. & Groner, B. 1997. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol*. 17(11): 6708-16.
- Strasser, A., May, B., Teltscher, A., Wistrela, E. & Niedermuller, H. 2003. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 94(3-4): 113-21.
- Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R. I. & Martial, J. A. 1999. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(4): 1246-51.
- Sugiyama, T., Minoura, H., Toyoda, N., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Sudo, S. & Nakashima, K. 1996. Pup contact induces the expression of long form prolactin receptor mRNA in the brain of female rats: effects of ovariectomy and hypophysectomy on receptor gene expression. *J Endocrinol*. 149(2): 335-40.
- Sun, P., Lou, L. & Maurer, R. A. 1996. Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. *J Biol Chem*. 271(6): 3066-73.
- Sun, R., Wei, H., Zhang, J., Li, A., Zhang, W. & Tian, Z. 2002. Recombinant human prolactin improves antitumor effects of murine natural killer cells in vitro and in vivo. *Neuroimmunomodulation*. 10(3): 169-76.
- Tashjian, A. H., Jr., Barowsky, N. J. & Jensen, D. K. 1971. Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 43(3): 516-23.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E. & Scott, E.W. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416,542-5
- Terkel, J., Damassa, D. A. & Sawyer, C. H. 1979. Ultrasonic cries from infant rats stimulate prolactin release in lactating mothers. *Horm Behav*. 12(1): 95-102.

Thorat, S. P., Thatte, U. M., Pai, N. & Dahanukar, S. A. 1993. Effect of prolactin on neutrophils and monocytes. *Acta Haematol.* 89(4): 219-20.

Tocci, A. & Forte, L. (2003) Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 4,92-6

Toft, D. J. & Linzer, D. I. 1999. Prolactin (PRL)-like protein J, a novel member of the PRL/growth hormone family, is exclusively expressed in maternal decidua. *Endocrinology.* 140(11): 5095-101.

Tsai, S. C. & Heppner, G. H. 1994. Immunoendocrine mechanisms in mammary tumor progression: direct prolactin modulation of peripheral and preneoplastic hyperplastic-alveolar-nodule-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother.* 39(5): 291-8.

Tuomisto, J. & Mannisto, P. 1985. Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol Rev.* 37(3): 249-332.

van der Schoot, P., Uilenbroek, J. T. & Slappendel, E. J. 1990. Effect of the progesterone antagonist mifepristone on the hypothalamo-hypophysial-ovarian axis in rats. *J Endocrinol.* 124(3): 425-32.

Vaughan, M. K., Little, J. C., Johnson, L. Y., Blask, D. E., Vaughan, G. M. & Reiter, R. J. 1978. Effects of melatonin and natural and synthetic analogues of arginine vasotocin on plasma prolactin levels in adult male rats. *Horm Res.* 9(4): 236-46.

Velkeniers, B., Dogusan, Z., Naessens, F., Hooghe, R. & Hooghe-Peters, E. L. 1998. Prolactin, growth hormone and the immune system in humans. *Cell Mol Life Sci.* 54(10): 1102-8.

Vera-Lastra, O., Jara, L. J. & Espinoza, L. R. 2002. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 1(6): 360-4.

Vidaller, A., Llorente, L., Larrea, F., Mendez, J. P., Alcocer-Varela, J. & Alarcon-Segovia, D. 1986. T-cell dysregulation in patients with hyperprolactinemia: effect of bromocriptine treatment. *Clin Immunol Immunopathol.* 38(3): 337-43.

Vidaller, A., Guadarrama, F., Llorente, L., Mendez, J. B., Larrea, F., Villa, A. R. & Alarcon-Segovia, D. 1992. Hyperprolactinemia inhibits natural killer (NK) cell function in vivo and its bromocriptine treatment not only corrects it but makes it more efficient. *J Clin Immunol.* 12(3): 210-5.

Vijayan, E. & McCann, S. M. 1979. In vivo and in vitro effects of substance P and neurotensin on gonadotropin and prolactin release. *Endocrinology.* 105(1): 64-8.

Viselli, S. M., Stanek, E. M., Mukherjee, P., Hymer, W. C. & Mastro, A. M. 1991. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology*. 129(2): 983-90.

Wagner, S., Castel, M., Gainer, H. & Yarom, Y. 1997. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*. 387(6633): 598-603.

Walker, S. E. 1993. Prolactin: an immune-stimulating peptide that regulates other immune-modulating hormones. *Lupus*. 2(2): 67-9.

Walker, S. E., Miller, D., Hill, D. L. & Komatireddy, G. R. 1998. Prolactin, a pituitary hormone that modifies immune responses. Proceedings of the Mini-symposium on Prolactin and SLE, held at the 5th International Conference on Systemic Lupus Erythematosus, Cancun, Mexico. *Lupus*. 7(6): 371-5.

Walker, S. E. & Jacobson, J. D. 2000. Roles of prolactin and gonadotropin-releasing hormone in rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 26(4): 713-36.

Walker, S.E. 2001. Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 10(10): 762-8.

Wang, Z. 2002. Receptor tyrosine kinase, EphB4 (HTK), accelerates differentiation of select human hematopoietic cells. *Blood*. 99: 2740-2747.

Warwick-Davies, J., Lowrie, D. B. & Cole, P. J. 1995. Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H₂O₂. *J Immunol*. 154(4): 1909-18.

Weigle, K. A., Valderrama, L., Arias, A. L., Santrich, C. & Saravia, N. G. 1991. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg*. 44(3): 260-71.

Welniak, L. A., Tian, Z. G., Sun, R., Keller, J. R., Richards, S., Ruscetti, F. W. & Murphy, W. J. 2000. Effects of growth hormone and prolactin on hematopoiesis. *Leuk Lymphoma*. 38(5-6): 435-45.

Welniak, L. A., Richards, S. M. & Murphy, W. J. 2001. Effects of prolactin on hematopoiesis. *Lupus*. 10(10): 700-5.

West, B. & Dannies, P. S. 1980. Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. *Endocrinology*. 106(4): 1108-13.

Wilder, R. L. 1995. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 13(307-38).

Wilder, R. L. 1996. Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl.* 44(10-2).

Willems, E., Knigge, U., Jorgensen, H., Kjaer, A. & Warberg, J. 2000. Effect of blockade of postsynaptic H1 or H2 receptors or activation of presynaptic H3 receptors on catecholamine-induced stimulation of ACTH and prolactin secretion. *Eur J Endocrinol.* 142(6): 637-41.

Woody, M. A., Welniak, L. A., Richards, S., Taub, D. D., Tian, Z., Sun, R., Longo, D. L. & Murphy, W. J. 1999. Use of neuroendocrine hormones to promote reconstitution after bone marrow transplantation. *Neuroimmunomodulation.* 6(1-2): 69-80.

Woody, M. A., Welniak, L. A., Sun, R., Tian, Z. G., Henry, M., Richards, S., Raziuddin, A., Longo, D. L. & Murphy, W. J. 1999. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. *Exp Hematol.* 27(5): 811-6.

Yamaguchi, M., Ogren, L., Endo, H., Soares, M. J. & Talamantes, F. 1994. Co-localization of placental lactogen-I, placental lactogen-II, and proliferin in the mouse placenta at midpregnancy. *Biol Reprod.* 51(6): 1188-92.

Yamashita, S., Takayanagi, A. & Shimizu, N. 1996. Temporal and cell-type specific expression of c-fos and c-jun protooncogenes in the mouse uterus after estrogen stimulation. *Endocrinology.* 137(12): 5468-75.

Yao, X., Liu, Y., Tung, F. & Desir, G. V. 1996. Genomic structure and regulation of Kcn1, a cGMP-gated potassium channel. *Am J Physiol.* 271(1 Pt 2): F37-41.

Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P. & Smith, A.G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416,545-8

Youn, J. Y., Park, H. Y., Lee, J. W., Jung, I. O., Choi, K. H., Kim, K. & Cho, K. H. 2002. Evaluation of the immune response following exposure of mice to bisphenol A: induction of Th1 cytokine and prolactin by BPA exposure in the mouse spleen cells. *Arch Pharm Res.* 25(6): 946-53.

Yu, W. H., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S. & McCann, S. M. 1997. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(3): 1023-8.

Yu-Lee, L. Y., Stevens, A. M., Hrachovy, J. A. & Schwarz, L. A. 1990. Prolactin-mediated regulation of gene transcription in lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 594(146-55).

Yu-Lee, L. Y. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res.* 57(435-55).

Zellweger, R., Wichmann, M. W., Ayala, A. & Chaudry, I. H. 1998. Metoclopramide: a novel and safe immunomodulating agent for restoring the depressed macrophage immune function after hemorrhage. *J Trauma.* 44(1): 70-7.

Zerek-Melen, G., Winczyk, K., Kunert-Radek, J. & Pawlikowski, M. 1990. Effects of metoclopramide on rat spleen lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 171(3): 1099-104.

Zhang, Y., Bai, X.F. & Huang, C.X. (2003) Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 9,201-4

Zhao, Y., Glesne, D. & Huberman, E. (2003) A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100,2426-31

Zhou, B., Lum, H. E., Lin, J. & Linzer, D. I. 2002. Two placental hormones are agonists in stimulating megakaryocyte growth and differentiation. *Endocrinology.* 143(11): 4281-6.

Zellweger, R., Wichmann, M. W., Ayala, A., DeMaso, C. M. & Chaudry, I. H. 1996. Prolactin: a novel and safe immunomodulating hormone for the treatment of immunodepression following severe hemorrhage. *J Surg Res.* 63(1): 53-8.

Zhu, X. H., Zellweger, R., Wichmann, M. W., Ayala, A. & Chaudry, I. H. 1997. Effects of prolactin and metoclopramide on macrophage cytokine gene expression in late sepsis. *Cytokine.* 9(6): 437-46.

Zoli, A., Ferlisi, E. M., Lizzio, M., Altomonte, L., Mirone, L., Barini, A., Scuderi, F., Bartolozzi, F. & Magaro, M. 2002. Prolactin/cortisol ratio in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 966(508-12).

