



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Participación del PRLR en la inmunopatogénesis de la tuberculosis

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

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

Tutor externo: Dr. Ciro Estrada Chávez

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Tutor interno: Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM

Comité tutor:

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

México DF., abril de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM-FMVZ**) por la oportunidad de estudiar en Programa de Doctorado en Ciencias de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C (**CIATEJ**) por la disponibilidad y facilidades brindadas.

Al Centro Universitario de Ciencias de la Salud (**CUCS**) por el apoyo para la realización de este trabajo.

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

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

A mis hermanos por el ánimo y apoyo que me brindan, dándome la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mi esposa **Norma Paola Reyes Alcaraz** quien desde el primer momento me brindo su apoyo y comprensión.

Al **Dr. Rogelio Hernández Pando** y el **Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello** por su disponibilidad y atenciones proporcionadas.

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

Está tesis fue financiada por:

El Proyecto No. 79769 (CIATEJ:2856-PI-DESIRE-08/BT). **FONDO SEP-CONACYT**

.

Beca **CONACYT** numero 173509 otorgada del 1 de febrero de 2009 al 31 de enero de 2013.

Lista de abreviaturas

Prolactina	(PRL)
Prolactina recombinante humana	(PRL-rh)
Receptor de prolactina	(PRLR)
Hormona del crecimiento	(GH)
Hormona adrenocorticotropica	(ACTH)
Hormona paratiroidea	(PTH)
Lactógeno placentario	(PL)
Prostaglandina E2	(PGE2)
Glándula mamaria	(GM)
Nódulo linfático retromamario	(NLRM)
Línea celular monocítica THP1	(Mo-THP1)
Línea celular de cáncer de mama MCF7	(MCF7)
Línea celular Nb2	(Nb2)
Macrófagos	(MØ)
Monocitos	(Mo)
Natural Killer	(NK)
Células mononucleares de sangre periférica	(PBMC)
Factor de necrosis tumoral-alpha	(TNF- α)
Interferón gamma	(IFN- γ)
Interleucina-1 beta	(IL-1 β)
Interleucina-6	(IL-6)
Interleucina-10	(IL-10)
Receptor Toll-like 2 y 4	(TLR2, TLR4),
Sintasa de óxido nítrico	(iNOS)
Sintasa de óxido nítrico 2	(NOS2)
Lipopolisacárido	(LPS)
Isoforma larga del PRLR	(LF)
Isoforma intermedia del PRLR	(IF)
Isoformas cortas del PRLR	(Δ SF1), (SF1a), (SF1b), (Δ 7/11), (Δ 4SF1b), (SF1c), (Δ 4/6-SF1a).
Albúmina sérica bovina	(BSA)
Suero fetal bovino	(FBS)
Tuberculosis	(TB)
Tuberculosis bovina	(TBb)
Libres de tuberculosis bovina	(LTBb)
Bacillus Calmette-Guérin	(BCG)
Bacilo ácido alcohol resistente	(BAAR)
Filtrado de proteínas de cultivo de <i>M. bovis</i>	(CFP)
Lipoarabinomanana	(LAM)
Patrones moleculares asociados a patógenos	(PAMPS)
Transductor de señal y activador de la transcripción 1	(STAT1)
Transductor de señal y activador de la transcripción 5B	(STAT5B)
Factor regulador de interferón 1	(IRF-1)
Desviación estándar	(SD)
Densidad Óptica	(OD)
Sin estímulo	(S/E)
Kilodaltones	(kDa)
Derivado proteico purificado de <i>M.bovis</i>	(PPD- <i>M.bovis</i>)
<i>versus</i>	(vs)

Resumen

López Rincón Gonzalo. Participación del PRLR en la inmunopatogénesis de la tuberculosis. **Tutor externo: Ciro Estrada Chávez. Tutor interno: José Ángel Gutiérrez Pabello.**

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica producida principalmente en la adenohipofisis. Recientemente ha sido asociada a carcinogénesis y a la exacerbación de enfermedades autoinmunes. En humanos y roedores se ha confirmado la síntesis de PRL autocrina y la sobreexpresión de diversas isoformas de su receptor en diferentes células y tejidos. No obstante, poco se sabe acerca de su regulación o función fisiológica. La infección por *M. tuberculosis* en humanos induce el aumento de los niveles séricos de la PRL dependiendo de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, no se ha determinado su participación en la inmunopatogénesis de la tuberculosis. En este trabajo se analizó a la PRL y al receptor de prolactina (PRLR) en la inmunopatogénesis de la tuberculosis bovina (TBb). Por western blot se determinó la expresión de ambas moléculas en la glándula mamaria (GM) y el nódulo linfático retromamario (NLRM) de vacas lecheras expuestas e infectadas con *M. bovis* (n=42); en ambos órganos se observaron isoformas cortas del PRLR de 40 y 50 kDa y en NLRM se observó una variante de la PRL de 80 kDa, inmunolocalizada en macrófagos (MØ) y linfocitos. En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y en el plasma de vacas infectadas se identificaron isoformas cortas del PRLR de 40 y 50 kDa. Así mismo en los PBMC de vacas libres de TBb estimuladas con PPD-*M. bovis* se observó la sobreexpresión de ambas isoformas cortas del PRLR y de las variantes de la PRL de 60 y 80 kDa. Sin embargo, después de vacunar con BCG+CFP-*M. bovis* no se observó la expresión del PRLR y de la PRL en plasma de estas vacas. *In vitro* se estimularon monocitos THP1 y MØ bovinos con CFP-*M. bovis*, confirmando la expresión de isoformas cortas del PRLR de 40 y 50 kDa y las variantes de la PRL de 60-80 kDa. Por RT-PCR se observó un aumento de 175 veces más ARNm de la PRL y 300 veces más del PRLR en células estimuladas con CFP-*M. bovis* vs células sin estímulo ($P < 0.001$). Por inmunocitoquímica el PRLR y la PRL fueron inmunolocalizados en medio condicionado, membrana celular y núcleoplasma. Posteriormente se confirmó la expresión del PRLR de 40 y 50 kDa al igual que la variante de la PRL 80 kDa en extractos nucleares. La bioactividad de la PRL autocrina fue determinada en células Nb2, posteriormente se inhibió el PRLR y se observó disminución de la proliferación de esta estirpe celular ($P < 0.001$). Mediante la técnica de ELISA se determinó incremento de IL1- β , TNF- α e IL-6 en sobrenadantes condicionados con CFP-*M. bovis*. En contraste, al coestimular con prolactina recombinante (PRL-rh) 20 ng/ml se observó la disminución de las citocinas inflamatorias y el aumento de IL-10. En conclusión, estos resultados sugieren que la infección por *M. bovis* induce una sobreexpresión de isoformas cortas del PRLR y la síntesis de la PRL autocrina de 60 y 80 kDa en células mieloides. La inducción de este sistema autocrino mediado por isoformas cortas del PRLR y la PRL de alto peso molecular podría ser un mecanismo que permita la supervivencia de *M. bovis* en el ganado lechero.

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

Summary

López-Rincón Gonzalo. Participación del PRLR en la inmunopatogénesis de la tuberculosis. **Tutor externo: Ciro Estrada Chávez. Tutor interno: José Ángel Gutiérrez Pabello.**

The prolactin (PRL) is a peptide hormone produced by the pituitary gland, which has recently been associated with carcinogenesis, and exacerbation of autoimmune diseases. Humans and rodents show autocrine PRL synthesis and expression of different isoforms of PRL receptor (PRLR) in several tissues, including lymphoid. However, little is known about its regulation and physiological function in different immune cells, e.g. myeloid. Tuberculosis infection by *Mycobacterium tuberculosis* has shown induce increased of physiological levels of PRL depending on disease progression. However, their participation in the immunopathogenesis of tuberculosis has not been determined. We analyzed the involvement of PRL and PRLR in the immunopathogenesis of bovine tuberculosis by determining the expression of both molecules in mammary gland and retromammary lymph node (RMLN) from dairy cows exposed and infected with *M. bovis* (n=42). In both organs from infected cows short isoforms of PRLR 40 and 50 kDa were observed. RMLN showed a variant of big PRL of around 80 kDa, which immunolocalized in macrophages (MØ) and lymphocytes. In peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and plasma from infected cows, short isoforms of PRLR of 40 and 50 kDa were observed, as well as, in PBMC of healthy controls stimulated with PPD-*M. bovis* and big PRL were also observed. However, after vaccination (with BCG+CFP-*M. bovis*) in plasma from vaccinated cows no PRLR and nor big PRL were observed. *In vitro*, THP1 monocytes and MØ derived stimulated with CFP-*M. bovis* expression of short isoforms of PRLR of 40 and 50 kDa and big PRL 60-80 kDa was confirmed. Using RT-PCR an increased mRNA of PRLR and PRL *versus* untreated cells was shown (p<0.001). By immunocytochemistry the PRLR and PRL were localized in culture media, membrane and nucleus, while in nuclear extracts, we confirmed expression of short isoforms of PRLR of 40 and 50 kDa, and big PRL of 80 kDa. Big PRL bioactivity (proliferation) was determined in Nb2 cell, since after inhibiting the PRL binding decreased proliferation was observed (p<0.001). By ELISA, in conditioned supernatants with CFP-*M. bovis* increased proinflammatory cytokines, IL1- β , TNF- α and IL-6, was determined. In contrast, after costimulating with recombinant prolactin (PRL-rh 20ng/ml) decrease of proinflammatory cytokines and increase antiinflammatory cytokine IL-10 were observed. In conclusion, these results suggest that infection with *M. bovis* and particularly, pathogen-associated molecular patterns upregulates expression of short isoforms of PRLR and autocrine synthesis of PRL in myeloid cells. Induction of this autocrine mechanism in MØ may be is a virulence mechanism that allows mycobacteria persistence, reactivation and dissemination in dairy cattle.

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

	Pag
Agradecimientos	I
Abreviaturas	II
Resumen	III
Summary	IV
Índice	V
Lista de tablas, figuras y esquemas	VI
1. Introducción	1
1.1 Situación actual de la tuberculosis	1
1.1.2 Importancia de la tuberculosis	1
1.1.3 Tuberculosis bovina y salud pública	2
1.1.4 Etiología	3
1.1.5 Vías de infección	4
1.1.6 Patogénesis	4
1.1.7 Respuesta inmune a la tuberculosis	5
1.2 Prolactina: estructura y funciones	9
1.2.1 Regulación de la prolactina	13
1.2.2 Mecanismo de acción de la PRL a través del PRLR	14
1.2.3 La prolactina y el sistema inmunológico	19
1.2.4 Prolactina y su impacto en la patogénesis de trastornos inflamatorios	22
1.2.5 Factores neuroendocrinos que regulan la respuesta inmune	24
2. Planteamiento del problema	26
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	27
5. Materiales y métodos	28
5.1 Universo de estudio	28
5.1.2 Colección de muestras glándula mamaria y nódulo linfático retromamario en rastro	32
5.1.3 Detección del ADN de <i>M. bovis</i> por PCR <i>in situ</i>	32
5.1.4 Detección del ADN de <i>M. bovis</i> mediante PCR anidada	33
5.1.5 Análisis de la expresión del PRLR y la PRL por western blot	35
5.1.6 Análisis del PRLR y la PRL por inmunohistoquímica	36
5.1.7 Cultivo celular de Mo-THP1	36

5.1.8	Análisis de la expresión del PRLR y la PRL por PCR en tiempo real	37
5.1.9	Inhibición del complejo PRL/PRLR	38
5.2	Análisis del PRLR y la PRL por inmunocitoquímica fluorescente	38
5.2.1	Bioensayo de la PRL en células Nb2	39
5.2.2	Ensayo de Proliferación en Mo-THP1	39
5.2.3	Determinación de apoptosis por Anexina V en Mo-THP1	40
5.2.4	Determinación de óxido nítrico por el reactivo de Greiss	40
5.2.5	Determinación de citocinas proinflamatorias por ELISA	41
5.2.6	Análisis Estadístico	41
6.	Resultados	42
6.1	Pruebas inmunológicas y patológicas	42
6.1.2	La infección por <i>M. bovis</i> indujo la expresión del PRLR y la PRL en glándula mamaria de bovinos lecheros	45
6.1.3	La infección por <i>M. bovis</i> indujo la expresión del PRLR y la PRL en nódulo linfático retromammario de bovinos	47
6.1.4	Sobreexpresión del PRLR y la PRL en PBMC de sangre periférica estimulados con PPD-bovino	49
6.1.5	Expresión de PRL de alto peso molecular y formas cortas del PRLR en plasma de bovinos expuestos e infectados con <i>M. bovis</i>	51
6.1.6	El CFP- <i>M. bovis</i> indujo la expresión de PRL de alto peso molecular y formas cortas de su PRLR en MØ derivados de PBMC	54
6.2	El CFP- <i>M. bovis</i> indujo la sobreexpresión de formas cortas del PRLR en Mo-THP1	56
6.2.1	El CFP- <i>M. bovis</i> indujo la expresión de PRL de alto peso molecular en Mo-THP1	58
6.2.2	La PRL autocrina indujo proliferación de la línea celular Nb2 lactógeno dependiente	62
6.2.3	La PRL-rh indujo la expresión de la PRL autocrina y de isoformas cortas del PRLR en Mo-THP1	64
6.2.4	Sobreexpresión de isoformas cortas del PRLR en Mo-THP1 coestimulados con PRL-rh y CFP- <i>M. bovis</i>	67
6.2.5	La PRL-rh disminuyó citocinas proinflamatorias inducidas por el CFP- <i>M. bovis</i> en Mo-THP1	68
6.2.6	El CFP- <i>M. bovis</i> indujo apoptosis y proliferación celular en Mo-THP1.	70
7.	Discusión	74
8.	Conclusiones	86
9.	Perspectivas	87
10.	Bibliografía	88

Tablas, figuras y esquemas

Tabla 1. Variantes moleculares de la prolactina	19
Tabla 2. Acciones biológicas de la prolactina.	21
Tabla 3. Escala de clasificación para las lesiones macroscópicas	43
Tabla 4. Diagnóstico inmunopatológico de vacas expuestas e infectadas con <i>M. bovis</i>	43
Tabla 5. Resultados de la PCR anidada en los diferentes tejidos bajo estudio.	43
Figura 1. Detección del ADN de <i>M. bovis</i> en glándula mamaria de vacas infectadas con <i>M. bovis</i> .	44
Figura 2. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en glándula mamaria de vacas infectadas con <i>M. bovis</i> .	46
Figura 3. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en nódulo linfático retromamario de vacas infectadas con <i>M. bovis</i>	48
Figura 4. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en PBMC de vacas expuestas e infectadas a <i>M. bovis</i>	50
Figura 5. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en plasma estimulado <i>in vitro</i> con PPD de <i>M. bovis</i> en vacas expuestas e infectadas con <i>M. bovis</i>	52
Figura 6. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en plasma estimulado <i>in vitro</i> con PPD de <i>M. bovis</i> en vacas expuestas e infectadas tres meses post- vacunación	53
Figura 7. Caracterización de la expresión del PRLR y de la PRL en MØ derivados de PBMC de vacas libres de TBb	54
Figura 8. Análisis de la expresión del PRLR en Mo-THP1 estimulados con CFP- <i>M. bovis</i> .	57
Figura 9. Análisis de la expresión de la PRL en Mo-THP1 estimulados con CFP- <i>M. bovis</i> .	59
Figura 10. Localización del PRLR y la PRL en Mo-THP1 estimulados con CFP- <i>M. bovis</i> y coestimulados con anti-PRLR.	61
Figura 11. La PRL de 60 kDa indujo proliferación en células lactogénicas Nb2.	63
Figura 12. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en Mo- THP1 estimulados con PRL-rh	65
Figura 13. Análisis de la expresión de la PRL y el PRLR en Mo-THP1 estimulados PRL-rh	66
Figura 14. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en Mo-THP1 coestimulados con PRL-rh+CFP- <i>M. bovis</i> .	67
Figura 15. La PRL-rh disminuyó la síntesis de ON y citocinas proinflamatorias en Mo-THP1 estimulados con CFP- <i>M. bovis</i> .	69
Figura 16. El CFP- <i>M. bovis</i> indujo apoptosis y proliferación celular en Mo-THP1.	71

Esquema 1. Representación esquemática del gen del PRLR.	16
Esquema 2. Vías de señalización asociadas a las diferentes isoformas del PRLR.	17
Esquema 3. Estructura del gen de la PRL.	18
Esquema 4. Modelo de acción del PRLR y la PRL en la tuberculosis del ganado lechero.	55
Esquema 5. Sistema autocrino del PRLR y la PRL en Mo-THP1 inducido por el CFP- <i>M. bovis</i> de 1-48 horas de estimulación.	72
Esquema 6. Sistema autocrino del PRLR y de la PRL en Mo-THP1 coestimulados con CFP- <i>M. bovis</i> +PRL-rh de 1-48 horas de estimulación.	73

1. Introducción

1.1 Situación actual de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica y progresiva, de distribución mundial, causada por bacterias del complejo *Mycobacterium*, que afecta a un amplio espectro de hospederos incluyendo al hombre (Hope and Villarreal-Ramos 2008; Guevara GA 2003). El bacilo de la tuberculosis infecta cerca de un tercio de los seres humanos en el mundo, con un índice de mortalidad de 3 millones de personas por año aproximadamente (Kaufmann, Cole et al. 2005; Pan, Yan et al. 2005). Todos los países se ven afectados, pero la mayoría de los casos de tuberculosis ocurren en África y Asia (85%), lo cual puede ser subestimado por la falta de registros en regiones como África y Latino América (WHO 2011).

1.1.2 Importancia de la tuberculosis

En América latina la tuberculosis humana y bovina constituye un problema difícil de erradicar. Cerca de 350,000 casos de tuberculosis activa y más de 50,000 muertes en humanos fueron los estimados para la región durante el 2004 (de Kantor and Ritacco 2006). La tuberculosis continúa siendo un problema de salud pública en México, en el 2010 se reportaron, entre 25 y 49 nuevos casos de tuberculosis activa por cada 100,000 habitantes. Se estima un subregistro del 45%; la cifra real de casos activos es de aproximadamente 30,000 (WHO 2011). En la región norte del país (Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas) se reportaron 4,627 casos nuevos de tuberculosis por año (32%), principalmente por la presencia de flujos migratorios y alta incidencia de VIH-SIDA. En la región centro-occidente (Aguascalientes, Colima, D.F. Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Tlaxcala, Estado de México) se registran casi 1,750 casos nuevos (11.6%) y en la región sur-sureste Chiapas, Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Tabasco se registraron 5,400 casos nuevos (36% del total nacional) atribuidos a problemas de accesibilidad a servicios de salud, bajos índices de desarrollo y migración; siendo el estado de Chiapas el de mayor incidencia de mortalidad por tuberculosis (Secretaria de Salud, 2010, cenavece.salud.gob.mx).

1.1.3 Tuberculosis bovina y salud pública

La TBb causada por *Mycobacterium bovis* es una zoonosis asociada al consumo de leche o derivados contaminados con el bacilo y al trabajo en granjas o rastros (de Kantor and Ritacco 2006). La Organización Mundial de la Salud considera a la tuberculosis humana causada por *M. bovis* una zoonosis, para el año 2004 en México se determinaron 10,000 nuevos casos de tuberculosis, considerando que 8% fueron causados por *M. bovis* (WHO 2004). El problema de TBb en México es grave, en la zona centro y en las cuencas lecheras existe una prevalencia de más del 16.5%. Sin embargo, se reporta que el 82% del territorio nacional tiene una prevalencia menor de 0.5% (Fase-Eradicación) y el 17.02 % con una prevalencia menor de 2.05% (Fase-Control) (SAGARPA 2010). Las altas prevalencias de esta enfermedad causan desecho prematuro de los animales, así como el riesgo latente de infección principalmente para trabajadores en establos y rastros (Milian-Suazo, Harris et al. 2008; Perez-Guerrero, Milian-Suazo et al. 2008).

La epidemiología de *M. bovis* en humanos es poco conocida en México. En el estado de Querétaro se demostró que de 255 muestras de pacientes sintomáticos a tuberculosis el 13.8% mostraron el espoligotipo de *M. bovis* idéntico al espoligotipo del ganado, por lo tanto, *M. bovis* podría jugar un papel importante en la epidemiología de la tuberculosis humana (Perez-Guerrero, Milian-Suazo et al. 2008; SAGARPA 2010). En el estado de Jalisco, se analizaron por PCR punto final 124 asilados obtenidos de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar y en el 28% (35/124) se identificó a *M. bovis*, 51% eran niños de los cuales el 69% estaban mal nutridos, 51% consumieron leche no pasteurizada y el 6 % tuvieron contacto con animales. Actualmente se considera que el problema de zoonosis en México se presenta principalmente en niños provocando altos índices de mortalidad 31% (Portillo-Gomez and Sosa-Iglesias 2011).

1.1.4 Etiología

Las micobacterias causantes de TB se adscriben taxonómicamente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* causantes de TB en humanos, *M. microti* en pequeños roedores, *M. caprae* en cabras, *M. pinipedii* en lobos marinos. Sin embargo, *M. bovis* tiene uno de los más amplios rangos de hospedadores, se ha identificado en el hombre, primates, ungulados (venado cola blanca) y carnívoros (tejones y zarigüellas) que representan un reservorio de la micobacteria. (Brudey, Driscoll et al. 2006; Hope and Villarreal-Ramos 2008; Macias Parra, Kumate Rodriguez et al. 2011; Rodriguez, Bezos et al. 2011). Las micobacterias son definidas como bacilos delgados, cortos, aeróbios, y no esporulados. Tienen una pared celular rica en ácidos micólicos, los cuales les confiere una resistencia especial a la decoloración ácida en la tinción Ziehl-Neelsen lo que permite reconocerlos como bacilos acido-alcohol resistente (BAAR) (Maher D, Floyd K et al. 2002; Gorocica, P. Jimenez-Martinez et al. 2005). La pared de las micobacterias está compuesta principalmente por dos polímeros: el arabinogalactano y el peptidoglicano (Cole, Brosch et al. 1998). También está formada por una gran variedad de lípidos como glicolípidos, micolatos de trehalosa, sulfolípidos de trehalosa y micósidos. Los lípidos de la pared son considerados como factores de virulencia importantes, pero la patogenia del bacilo parece ser multifactorial.

En las micobacterias la membrana celular es elemental en el transporte de iones y protección osmótica. Esta presenta la conformación clásica de las membranas biológicas, los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como lipoarabinomanana (LAM) y fosfatidil-inositol-manósidos (Gorocica, P. Jimenez-Martinez et al. 2005). Los microorganismos del género son de crecimiento lento pudiendo transcurrir varias semanas antes de que sus colonias sean visibles. Es importante confirmar la especie de micobacteria aislada, *M. tuberculosis* tiene capacidad de producir niacina y carece de la actividad de la catalasa a 68°C, *M. bovis* es fisiológicamente muy similar, pero no produce niacina. Los bacilos son moderadamente resistentes al calor, la desecación y muchos desinfectantes, pero son fácilmente destruidos por la luz solar directa (Hayashi, Takii et al. 2010).

1.1.5 Vías de infección

En humanos, *M. tuberculosis* es transmitido principalmente por vía aerogena, inhalando aerosoles expulsados por tos o estornudo de una persona infectada a otra sana. Los bacilos tuberculosos penetran a los alvéolos pulmonares de un individuo no infectado donde los macrófagos alveolares, células epiteliales, dendríticas y neutrofilos fagocitan el bacilo y lo internalizan en fagosomas (Dheda, Schwander et al. 2010). Otra forma de transmisión es vía alimentaria, por la ingestión de leche y lácteos contaminados con *M. bovis* los organismos entran a través de las amígdalas o la mucosa faríngea, a los nódulos linfáticos cervicales, o a través del intestino a los nódulos linfáticos mesentéricos (de Kantor and Ritacco 2006).

En bovinos existen numerosas vías de diseminación de la TBb, influenciadas por factores como: edad, ambiente y prácticas de manejo (Pollock and Neill 2002). Los hallazgos *post mortem* indican que la vía de infección usualmente es respiratoria. Es por ello que 70 a 90% de las lesiones tuberculosas son localizadas en nódulos linfáticos de la región torácica y cabeza (Neill, Bryson et al. 2001). De esta forma, la micobacteria logra llegar hasta los alvéolos pulmonares, donde son fagocitadas por los macrófagos residentes pudiendo ser eliminadas o sobrevivir por factores de virulencia. Otra vía de diseminación es la digestiva, muy importante en becerros que se alimentan con leche o calostro proveniente de vacas enfermas, debido a que las vacas infectadas eliminan el microorganismo en la leche y calostro principalmente. (Pollock and Neill 2002; Serrano-Moreno, Romero et al. 2008).

1.1.6 Patogénesis

Los macrófagos y células dendríticas transportan a *M. tuberculosis* a nódulos linfáticos locales donde las células T están capacitadas para contrarrestar la infección. Durante la enfermedad activa hay una exuberante respuesta inmune pulmonar ocasionada por la activación linfocitos y macrófagos desencadenando un perfil Th1 con la secreción de grandes cantidades de INF- γ (Herrera, Torres et al. 2009). El bacilo tiene mecanismos de evasión de la respuesta inmune que le permiten sobrevivir y diseminarse, provocando el inicio de la formación de granulomas o tubérculos (Guyot-Revol, Innes et al. 2006; Kursar, Koch et al. 2007). Estos granulomas se caracterizan por un centro necrótico y bacterias

libres rodeadas de macrófagos infectados, células epiteloideas y células gigantes, rodeadas por tejido conectivo fibroso. El granuloma se forma para tratar de eliminar la infección y permite que el proceso inflamatorio y los mecanismos inmunológicos destruyan los bacilos (Kaufmann 2001). En la TBb se han observado lesiones principalmente en nódulos linfáticos y pulmón pudiendo ser unilateral o bilateral, predominantemente en el lóbulo caudal y en el tercio distal de los lóbulos. También se han reportado lesiones en tonsilas y nódulo linfático mesentérico, cuando la tuberculosis es generalizada se caracteriza por lesiones en órganos tales como el hígado, riñones, meninges y cavidades serosas (Neill, Bryson et al. 2001).

1.1.7 Respuesta inmune a la tuberculosis

La respuesta inmune en la tuberculosis inicia con la fagocitosis de los bacilos por células presentadoras de antígenos en los pulmones, principalmente macrófagos alveolares y células dendríticas. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) mediante receptores específicos de reconocimiento de patógenos (PRR) es central en la iniciación y coordinación de la respuesta inmune del huésped (Akira, Uematsu et al. 2006; Ahmad 2011). Los receptores tipo Toll (o Toll-like receptor TLRs) expresados en la membrana celular de las células inmunes, reconocen los PAMPS de la micobacteria en particular, TLR2, TLR4 y TLR9, son determinantes en la inmunidad innata durante la infección por tuberculosis (Jo 2008; Harding and Boom 2010). La pared celular de las micobacterias contiene un gran número de ligandos afines al TLR2, incluyendo lipoproteínas, peptidoglicanos complejos, lípidos, y lipoarabinomananos (LAM) que favorecen a una respuesta proinflamatoria. Trabajos recientes sugieren que el TLR1, TLR6 y TLR9 cooperarían con el TLR2 para el reconocimiento de la micobacteria por macrófagos y células dendríticas (Berrington and Hawn 2007). Los polimorfismos de los TLR, podrían afectar la respuesta inmune innata y la susceptibilidad a la infección de patógenos intracelulares (Hawn, Misch et al. 2007). Por lo general, la interacción de TLRs con ligandos de la micobacteria induce la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF-kappa B favoreciendo la producción y secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-18) y la producción de péptidos antimicrobianos (catelicidina y defensinas) por células del sistema inmune (Korbel, Schneider et al. 2008). Sin embargo, la respuesta

protectora Th1 con la producción de $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ puede estar exacerbada y asociarse con la patología (Ahmad 2011). La respuesta inmune puede ser evadida por la micobacteria si ésta persiste en estado no replicativo (latencia) caracterizado en tejido adiposo y macrófagos esponjosos que contienen gran cantidad de lípidos (Russell, Cardona et al. 2009). Estas células también son responsables de la acumulación de desechos caseosos en el centro del granuloma, favoreciendo la progresión de la enfermedad activa. Otro tipo de respuesta celular en el pulmón durante la infección temprana por *M. tuberculosis* esta mediada por las células NK siendo fuente primaria de $\text{INF-}\gamma$. Luego de su activación a través de los TLRs, las células NK inducen la lisis de los macrófagos infectados (Vankayalapati, Garg et al. 2005). Las células fagocíticas mononucleares poseen un rol clave en el inicio de la respuesta local inflamatoria, así como también en la presentación antigénica y la iniciación de la inmunidad mediada por células.

La respuesta inmune protectora en tuberculosis puede ser definida como una respuesta Th1 ya que la inmunidad celular y la producción de $\text{INF-}\gamma$ por células T CD4+ es crítica para el control de la enfermedad (Ottenhoff, Verreck et al. 2005). Los linfocitos T CD4 no sólo cumplen la función de secretar citocinas como el $\text{INF-}\gamma$, también tienen funciones citotóxicas, particularmente en la respuesta inmunitaria en el pulmón (Klucar, Barnes et al. 2008). Por otro lado, las células T CD8+ tienen una importante participación en la fase crónica de la infección, podrían contribuir a la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso, al menos por tres mecanismos: secreción de $\text{INF-}\gamma$, lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando o por la acción de perforinas y granzimas (Flynn, Goldstein et al. 1992). Las células T son de importancia fundamental en la resistencia frente a las micobacterias, como se ha reportado en pacientes con inmunodeficiencias, en los cuales se observa infección diseminada por la cepa atenuada *M. bovis* BCG (Bacalhau, Freitas et al. 2011; Yu, Satoh et al. 2012). Si bien, como ya mencionamos el $\text{INF-}\gamma$ es la principal citocina activadora de macrófagos y en conjunto con $\text{TNF-}\alpha$, estimulan la producción de la enzima NOS-2, responsable de la síntesis de los altos niveles de óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno con funciones bactericidas frente a la infección, el $\text{INF-}\gamma$ también estimula la expresión de LRG-47, una GTPasa que induce en los macrófagos la eliminación de *M. tuberculosis*, independientemente de NOS-2 (MacMicking, Taylor et al. 2003). Por lo tanto, aunque el $\text{INF-}\gamma$ solo no puede controlar la

infección, es sin lugar a duda necesario para la generación de la respuesta protectora frente a este patógeno. Por último, sin bien esta citocina podría también inducir inmunopatología, ha sido demostrado que existen mecanismos regulatorios innatos y adaptativos que controlan su propia acción y limitan la respuesta inflamatoria exacerbada (Cooper, Magram et al. 1997). En general, la resistencia a patógenos intracelulares correlaciona con una respuesta inmune Th1, regulada por IL-1 e IL-12 producidas por los macrófagos activados, además por la secreción IL-2 e IFN- γ por las células T CD4+ (Raja 2004). En el bovino, los macrófagos infectados liberan citocinas que promueven la migración de macrófagos y linfocitos T γ/δ , siendo estos linfocitos los primeros en ser reclutados hacia el sitio de la lesión, colaborando en la retroalimentación positiva para la producción de IFN- γ (Pollock, Welsh et al. 2005). Estos linfocitos γ/δ además de producir citocinas, tienen la capacidad de matar a macrófagos infectados mediante un mecanismo de citotoxicidad dependiente de gránulos citolíticos (perforinas, granzimas), similar al de los linfocitos T CD8+ (North and Jung 2004). Las citocinas también pueden dirigir a los linfocitos T CD4+ hacia los sitios donde se está iniciando una respuesta de hipersensibilidad retardada que culmina con la formación del granuloma, esto se logra mediante la expresión selectiva de receptores (IL-18R, IL-12R, IL1 β R y TNF- α R) en los linfocitos Th1. Por otra parte, la acción efectora de los linfocitos Th1 depende del reconocimiento de péptidos antigénicos sobre la superficie celular asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) con los receptores de células T (*TCR*) y a la secreción de citocinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ . Los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas MHC II y presentados a linfocitos T CD4+ o bien acoplados a moléculas MHC I y presentados a linfocitos T CD8+ (Flynn and Chan 2001). El acúmulo de células inmunes conlleva a la formación del granuloma, que constituye un frente de defensa del huésped que localiza, detiene y destruye bacilos mediante anaerobiosis (Lalvani, Pathan et al. 2001). La IL-12 y la IL-18 producidas por los macrófagos activados, también inducen la producción de IFN- γ en las células NK, lo que favorece la actividad microbicida de los macrófagos por la generación de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno, regulando la respuesta inmune innata (Endsley, Endsley et al. 2006).

Se ha considerado que la respuesta Th1 representa el patrón protector para el control de la tuberculosis, principalmente a través de la secreción de IFN- γ , entonces citocinas

supresoras como IL-10, TGF- β , IL-4 podrían estar involucradas en la progresión de la enfermedad. La función de la IL-10 en la regulación de la respuesta celular protectora contra *M. tuberculosis* ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. En humanos, la presencia de polimorfismos específicos de IL-10 está asociada con una mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* (Cooper 2009). Un ejemplo es la tendencia hacia el desarrollo de la tuberculosis primaria progresiva en los seres humanos que poseen aumentada la producción de IL-10, y en algunos casos, este aumento ha sido correlacionado con una inmunización deficiente con BCG. Además, se ha observado que la IL-10 es capaz de inducir reactivación de la enfermedad en modelos de animales (Henaó, Montes et al. 2006). En forma similar a la IL-10, el TGF- β 1 regula negativamente la producción de IFN- γ y es también un factor inhibitorio de la activación de macrófagos producido en altas cantidades por los monocitos en pacientes con tuberculosis. Finalmente, la IL-4 y otros marcadores de actividad Th2 tales como IgE e IgG4, se encuentran frecuentemente aumentados en pacientes con tuberculosis avanzada.

1.2 Prolactina: estructura y funciones

La PRL originalmente se identificó como una hormona secretada por la glándula pituitaria, aislada por primera vez en 1932 a partir de hipófisis de. En 1971 fue obtenida de glándulas hipofisarias del humano y hasta 1974 se determinó que era sintetizada y secretada por muchos tejidos extrapituitarios (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998). Se han reportado más de 300 acciones diferentes de la PRL que incluyen la secreción de leche de la glándula mamaria y el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Entre sus efectos sobre las células de los alveolos mamaros está un aumento de la síntesis de lactosa y una mayor producción de proteínas lácteas como la caseína y la lactoalbúmina (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

La PRL, al igual que la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario, forma parte de una familia de hormonas que comparten características relacionadas con su estructura, propiedades funcionales y origen genético con citocinas tipo I. Esta hormona de naturaleza proteínica ejerce diversos efectos biológicos a través de su interacción con receptores específicos de membrana que se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

El PRLR es una proteína transmembranal que pertenece a la familia de los receptores de citocinas tipo I, donde encontramos los receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, GM-CSF, GCSF, EPO y hormona del crecimiento (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998).

En humanos, el gen que codifica a la PRL se encuentra ubicado en el cromosoma 6 consta de 4 intrones y 5 exones (aproximadamente de 10 Kb). En bovinos, se encuentra ubicado en el cromosoma 23 (Gene ID: 280901). La homología entre ambas especies es del 76% (Sinha 1995). La proteína sintetizada consta de 227 aminoácidos (aa) de la cual se corta el péptido señal de 28 residuos quedando la forma madura de 199 aa con un peso de 23kD. En su estructura primaria se destacan 6 grupos cisteína entre los que se forman 3 puentes disulfuros en las posiciones: 4-11, 58-174 y 191-199, originando así los 3 lazos que caracterizan la estructura secundaria y determinan la distribución espacial de la estructura terciaria, de las que derivan las propiedades biológicas e inmunológicas de esta hormona.

La PRL de 23 kDa es considerada de manera sistémica como una hormona y de manera local como una citocina (Goffin, Binart et al. 2002; Chilton and Hewetson 2005).

Aunque la forma principal de la prolactina en la glándula pituitaria es de 23 kDa, las variantes de la PRL se han caracterizado en muchos mamíferos, incluyendo seres humanos. Las variantes de la PRL pueden ser resultados de *splicing* alternativo del transcrito primario, proteólisis y/o modificaciones postraduccionales. Por *splicing* alternativo han sido caracterizadas las variantes de 16, 21 y 25 kDa. Sin embargo, también se han caracterizado modificaciones postraduccionales principalmente proteólisis, encontrándose variantes de 14 y 22-kDa, el fragmento de 14 kDa se ha identificado en el hipotálamo y la actividad biológica de las acciones es similar con el fragmento de 16 kDa. El fragmento de 16 kDa fue descrito por primera vez en extractos de la glándula pituitaria de rata. Posteriormente, se ha encontrado en la glándula pituitaria de ratón y humanos, así como en el plasma humano. El fragmento de la PRL de 16 kDa es un producto derivado de la acción enzimática de serin-proteasas, localizadas en las cisternas de Golgi y secretadas en gránulos por los lactotropos, estas enzimas se unen a la PRL y alteran su conformación (Sinha 1995; Goffin, Bernichtein et al. 2005). Las variantes pueden antagonizar algunas funciones biológicas de la PRL nativa de 23 kDa, por ejemplo se sabe que ésta tiene propiedades angiogénicas, en contraste, la variante de 16 kDa tiene funciones antiangiogénicas (Aranda, Rivera et al. 2005; Lkhider, Seddiki et al. 2010). Otras modificaciones postraduccionales son dimerización y polimerización que dan origen a variantes de alto peso molecular detectadas en la hipófisis y plasma de la mayoría de las especies estudiadas, con un peso molecular de más de 45 kDa. Estas variantes de alto peso molecular representan dímeros de la PRL conjugada con otras proteínas o polímeros de forma covalente o no covalente. Las uniones covalentes pueden ser uniones disulfuro entre dos moléculas de la PRL o residuos glúcidos. Se ha observado que estas formas tienen capacidad biológica reducida y baja afinidad a su receptor en comparación con la monómera. Hay evidencias de que están involucradas en los mecanismos de almacenamiento y secreción de la PRL (Mena, Hummelt et al. 1992; Sinha 1995). La PRL conjugada con proteínas unidoras ha sido identificada en leche de humano y conejo al igual que en suero de rata. Estas proteínas tienen una alta homología con el dominio extracelular del receptor de la PRL (Cohen, Guillaumot et al. 1993). Se ha propuesto que ésta es la forma como se transporta la PRL producida por las células epiteliales mamarias a través de la célula alveolar epitelial hacia el lumen donde se produce la leche materna. También sería como se transporta la PRL

producida en la decidua a través de las células del corion y del amnios y llega al fluido amniótico. A nivel de los ventrículos cerebrales la PRL producida en el cerebro pasa al líquido cefalorraquídeo unida a proteínas unidoras, PRLBP (Ben-Jonathan, Mershon et al. 1996). La PRL unida a IgG se ha identificado en el líquido amniótico y en torrente sanguíneo unida por puentes disulfuro, esta forma es tiene un peso molecular de más de 100 kDa (Cavaco, Leite et al. 1995). Las modificaciones postraduccionales podrían determinar las diferentes variantes de la hormona, esta puede glicosilarse en los restos de asparagina.

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales caracterizada en las hormonas de la pituitaria. Los glúcidos más representativos son la fucosa y la manosa, que pueden estar unidos covalentemente a la PRL. La glicosilación es la modificación covalente más frecuente de esta proteína (Spiro 2002). No se sabe con exactitud cuál es el significado fisiológico de la glicosilación, una posibilidad es que la glicosilación determine el sitio en el cual pueda ocurrir la proteólisis y de este modo, producir fragmentos con funciones específicas. Se ha identificado una variante de la PRL glicosilada en plasma de mujeres embarazadas con un peso de aproximadamente 60 kDa, esta proteína demostró estar unida covalentemente, ya que no es disociada en condiciones desnaturalizantes de electroforesis y al dar tratamiento con glicosidasa se aprecia una PRL de 25 kDa (Champier, Claustrat et al. 1987). La glicosilación en asparagina 31 es característica de la unión covalente de la PRL y residuos glúcidos, se ha determinado que este sitio de unión origina una variante de 60 kDa tanto en humanos como en bovinos (Barnes, Hansen et al. 1984; Lewis, Singh et al. 1989; Sinha 1995; Haynes 1998). Interesantemente se ha demostrado que la glicosilación de la PRL modula inversamente su actividad funcional. Finalmente, los hidratos de carbono pueden enmascarar los sitios antigénicos de las proteínas; en la rata se ha identificado una forma glicosilada unida covalentemente en asparagina 31 con un peso de 26 kDa (Bollengier, Mahler et al. 2001).

La PRL también puede unirse covalente con un grupo fostato en serinas y treoninas; esta variante de PRL se ha identificado en hipófisis de rata, vaca y también en glándula mamaria y leche materna humana (Walker 1994). Se ha sugerido que tiene una actividad biológica menor que la PRL no fosforilada y también tiene bajo efecto en la proliferación de las células Nb2 (Coss, Kuo et al. 1999).

Por otra parte, se ha demostrado la expresión de la PRL y su receptor en células distintas de las hipofisarias (Ben-Jonathan, Mershon et al. 1996). Se han reportado múltiples variantes de la PRL (14, 16, 21, 23 y 60 kDa) expresadas en células endoteliales de vena umbilical humana (Nevalainen, Valve et al. 1997; Corbacho, Macotela et al. 2000). En células mononucleares de sangre periférica se ha detectado una variante de 60 kDa en pacientes con lupus eritematoso (Larrea, Martínez-Castillo et al. 1997). La expresión del gen de la PRL en células linfoides podría contribuir en la patogénesis de enfermedades sistémicas (Paraiba, Soares et al. 2010). Pero los mecanismos que regulan la expresión del gen de la PRL de origen linfocitario no han sido determinados. El transcrito de la PRL se expresa constitutivamente en los linfocitos y contiene 150 bases más que el transcrito de la hipófisis en su región 5', esto es debido a la presencia de un exón adicional no codificante (exón 1a) e idéntico en secuencia al ADNc presente en otros tejidos extrahipofisarios como la decidua placentaria (Gerlo, Davis et al. 2006). Si bien el mensajero en tejidos extrahipofisarios es más largo que su homólogo en la hipófisis, la presencia de la región adicional no modifica la secuencia de la proteína nativa, que resulta idéntica a la de la PRL hipofisaria. El promotor de la PRL hipofisaria humana contiene tres sitios de unión para el factor de transcripción Pit-1 localizados inmediatamente antes del sitio de inicio de la transcripción (exón 1) que regulan su transcripción (Ben-Jonathan, Mershon et al. 1996). En la transcripción de la PRL en los tejidos extrahipofisarios al parecer hay un cambio del sitio de inicio (exón 1a) y la regulación se debe a un promotor distal alternativo. Se ha sugerido que el mecanismo de control de la expresión de la PRL extrahipofisaria es tejido-específico (Ben-Jonathan, Mershon et al. 1996). Mientras que los tratamientos dopaminérgicos con bromocriptina (agonista de receptores D2 de la dopamina) no modifican la expresión de la PRL. Se ha observado que la dexametasona y la ciclosporina inhiben su expresión en linfocitos (Gellersen, DiMattia et al. 1989; Reem, Ray et al. 1999). La existencia de variantes de la PRL de origen linfoide puede ser consecuencia del estado fisiológico o patológico del individuo y pueden tener implicaciones funcionales.

1.2.1 Regulación de la prolactina

La síntesis de la PRL es constante y los niveles en suero en los seres humanos varían entre 3-15 ng/ml en hombres, de 3.8 a 23.2 ng/ml en mujeres no embarazadas y 95-473 ng/ml en embarazada tercer trimestre (Felig Philip 2001). En las vacas los niveles antes del parto varían de 10-20 ng/ml, después de la succión del becerro o el estímulo por la ordeñadora es de 160 ng/ml; sin embargo, 8 minutos después desciende a niveles basales 60-100ng/ml (Eley, Thatcher et al. 1981; Negrao 2008). En la rata los niveles se mantienen constantes en la preñez temprana 70-100 ng/ml, descienden en la preñez tardía y aumentan 2 días antes del parto (Grattan, Steyn et al. 2008).

Otro mecanismo por el cual se regula el aumento de la PRL está determinado por el lactógeno placentario; en la preñez temprana y media impacta las neuronas dopaminérgicas induciendo dopamina. Sin embargo, al fin de la gestación las neuronas dopaminérgicas son insensibles a retroalimentación negativa de la PRL y al efecto del lactógeno placentario, probablemente como consecuencia de la supresión de su receptor o por la expresión de isoformas cortas. La hiperprolactinemia resultante antes del parto favorece el desarrollo de la glándula mamaria, el comportamiento materno y la síntesis de leche (Grattan and Kokay 2008; Grattan, Steyn et al. 2008). Otros factores externos importantes que alteran la liberación de la PRL son la luz, la audición, el olfato y el estrés (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

La PRL regula tanto su síntesis como su liberación por un mecanismo de autorregulación. El aumento de la PRL es regulado por retroalimentación negativa de esta hormona en las neuronas dopaminérgicas de la región tuberoinfundibular que responden secretando dopamina a la sangre portal hipofisiaria (Demaria, Nagy et al. 2000; Grattan and Kokay 2008; Grattan, Steyn et al. 2008). En la adenohipófisis, la dopamina se une a receptores de membrana (D2) de los lactotrofos hipofisarios. El mecanismo por el cual la PRL induce la secreción de dopamina en el hipotálamo está determinado por la isoforma larga del PRLR, activando la vía de señalización JAK2/STAT5b que a su vez induce la transcripción del gen de tirosina hidroxilasa. Esta enzima es responsable de catalizar la conversión del aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA) (Anderson, Beijer et al. 2006; Anderson, Barclay et al. 2006). La DOPA es el precursor de la dopamina, que a su

vez es también el precursor de la noradrenalina y la adrenalina (Berczi 2010; Ley, Weigert et al. 2010).

1.2.2 Mecanismo de acción de la PRL a través del PRLR

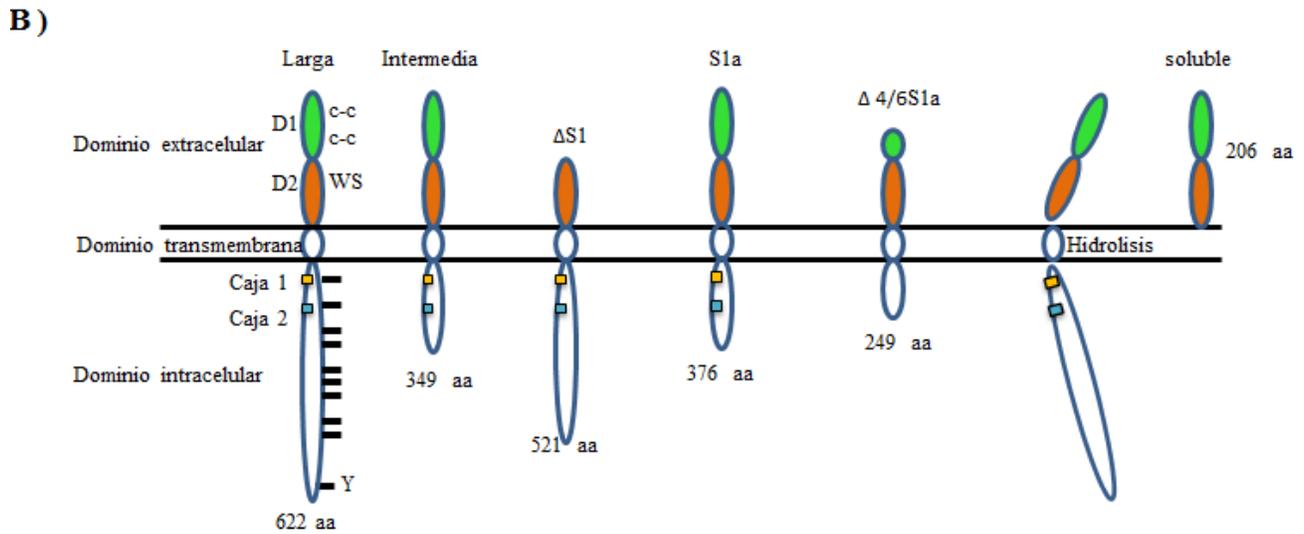
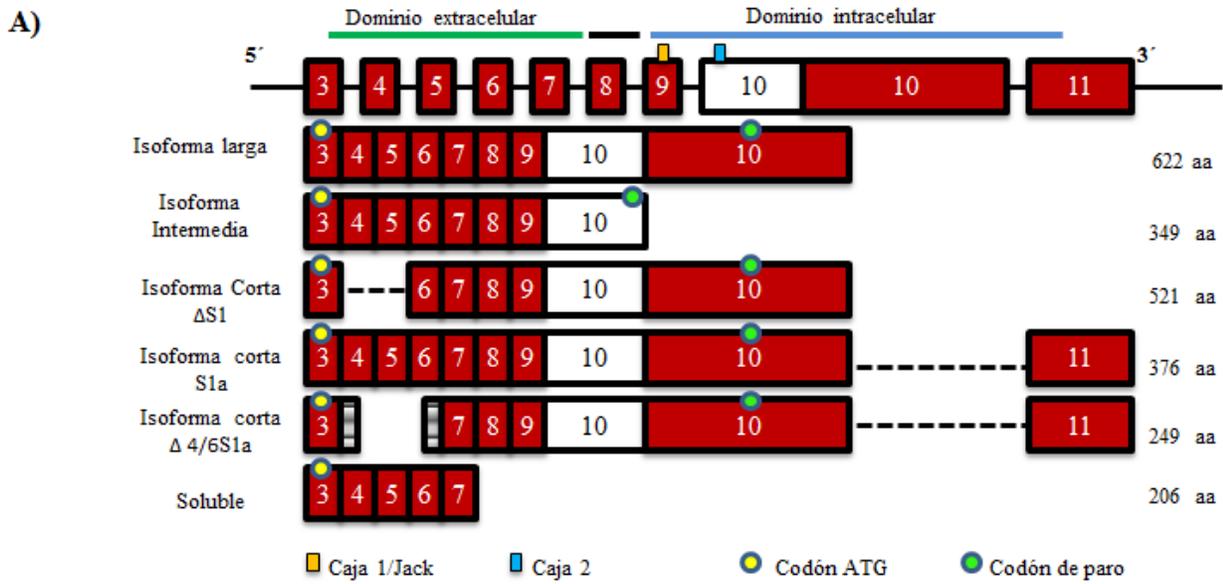
La acción de la PRL se produce por interacción con un receptor de membrana de la familia de receptores de citocinas tipo I (Dagil, Knudsen et al. 2012). Existen por lo menos 10 isoformas del PRLR en humanos: la forma larga (FL), intermedia (FI), Δ S1 y otras 7 isoformas cortas clasificadas por su peso y estructura molecular. Las formas cortas incluyen las isoformas S1a, S1b, Δ 4- SF1b, Δ 7/11, Δ 4- Δ 7/11 y dos isoformas solubles (SS1 y SS2) (Wei and Wei 2010). También existe la proteína unidora de prolactina (PRLBP) identificada en suero y leche humana (Kline and Clevenger 2001). Las diferentes isoformas del PRLR son originadas por distintos mecanismos como: *splicing* alternativo, retención de intrones, sitios alternativos de inicio y paro de la transcripción, delección y proteólisis (Trott, Hovey et al. 2003; Wei and Wei 2010). Las formas cortas podrían antagonizar y modular la señalización de las isoformas largas del PRLR formando heterodímeros y comprometiendo al ligando, considerándose dominantes negativas (Tan and Walker 2010). Se ha sugerido que las formas solubles podrían tener la función de incrementar la vida media de la PRL, estabilizando su estructura, para constituir un reservorio de la hormona en la circulación (Kopchick and Andry 2000; Horseman 2002).

El gen que codifica para el PRLR en los humanos está localizado en el cromosoma 5 en la región p13-p14 con una longitud de 182 kb (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998). Contiene 11 exones y en el extremo 5'-UTR, contiene 6 regiones no codificantes en el exón 1 (E13, E1N1, E1N2, E1N3, E1N4 y E1N5), en el exón 3 se han identificado múltiples promotores y puntos de inicio de la transcripción (Hu, Zhuang et al. 1999; Hu, Zhuang et al. 2002; Trott, Hovey et al. 2003; Wei and Wei 2010). El dominio extracelular se ubica entre los exones 3, 4, 5, 6 y 7, la porción extracelular tiene dos zonas muy destacadas: D1 y D2; la zona D1 posee dos grupos de cisteínas en los residuos a.a. 12 y 22, y otros en las posiciones 51 y 62; la zona D2 tiene un motivo pentapéptido WS. El dominio transmembrana se ubica entre el exón 8 y 9. El dominio intracitoplasmático está ubicado entre los exones 10 y 11, en este dominio es donde se encuentran las diferencias de las distintas isoformas del receptor de la PRL. No obstante existen zonas comunes: Caja 1 formada por prolina y tirosinas. En la forma larga hay 6 tirosinas entre la caja 1 y el

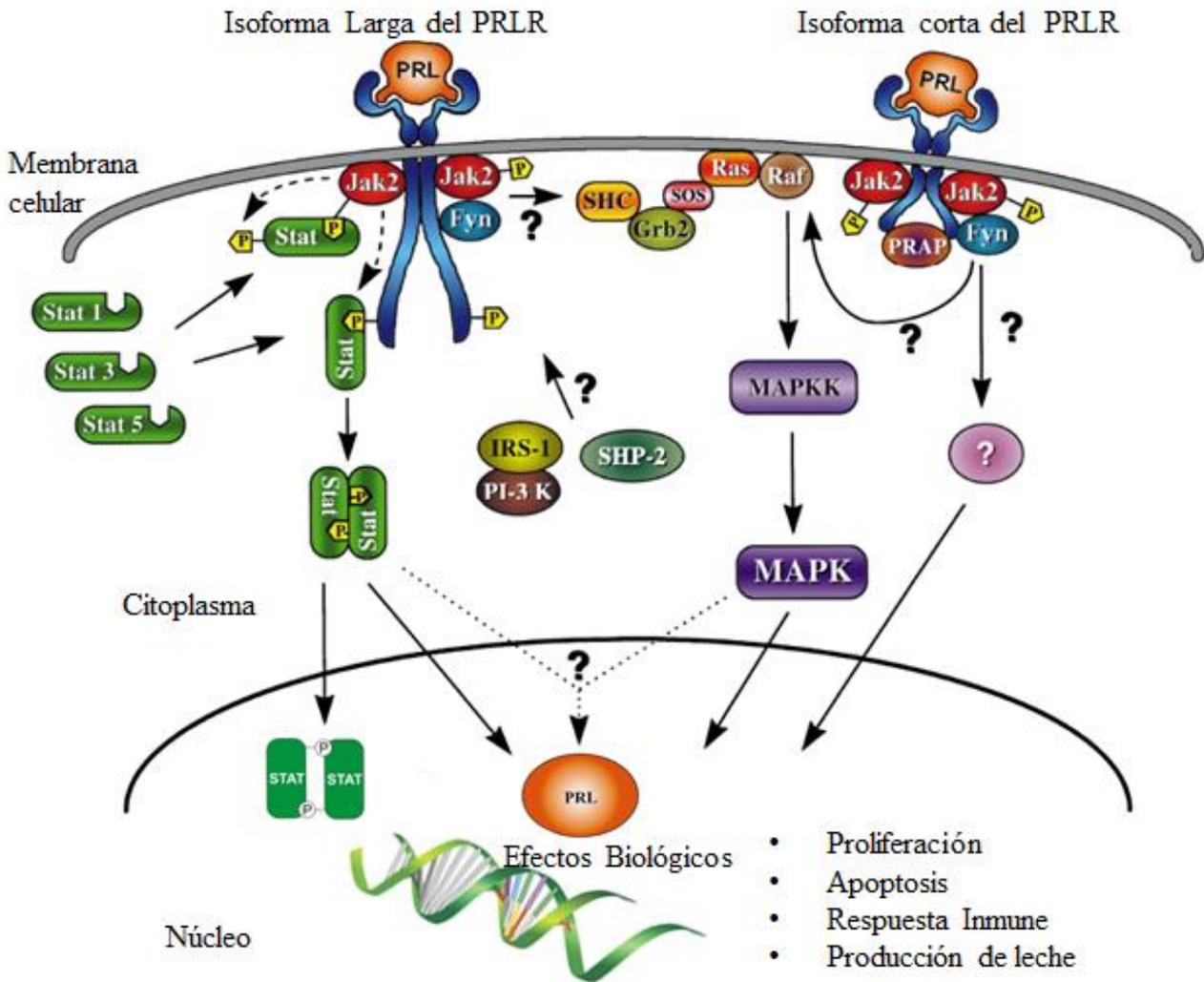
extremo carboxilo terminal, determinantes en el proceso de activación del PRLR (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998; Freeman, Kanyicska et al. 2000; Clevenger, Gadd et al. 2009). La PRL se une al PRLR en sus dominios D1 y D2 y como consecuencia éste se dimeriza.

Una vez que el complejo PRL/PRLR se dimeriza, activa una serie de proteínas unidas a la caja 1, principalmente activa Jak2, la cual induce la activación de otras proteínas activadoras de la transcripción: Stat 1, 3, y 5. La STAT activada (fosforilada en tirosina) se disocia del receptor y se homodimeriza. La homodimerización se produce entre un residuo de tirosina fosforilada del STAT con el dominio SH2 (sitio activo para la fosfatasa) de otra molécula de STAT. El dímero se transloca al núcleo y se une al ADN, en los promotores de los genes blanco y produce la respuesta biológica (Bernichtein, Touraine et al. 2010). El pleiotropismo de la PRL depende del STAT que haya activado, por eso la PRL tiene tantas acciones diferentes. Por ejemplo, en la producción de caseína se dimeriza el STAT5 y se ha sugerido que existen otras rutas para la transducción de la señal generada por PRL activadas alternativamente durante distintas situaciones fisiológicas y patológicas.

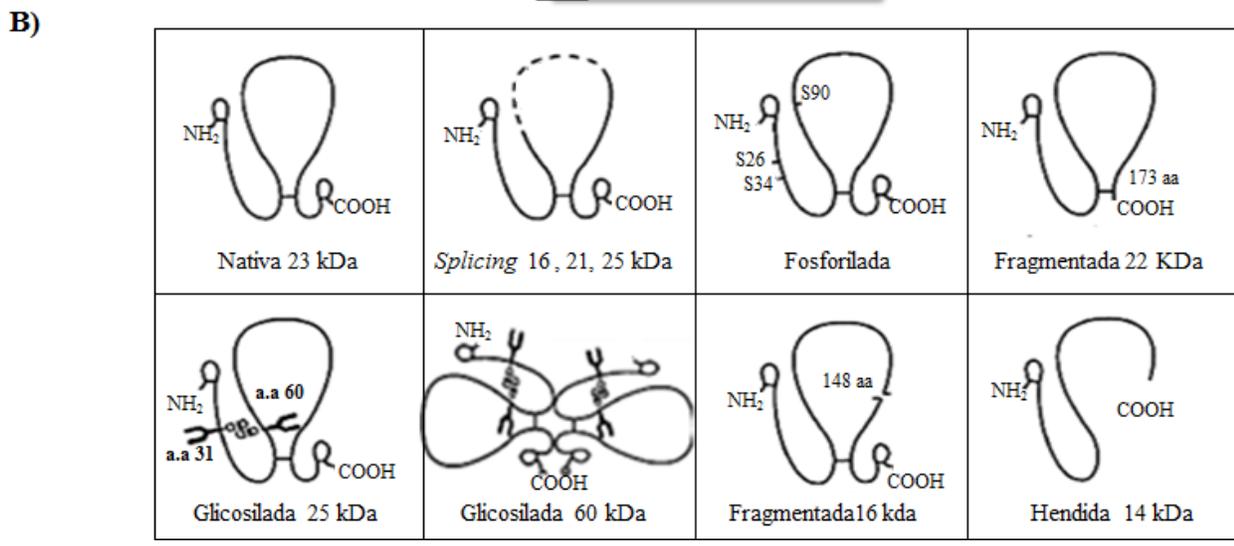
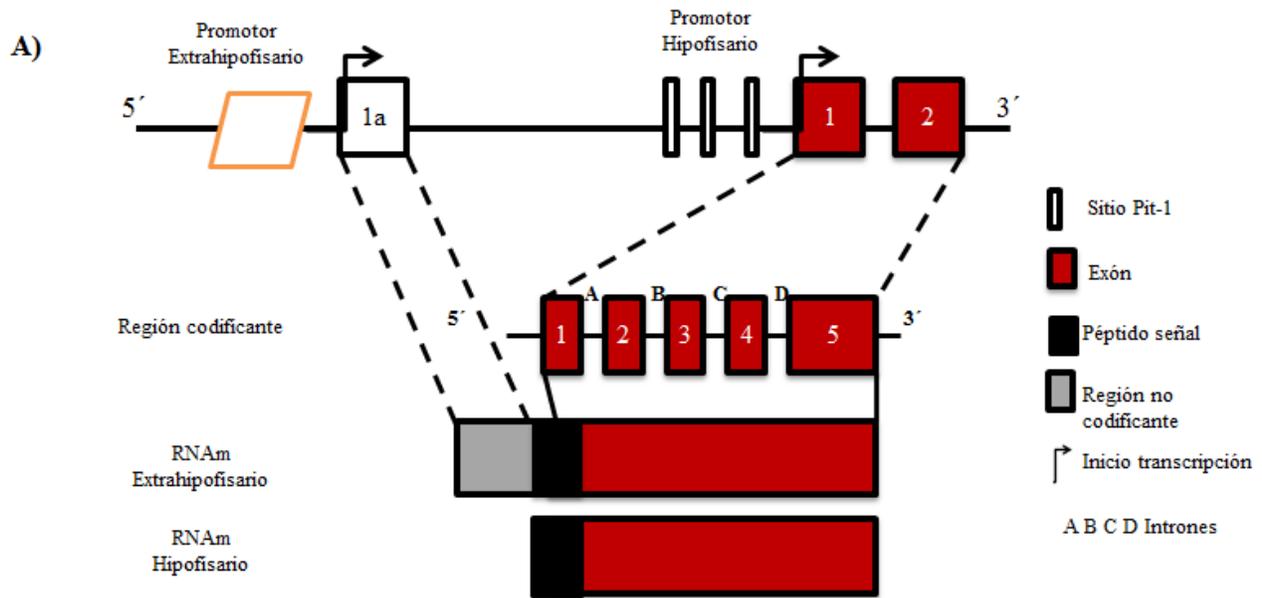
En la especie bovina se han reportado dos 2 isoformas del PRLR: una corta de 55 kDa, o menor, y una larga de más de 100 kDa cuyo peso molecular se ve afectado por diversas modificaciones postraduccionales, tales como: la glicosilación, la fosforilación y/o la ubiquitinación que podrían afectar su peso y funcionalidad (Schuler, Nagel et al. 1997). El gen que codifica para el PRLR se encuentra en el cromosoma 20 específicamente en la banda 20q17 y se expresa en una amplia gama de células y tejidos (Gene ID: 281422).



Esquema 1. Representación esquemática del gen del PRLR. A) Diferentes isoformas del PRLR generadas por *splicing* alternativo del gen. B) Estructura de las diferentes proteínas del PRLR identificadas en células de humano. Modificado de (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998).



Esquema 2. Vías de señalización asociadas a las diferentes isoformas del PRLR. La isoforma larga del PRLR fue asociada a la vía de señalización JAK2/STAT 1,3 y 5. La isoforma corta del PRLR no ha sido determinada la vía de señalización que desencadena. Modificado de (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998).



Esquema 3. Estructura del gen de la PRL. Regiones codificante y no codificante, sitios de inicio y los productos de la transcripción de los promotores hipofisario y extrahipofisario. También se muestran el producto de la traducción y algunas de las variantes moleculares de la PRL. Modificado de (Freeman, Kanyicska et al. 2000; Gerlo, Davis et al. 2006).

Tabla 1. Variantes moleculares de la prolactina.

Variante o isoforma	Peso molecular (kDa)	Tejido de origen	Localización
Nativa	23.5	Hipófisis	Hipófisis y plasma
Glicosilada	25	Hipófisis	Hipófisis y plasma
Hendida	16	Hipófisis, hipotálamo	Hipófisis, cerebro, glándula mamaria, próstata y plasma
Grande	46	Hipófisis	Hipófisis y plasma
Grande-grande	> 100	Hipófisis	Hipófisis y plasma
Variantes linfocitarias	11, 16, 23-25, 27, 60	Linfocitos	Plasma y medio de cultivo de PBMC
Otras variantes	8 y 22	Hipófisis	Hipófisis

Modificado de (Méndez, Cariño et al. 2005)

1.2.3 La prolactina y el sistema inmunológico

La relación entre la prolactina y el sistema inmune se evidenció desde 1930, cuando *Smith* observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia (Nagy, Kacsoh et al. 1986). La función inmunomoduladora de la PRL fue descubierta en aves y ratones mediante la manipulación *in vivo* de las concentraciones plasmáticas de esta hormona (Berczi, Nagy et al. 1981). Se han reportado diversas variantes de la PRL en células linfoides, la de 11 kDa en timocitos y linfocitos, la de 60 kDa en células mononucleares (Larrea, Martínez-Castillo et al. 1997). Diversos informes en la literatura demuestran que los linfocitos sintetizan PRL (Hartmann, Holaday et al. 1989). En esplenocitos murinos (linfocitos obtenidos de bazo) se identificó una molécula con actividad biológica en un bioensayo con la línea celular Nb2, dependiente de la PRL para su proliferación; y cuyo efecto fue inhibido en presencia de un anti-PRL (Montgomery, Zukoski et al. 1987). Por hibridación *in situ*, se ha revelado el ARN mensajero de la PRL en diferentes tejidos linfoides (Wu, Devi et al. 1996). Existen diversos reportes que involucran a la PRL en la proliferación y diferenciación de diferentes células del sistema inmune, lo que fundamenta su papel inmunomodulatorio (Peeva, Michael et al. 2003). La PRL previene la apoptosis inducida por el óxido nítrico y dexametasona en la línea celular Nb2 (Peirce and Chen 2004). También se ha determinado su participación en la modulación

de la síntesis de diferentes mediadores inflamatorios incluyendo óxido nítrico, prostaglandinas y citocinas, y se sabe que contribuye a aumentar los niveles del receptor de la IL-2 (Meli, Raso et al. 1997). Su efecto inmunomodulador podría estar asociado a la activación de la vía JAK-Stat1, que estimula la expresión de genes asociados a la respuesta inmune como IRF-1, encargado a su vez de activar la expresión de genes blanco como: IFN- γ , iNOS y NRAMP1; los cuales son determinantes en la actividad bactericida contra patógenos intracelulares. Estas moléculas juegan un papel importante en la respuesta Th1, activando la función de células dendríticas, macrófagos, y la diferenciación de linfocitos T y NK (Taniguchi, Ogasawara et al. 2001). Sin embargo, la prolactina también puede activar la vía JAK-Stat5 que determina la supresión transcripcional de IRF-1, coadyuvando a mantener la homeostasis del sistema inmune frente a una respuesta de tipo Th1 (Ramana, Chatterjee-Kishore et al. 2000). También se observó que la fosforilación de Stat5b inhibe la expresión de IRF-1 y reduce la expresión de la iNOS (Corbacho, Macotela et al. 2003). Se ha demostrado *in vitro* que una mezcla de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) inducen la expresión del PRLR en fibroblastos pulmonares y la subsecuente activación de la vía JAK-Stat1. Con este antecedente, estos mismos autores estudian en un modelo *in vivo* la función del PRLR en una respuesta de fase aguda, utilizando ratones inoculados con lipopolisacárido (LPS). Durante la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) características de este modelo, se determinó que la expresión del PRLR fue específica de tejido. Se observó baja expresión del PRLR en hígado y pulmón, pero alta expresión en órganos linfoides primarios (timo y bazo). Estos resultados sugieren que la respuesta inflamatoria puede activar vías de señalización alternativas mediadas por la PRL en órganos del sistema inmune que expresan distintas isoformas del PRLR (Corbacho, Valacchi et al. 2004).

Tabla 2. Acciones biológicas de la prolactina.

Órganos blanco	Efectos
Glándula mamaria	Regula el desarrollo y crecimiento celular, aumenta la síntesis de proteínas y carbohidratos de la leche, regula el tránsito de IgA a través del epitelio celular
Hígado, piel y Nb2	Estimula el desarrollo, crecimiento celular y contribuye a la progresión del cáncer
Gónadas	Regula acciones luteotrópicas y luteolíticas, inhibe la esteroidogénesis y estimula síntesis de receptores para gonadotropinas
Hipotálamo	Estimula el recambio de dopamina, disminuye la secreción de GnRH
Páncreas	Estimula la proliferación y aumenta la actividad de las células β para la secreción de insulina
Próstata	Estimula la proliferación, aumenta IGF-1 y sus receptores y los receptores para andrógenos
Riñón Sistema inmunológico:	Regula el equilibrio de agua y electrolitos
Células NK	Contribuye a la proliferación, diferenciación y activación de NK contribuyendo a la síntesis de IFN- γ
Granulocitos	Estimula la expresión del gen de IRF-1 y la síntesis de la iNOS
Linfocitos	Estimula la proliferación, la síntesis de IFN- γ , inhibe la apoptosis, regula la síntesis de la iNOS y estimula la expresión del gen de IRF-1
Monocitos	Induce la diferenciación y favorece la presentación del antígeno

Modificado de (Méndez, Cariño et al. 2005)

1.2.4 Prolactina y su impacto en la patogénesis de trastornos inflamatorios

La relevancia clínica de la PRL sobre el sistema inmunológico no se conoce bien en la actualidad, pero existe la relación esta hormona en el curso de ciertas enfermedades crónicas. Se ha sugerido que la PRL está involucrada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como el Lupus sistémico eritematoso y la artritis reumatoide (Jacobi, Rohde et al. 2001; Vera-Lastra, Mendez et al. 2003; Garcia, Colombani-Vidal et al. 2004). La mayoría de pacientes con lupus eritematoso generalizado y artritis reumatoide cursan con incremento en las concentraciones de la PRL circulante (hiperprolactinemia), característica más evidente durante la exacerbación de las manifestaciones y signos clínicos de ambas enfermedades. El aumento de estas concentraciones sugiere la participación de fuentes extrahipofisarias de la PRL circulante, principalmente linfocitos. Sin embargo, se desconoce la etiología del incremento en las concentraciones de la PRL circulante. Un estudio con mujeres diagnosticadas con lupus eritematoso sistémico demostró altos niveles de PRL sérica (35-100 ng/ml), este incremento fue atribuido a la síntesis de la PRL autocrina por los linfocitos de estos pacientes enfermos (Gómez-Pérez and Rosa Roa 2003; Chuang and Molitch 2007). Paradójicamente, el tratamiento clínico es el uso de agonistas dopaminérgicos los cuales no influyen en los niveles de la PRL, lo que demuestra que la fuente del aumento de la PRL no es de origen hipofisario (Alvarez-Nemegyei, Cobarrubias-Cobos et al. 1998). Recientemente, se descartó a los linfocitos como el origen de la hiperprolactinemia en lupus eritematoso. Sin embargo, no se descarten otras células de la respuesta inmunitaria (Paraiba, Soares et al. 2010).

La prolactina también ha sido asociada a patógenos intracelulares. Hace más de 2 décadas se realizó un trabajo en ratones tratados con bromocriptina que causa la baja de la PRL hasta 2 ng/ml, al ser desafiados con *M. bovis* o *Listeria monocitogenes* se observó que en estos ratones no había activación de los esplenocitos y macrófagos al ser estimulados con PPD y no producían INF- γ , mostrando mayor susceptibilidad a la infección. Este efecto fue revertido con la aplicación de 100 ng/ml de PRL ovina (Bernton, Meltzer et al. 1988).

En humanos se ha sugerido que la defensa del huésped a la tuberculosis está determinada por la interacción de los sistemas neuroinmunoendocrino. Se ha determinado que la respuesta inflamatoria con la prolongada producción de citocinas principalmente

INF- γ , estimula al eje hipotálamo-hipófisis-adrenales para la liberación de hormonas esteroideas que favorecen el desarrollo de un perfil Th2 (Bottasso, Bay et al. 2007; Bottasso, Maria Luisa et al. 2010). Sin embargo, también se ha identificado en suero de pacientes con diferentes grados de tuberculosis un aumento en hormonas proteicas como la hormona del crecimiento y de la PRL, en función del grado de avance de la enfermedad. Aunque los niveles de la PRL se observaron dentro de los límites fisiológicos, no se ha determinado el origen del aumento y efecto biológico de la PRL en la patogénesis de la tuberculosis (Bottasso, Bay et al. 2009; Bottasso, Maria Luisa et al. 2010).

La PRL también ha sido relacionada con infecciones parasitarias como un potente modulador positivo de la inmunidad contra algunos parásitos protozoarios. Está bien establecido que la PRL estimula la producción de IFN- γ y otras citocinas proinflamatorias durante infecciones por *Toxoplasma gondii*, *Leishmania sp.* y *Acanthamoeba castellanii*. Estudios recientes sugieren que la PRL humana puede ser un regulador de la actividad antiparasitaria contra *Plasmodium falciparum*. Por otra parte la hiperprolactinemia asociada con la gestación puede tener una contribución importante a la reactivación de infecciones latentes causadas por parásitos helmintos, como *Ancylostoma sp.*, *Necator sp.*, y *Trichostrongylus*. Un aumento de la prolactina circulante durante la última etapa de gestación y la lactancia en las ovejas infectadas con *Haemonchus contortus*, promueve el aumento de la producción de huevos del parásito al parto. Por lo tanto, la PRL podría ser un regulador de la inmunidad a los parásitos (Plocinski, Dzitko et al. 2007).

Durante el curso de la infección por el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*, en un modelo de ratas se determinó que el sistema inmune del huésped interactúa con el sistema endocrino, sugiriendo que la PRL podría revertir la inmunosupresión causada por la infección parasitaria. Los datos demuestran que la PRL induce la proliferación de los linfocitos T, activación de macrófagos y la producción de óxido nítrico (NO), lo que lleva a una reducción en el número de tripomastigotes en sangre. La PRL puede ser considerada como una hormona capaz de regular el sistema inmune del huésped, y reducir los efectos patológicos de la infección por *T. cruzi* (Filipin Mdel, Brazao et al. 2011).

1.2.5 Factores neuroendocrinos que regulan la respuesta inmune.

La comunicación entre el sistema nervioso central, endocrino e inmunológico ocurre a través de mensajeros químicos secretados por células nerviosas, órganos endocrinos y células inmunes. Lo que constituye una red de regulación fisiológica para mantener el equilibrio homeostático y la salud (Berczi 2010; Bellavance and Rivest 2012). La interacción de los sistemas nervioso, endocrino e inmune deriva de observaciones de la integración entre neurotransmisores como la norepinefrina, neuropeptidos como encefalinas, neurohormonas como adrenocorticotropina y hormonas adrenales. Esta integración afecta la función inmune ya que los receptores para estas moléculas están presentes en células inmunes como: neutrófilos, linfocitos y macrófagos (Reiche, Nunes et al. 2004; Sun, Ramnath et al. 2007; Berczi 2010; Bellavance and Rivest 2012). Estudios recientes demuestran que los neurotransmisores como la norepinefrina tienen la capacidad de polarizar células inmunes de un perfil M1 a M2 dependiendo de la isoforma del receptor a norepinefrina (α -2AR y β -2AR) (Ley, Weigert et al. 2010).

El eje hipotálamo-pituitario-adrenal se activa y sirve como el principal regulador de reacciones inflamatorias, el desarrollo de la enfermedad o la cicatrización de heridas (Kerschensteiner, Meinl et al. 2009). Se sabe que la respuesta de fase aguda es iniciada por un aumento repentino de la IL-1, IL-6 y TNF- α en la circulación. Las citocinas actúan sobre el cerebro, el sistema neuroendocrino y en varios tejidos, lo que conduce a la fiebre y profundos cambios hormonales y metabólicos (Kerschensteiner, Meinl et al. 2009; Herz, Zipp et al. 2010). Las alteraciones en estos sistemas en respuesta a la enfermedad, estrés, o daño metabólico pueden llevar a un desequilibrio en la respuesta inmune y la susceptibilidad a las infecciones o enfermedades autoinmunes (Lorente, Aller et al. 1996; Herz, Zipp et al. 2010). La comunicación mediante moléculas liberadas por el sistema nervioso directamente es una vía por medio de la cual el cerebro puede inducir cambios en el funcionamiento del sistema inmune. Se han descubierto la existencia de terminales nerviosas simpáticas en órganos linfoides (bazo y nodulos linfáticos) que interactúan con macrófagos, células T y células B. Hay estudios que sugieren que el sistema simpático puede influir en el balance Th1/Th2 (Berczi 2010).

La inmunidad natural es una respuesta poliespecífica instantánea a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS). Subconjuntos de células inmunes, así como las células dentro de los sistemas nervioso central y endocrino también expresan receptores para muchos de estos ligandos (Hudson, Christophi et al. 2008). Los PAMPS activan la respuesta inmune innata, que es impulsada y regulada por citocinas, hormonas, neurotransmisores y péptidos (Flierl, Rittirsch et al. 2008; Flierl, Rittirsch et al. 2009). La interacción Neuro-inmune-endocrino pueden alterar el nivel de transcripción de genes determinantes en la respuesta inmune. Se ha demostrado que los macrófagos tiene una regulación autocrina de citocinas como: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CXCR1, IL-10, IL-12, IL-18, IL-15, MIF, MgB1, M-CSF, GM-CSF, TGF- β , NO, PGE2, TXA2. Varias hormonas tienen efectos sobre la activación de los macrófagos: adrenalina, noradrenalina, glucocorticoides, ACTH, PTH, PGE2, estrógeno, progesterona, testosterona, estradiol y la dihidrotestosterona (Ma, Chen et al. 2003). Los monocitos, macrófagos y otras células inmunitarias expresan adrenoreceptores funcionales (Elenkov, Wilder et al. 2000). En macrófagos peritoneales de ratón se ha identificado la síntesis de catecolaminas (norepinefrina o epinefrina) que ejercen una regulación autocrina/paracrina de los macrófagos (Spengler, Chensue et al. 1994; Flierl, Rittirsch et al. 2007; Flierl, Rittirsch et al. 2009). La diversidad funcional de los macrófagos es el reflejo de varias influencias independientes: el carácter genético del individuo, el estado de desarrollo del fagocito mononuclear, el microambiente en el que las células se encuentra, y los tipos de substratos y combinaciones de los mediadores que encuentra allí (Scotland, Patil et al. 2011). Una comprensión completa de los efectos moleculares de la respuesta inmune de las combinaciones de neuropéptidos, neurohormonas y neurotransmisores en todos los niveles ha abierto nuevos enfoques y son esenciales para el diseño de futuras terapias innovadoras basadas en estos principios.

2.- Planteamiento del problema

Existen evidencias de la relación entre el sistema inmune y el endócrino vía múltiples factores de comunicación, como citocinas, neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas. Las investigaciones han demostrado que la PRL juega un papel importante en los procesos de inmunomodulación y autoinmunidad. Sin embargo, no se conoce con certeza el mecanismo a través del cual la PRL ejerce su efecto inmunomodulador y podría estar afectando los procesos inflamatorios directa o indirectamente. La PRL aumenta en el suero de pacientes con TB crónica junto con el IFN- γ , IL-6, IL-10, cortisol, estradiol y la hormona del crecimiento, pero se desconoce si modula la inflamación granulomatosa.

La prolactina además de ser producida por la glándula pituitaria, también es producida y secretada por algunas células del sistema inmunológico. Por lo tanto, esta hormona puede actuar como un modulador paracrino y autocrino del sistema inmune. Sin embargo, no se ha determinado si el efecto modulador de la PRL podría derivar de la expresión de diversas isoformas de su receptor (PRLR) y/o de variantes de la PRL en monocitos y macrófagos, células determinantes en la inmunopatogénesis de la tuberculosis.

El estudio de la PRL y del PRLR en un modelo animal de vacas infectadas con *M. bovis*, así como en monocitos y macrófagos estimulados con *CFP-M. bovis* puede permitir la asociación de ciertas isoformas del PRLR a la patogénesis de la TBb. Así mismo nos ayudaría a entender la participación de la PRL en la fisiología de la respuesta inmunológica de la tuberculosis.

3.- Hipótesis

La PRL participa en la inmunopatogénesis de la tuberculosis, modulando la respuesta inflamatoria Th1, mediante la expresión de diferentes isoformas del PRLR y la síntesis autocrina de la PRL en monocitos y macrófagos.

4. Objetivo general

Analizar la asociación entre isoformas del receptor de prolactina y de la prolactina en diversos órganos de vacas lecheras infectados con *M. bovis* y relacionar la expresión de ambas moléculas en monocitos y macrófagos estimulados *in vitro* con *CFP-M. bovis*.

4.1 Objetivos particulares *ex vivo*

1.-Determinar el patrón de expresión y localización del PRLR/PRL en glándula mamaria y nódulos linfáticos retromamarios de vacas lecheras no rectoras (expuestas) y rectoras (infectados con *M. bovis*) a la tuberculina y al BOVIGAM, durante el periodo seco y lactancia.

2.-Determinar el patrón de expresión del PRLR/PRL en PBMC de vacas lecheras expuestas, rectoras y libres de TBb.

3.-Determinar el patrón de expresión del PRLR/PRL en plasma y suero de vacas lecheras expuestas y rectoras antes y después de ser vacunados con BCG + *CFP.M.bovis*.

4.2 Objetivos particulares *in vitro*

1.-Determinar el patrón de expresión del PRLR/PRL en macrófagos derivados de PBMC de bovinos de un hato libre estimulados con *CFP-M. bovis* en función del tiempo.

2.- Analizar la localización celular del PRLR/PRL en Mo-THP1 estimulados con PRL recombinante y/o *CFP-M. bovis* y bajo condiciones inhibitorias de la unión ligando/receptor en función del tiempo.

3.-Cuantificar la expresión del PRLR/PRL, citocinas proinflamatorias y del óxido nítrico en Mo-THP1 estimulados con PRL y/o *CFP-M. bovis*, respectivamente y bajo condiciones inhibitorias de la unión ligando/receptor en función del tiempo.

5. Materiales y métodos

5.1 Universo de estudio

El presente trabajo se realizó en la unidad de biotecnología médica y farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) y en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud, laboratorio de inmununología de la Universidad de Guadalajara (CUCS-U.de.G), Guadalajara, México.

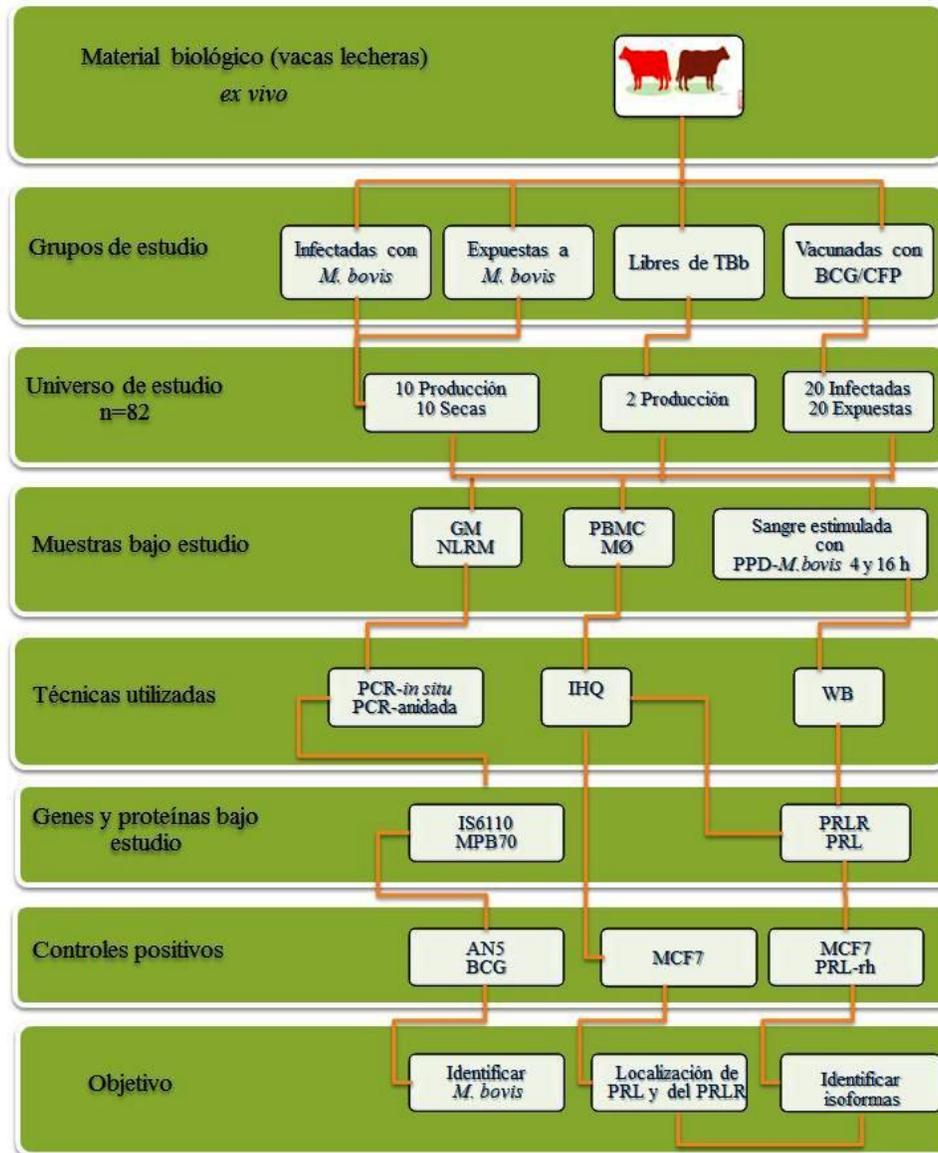


Diagrama metodológico *ex vivo*. BCG=*M. bovis* BCG, CFP= Filtrado de proteínas de cultivo de *M. bovis*, GM= Glándula mamaria, NLRM= Nódulo linfático retromamario, PBMC= Células mononuclear de sangre periférica, MØ=Macrófagos, PPD=Derivado protéico purificado de *M. bovis*, IHQ= Inmunohistoquímica, WB=Western blot, PRLR=Receptor de prolactina, PRL=Prolactina, MCF7= Línea celular de cáncer de mama, PRL-rh= Prolactina recombinante humana, AN5=*M. bovis* AN5.

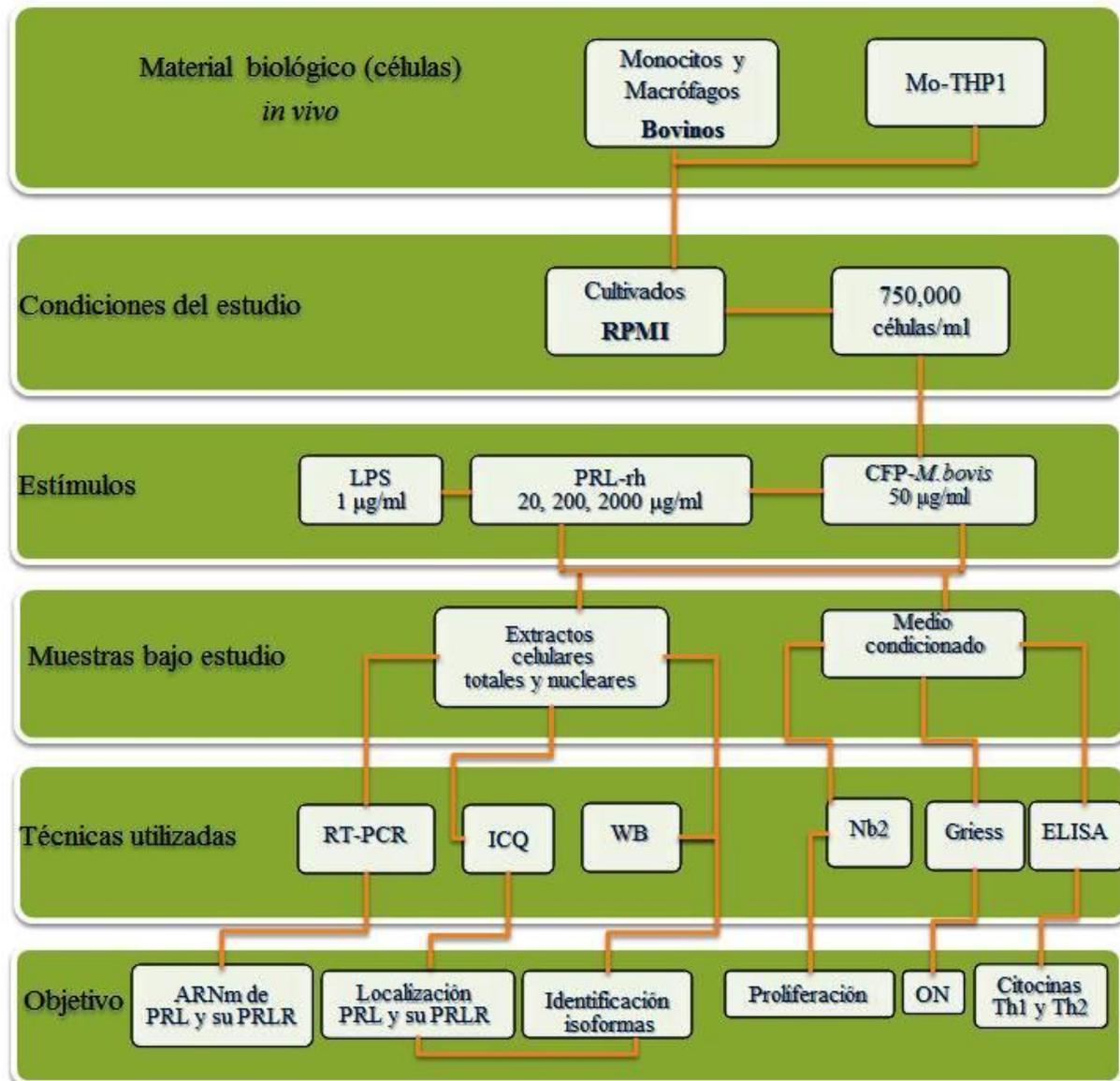


Diagrama metodológico *in vitro*. Mo-THP1= Línea celular monocítica, RPMI=Medio de cultivo, LPS= Lipopolisacárido, CFP= Filtrado de proteínas de cultivo de *M. bovis*, RT-PCR=PCR tiempo real, ICQ=Inmunocitoquímica, WB= Western blot, Nb2=Línea celular linfocítica, Griess=Ractivo para determinar ON, ON= Oxido nítrico, ELISA=Técnica de inmunoensayo.

Tipo de estudio

Categorico, Experimental y Analítico

Consideraciones éticas

A los propietarios de las vacas PPD+ se les pidió que los animales fueran destinados a rastro de acuerdo a la norma NOM-031-ZOO-1995. Las muestras fueron obtenidas en el rastro Municipal de Tonalá y Tlaquepaque, Jalisco apegándonos a las normas, NOM-008-ZOO-1994, NOM-009-ZOO-1994 y los reglamentos internos de los dos centros de sacrificio.

Universo de estudio

- Post mortem las muestras de glándula mamaria y nódulo retromamario de 20 vacas PPD+ (10 en producción y 10 en periodo seco), 20 expuestas a *M. bovis* (10 en producción y 10 en periodo seco) y 2 libres de TBb, fueron congeladas a -20°C para la posterior extracción de acidos nucleicos, fijadas alcohol al 70 % y embebidas en parafina la el análisis por hinmunohistoquímica.
- *In vivo* plasmas y sueros 20 de vacas infectadas con *M. bovis* y 20 expuestas a la infección.

Criterios de inclusión

- Pruebas Diagnósticas: tuberculina y prueba de INF- γ
- Metodo se diagnostico de (BAAR) por la tinción de Ziehl-Neelsen.
- Examen post mortem para identificar lesiones macroscópicas.

Criterios de inclusión controles

Muestras de vacas que proceden de un hato libre de TBb de más de 5 años, negativos a PPD e INF- γ .

Criterios de eliminación

Diagnóstico o clasificación dudosa o no documentada, muestra insuficiente y/o error en el procesamiento de la muestra.

Variables independientes

Lesiones características de TBb en nódulos linfáticos mediastínico, traqueobronquial, retrofaríngeo y pulmón.

Variables Dependiente

Periodo productivo de la vaca lechera (periodo seco y producción)

Expresión de la PRL y el PRLR

Grupo 1.- Vacas en producción naturalmente infectadas con *M. bovis*

En este grupo se utilizó tejido de glándula mamaria y nódulo linfático retromamario de 10 vacas lecheras en producción procedentes de la zona de los altos de Jalisco (zona de alta incidencia de TBb con más del 16.5% de prevalencia), llegaron a rastro por resultar positivas a la tuberculina en el pliegue caudal, a la inspección post-mortem presentaron lesiones sugestivas a TBb, mostraron granulomas principalmente en nódulo linfático retrofaríngeo, traqueobronquial y mediastínico. Sin embargo, en tejido mamario no presentaron lesiones aparentes a TBb.

Grupo 2.- Vacas en periodo seco naturalmente infectadas con *M. bovis*

En este grupo se utilizó tejido de glándula mamaria y nódulo linfático retromamario de 10 vacas lecheras en periodo seco procedentes de la zona de los altos de Jalisco, que llegaron a rastro por resultar positivas a la tuberculina en el pliegue caudal; a la inspección post-mortem presentaron lesiones sugestivas a TBb, mostraron granulomas principalmente en nódulo linfático retrofaríngeo, traqueobronquial y mediastínico. Sin embargo, en tejido mamario no presentaron lesiones aparentes a TBb.

Grupo 3.- Vacas en producción expuestas a la infección por *M. bovis*

En este grupo se utilizó tejido mamario de 10 vacas lecheras PPD- en producción que llegaron a rastro por motivo de desecho; a la inspección post-mortem no presentaron lesiones sugestivas de tuberculosis en ningún nódulo linfático de referencia (retrofaríngeo, traqueobronquial y mediastínico). El tejido mamario y el nódulo linfático retromamario no presentaron ninguna lesión macroscópica a TBb, sin embargo, proceden de hatos cuarentenados de los altos de Jalisco, (zona de alta incidencia de TBb).

Grupo 4.- Vacas secas expuestas a *M. bovis*

En este grupo se utilizó tejido mamario de 10 vacas lecheras PPD- en periodo seco que llegaron a rastro por motivo de desecho; a la inspección post-mortem no presentaron lesiones sugestivas tuberculosis en ningún nódulo linfático de referencia (retrofaríngeo, traqueobronquial y mediastínico). El tejido mamario y el nódulo linfático retromamario no

presentaron ninguna lesión macroscópica a TBb, sin embargo, proceden de hatos cuarentenados de los altos de Jalisco, (zona de alta incidencia de TBb).

Grupo 5.- Vacas lecheras control de zona endémica de TBb

En este grupo se utilizó tejido mamario de 2 vacas lecheras provenientes de un hato certificado libre de tuberculosis y brucelosis, siendo negativas a la prueba de la tuberculina e IFN- γ . Las muestras procedían de animales en el pico de producción (3 meses post parto) de establos ubicados en Ciudad Guzman, Jalisco, México. A la necropsia no mostraron lesiones en ningún órgano.

5.1.2 Colección de muestras de glándula mamaria y nódulo linfático retromamario en rastro

La colección del tejido se realizó inmediatamente después del eviscerado, colectando aproximadamente 1 cm³ de la parte central de la glándula mamaria y nódulo retromamario para evitar contaminación. Inmediatamente fue fijado en alcohol al 70 % y almacenado a temperatura ambiente para ser analizadas por hematoxilina-eosina, Ziehl-Neelsen e inmunohistoquímica. También se colectó un duplicado de muestra en frío para ser almacenada a -20°C para la extracción de ácidos nucleicos.

Por otra parte se obtuvo plasma de 10 animales expuestos y 10 infectados con *M. bovis* del proyecto vacunación estratificada en hatos lecheros con alta prevalencia de TBb en la zona de los altos de Jalisco. Los animales fueron sangrados para estimular 750 μ l de sangre total con 50 μ l de *M. bovis*-PPD (300 μ g/ml) y *M. avium*-PPD (300 μ g/ml del kit comercial (Bovigam Prionics AG) por 4 y 16 horas. El plasma fue cosechado mediante centrifugación a 3 000 g, posteriormente las muestras de plasmas fueron precipitados con alcohol para el análisis del PRLR y la PRL por western blot.

5.1.3 Detección del ADN de *M. bovis* por PCR *in situ*

El tejido mamario fue fijado en alcohol al 70%, embebido en parafina y fijado sobre portaobjetos, posteriormente fue desparafinado por 18 horas a 60°C, secuencialmente fue sumergido en xileno 30 minutos a 37°C y se prehidrató mediante concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 75%, 50% y 25%) y agua destilada durante 10 minutos. Las laminillas fueron incubadas a temperatura ambiente en 0.02 mol/L HCl por 10 minutos, seguido por 2 lavados con PBS (pH 7.3) por 2 minutos. A continuación, se desproteinizaron

los tejidos en 50 ml de PBS con proteinasa K 1mg/ml (Gibco, Paisley, UK) por 30 minutos a 37°C. La proteinasa K fue inactivada 15 segundos a punto de ebullición, inmediatamente se sumergieron las laminillas en ácido acético al 20% por 15 segundos para inactivar la fosfatasa alcalina. El PCR se realizó utilizando 50 ml de buffer 1X (Gibco BRL Life Technologies Grand Island NY USA), 1.5 U Taq polimerasa, 2 mmol/L MgCl₂, 40 mmol/L de una mezcla de dNTPS, 0.2 mmol/L de dUTP marcados con digoxigenina (Boehringer Mannheim, Lewes, UK) y 60 pmol de cada primer utilizado para amplificar la secuencia de inserción IS6110 que es un segmento de ADN específico del complejo *M. tuberculosis*. Las secuencias de los primers fueron: 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-3' (sentido) y 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3' (antisentido). Las laminillas fueron selladas con el Assembli tool (Perkin Elmer, Cambridge, UK). El PCR se realizó usando un termociclador (Hybaid, Ashford, UK). La amplificación comprendió las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 70°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minuto; por 35 ciclos. Los productos de PCR fueron detectados mediante fosfatasa-alcalina conjugada con un anticuerpo contra anti-dioxigenina diluido 1/500 (Boehringer Mannheim, Lewes, UK). La reacción se reveló con el cromógeno 5-Bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato y nitro azul con cloruro de tetrazolio (Boehringer Mannheim, Lewes, UK) diluido 1/50. Las secciones histológicas fueron contrateñidas con *nuclear fast red* para evitar cualquier interferencia con la señal azul generada por el ADN de la micobacteria en el PCR *in situ*.

5.1.4 Detección del ADN de *M. bovis* mediante PCR anidada

Para confirmar el diagnóstico de TBb se utilizó la técnica de PCR anidada para el gen que codifica la proteína MPB70 que ha mostrado buena sensibilidad y excelente especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y bovinos (Estrada, Diaz et al. 2004). A partir de tejido conservado a -20°C se extrajo ADN total, cortando aproximadamente 3 mm³ con una navaja bisturí, se colocó en un tubo de 2 ml donde se le agregaron 400 µl de PBS y se maceró el tejido con un politrón (QIAGEN® Valencia, CA USA). El macerado homogenizado se centrifugó a 10 000 g por 10 minutos, la pastilla obtenida se lavó con 1.5 ml de PBS y se centrifugó nuevamente a 10 000 g por 10 minutos (Biofuge primo R, Survall-Heraeus). La pastilla se homogenizó con 400 µl de TE (100 mM

tris-HCL, pH 8, 10 mm EDTA) y 50 µl de lisozima 20 mg/ml (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), incubándose 1 hora a 37 °C. Luego se agregaron 70 µl de SDS al 10 %, 10 µl de proteinasa K 10mg/ml (Invitrogen™ Corporation Grand Island, NY USA) incubándose 30 minutos a 65 °C. Posteriormente se agregaron 100 µl de NaCL 5M, 80 µl de CTAB al 5% en NaCL 5M, se mezcló y se incubó 10 minutos a 65 °C.

El ADN se extrajo agregando un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1) (Invitrogen™ Corporation Grand Island, NY USA) homogeneizándose y centrifugándose a 10 000 g por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y el ADN se precipitó agregando 0.6 volúmenes de isopropanol absoluto (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), incubándose a -20°C por 30 minutos y centrifugándose a 10 000 g por 10 minutos. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70 % (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), se decantó y se dejó evaporar el resto. La pastilla de ADN se resuspendió en 50 µl de agua (Mili-Q). Se cuantificó en espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Utah SL, USA), se visualizó en geles de agarosa al 0.8 % y bromuro de etidio 0.005% a 100 volts durante 50 minutos.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (ABI, Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en un volumen final de 20 µl, con 10 µl de Ampli Taq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.2 uM de cada primer y 500 ng de ADN. Para descartar la presencia de inhibidores de la PCR y demostrar la viabilidad del ADN se realizó una PCR control con oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 375 pares de bases del gen *Cyb*, que codifica el citocromo b (CYB1 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' y CYB2 5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGC CCT CA-3' 24 CICLOS DE 30'' a 94 °C, 30'' a 58 °C, 30'' 72°C). Una vez optimizado el ADN se realizó la PCR simple para el diagnóstico de TBb, mediante la amplificación de un segmento de 372 pb del gen MPB70, (TB1F 5'-GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA-3' y TB1R 5'-TAC ATG ATT GAC AGC CTG CT 3'- 24 ciclos de 45'' a 94°C, 30 '' a 60°C, 1' a 72 °C). Posteriormente, utilizando una décima parte del producto obtenido en la reacción anterior se procedió a la amplificación de un fragmento de 208 pb del gen de MPB70, dentro de la región de 372 pb, mediante una PCR anidada con los oligonucleótidos (M22/3 5'-GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC -3' Y M22/4 5'-CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C-3' 35 Ciclos de 30'' a 94°C y 1' a

72°C), utilizando la misma temperatura de re-asociación y extensión (Estrada, Diaz et al. 2004).

5.1.5 Análisis de la expresión del PRLR y la PRL por Western blot

Las proteínas totales de los tejidos de GM y NLRM de los animales bajo estudio y la línea celular monocítica THP1 estimulados con *LPS* de *Salmonella entérica* (serotipo Minnesota) (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA) (1 µg/ml) y/o CFP-*M. bovis* donado por el Dr. Raúl Mancilla Jiménez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (50 µg/ml), fueron extraídas con buffer RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, y 0.1% dodecilsulfato de sódio [SDS] (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina, pepstatina, quimostatina, antipaina y fluoruro de fenilmetil sulfonilo [PMSF 100 mM]) (MP Biomedical, LLC. Santa Ana, CA USA) e inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio NA3VO4 1 mM y NAF 50 mM) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Delaware A USA).

El lisado celular fue centrifugado durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL USA) en un lector de microplacas Synergy H4 (BioTek Instruments, Inc. Vermont W, USA). Para desnaturalizar las proteínas se homogenizaron con buffer de muestra 4X (Tris base 3 gr, glicerol 40 ml, SDS 8 gr, B- mercaptoetanol 8 ml) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Philadelphia, PA, USA), azul de bromofenol 0.2 gr, pH 6.8. Y se observaron en geles teñidos con azul de Coomassie. Aproximadamente, 40 µg de proteínas totales fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10 y 12 % y electrotransferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Philadelphia, PA USA).

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% toda la noche y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-PRLR o un anticuerpo monoclonal anti-PRL (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Delaware A USA) toda la noche a 4°C. Después se lavaron las membranas con TBST y se incubaron por 1 hora con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón conjugado con peroxidasa IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Delaware A USA), las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Inc Rockford, IL USA). Como control se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-actina 1:10,000 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

5.1.6 Análisis del PRLR y la PRL por inmunohistoquímica

A partir de tejido fijado en alcohol al 70%, la glándula mamaria y nódulo linfático retromamario fueron embebidos en parafina. Posteriormente, se cortaron secciones histológicas de 4 μm que fueron desparafinadas en un horno de secado a 60°C por 20 minutos y en xileno por 10 minutos (BAKER ANALYZED® A.C.S. Reagent Center Valley, U.S.A), posteriormente fueron rehidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol (100, 96, 80% por 5 minutos) (BAKER ANALYZED® A.C.S. Reagent Center Valley, USA), las muestras fueron sumergidas en citrato de sodio 10 mM pH 6 y calentadas en vaporera (Hamilton Beach) por 30 minutos con la finalidad de exponer los epitopos. Después se lavaron los cortes y fueron tratados con peróxido de hidrogeno al 3% para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena (Dako an agilent Technologies company, USA) para disminuir las uniones inespecíficas se incubaron con una solución de bloqueó (PBS 1X, 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL Life Technologies Grand Island NY USA) y 1% de BSA (Equitech-bio Inc. Kerrville, TX USA) por 1 hora. Posteriormente, se incubó con los anticuerpo anti-PRLR y anti-PRL (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Delaware, CA USA) 1:50 en solución de bloqueó a 4°C durante toda la noche. Después se lavó en TBS por 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario por 60 minutos (Dako an agilent Technologies company, USA). Finalmente las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina y analizadas en un microscopio AxioImager 2 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Las imágenes se capturaron usando una cámara AxioCam MRm y analizadas en el software AxioVs40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

5.1.7 Cultivo celular de Mo-THP1

Se utilizó la línea celular monocitica THP1 obtenida del American Type Culture Collection (ATCC), mantenida en medio RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies Grand Island, NY USA) con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco BRL Life Technologies Grand Island NY USA) a 37°C con 5 % de CO². Cada 72 horas las células fueron centrifugadas 10 minutos a 1200 g, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular en 1 ml de RPMI suplementado, posteriormente, se hicieron diluciones 1:10 y 1:100 para cuantificar las células en una cámara de Neubauer y determinar confluencia máxima a 2×10^5 células/ml. La viabilidad de los Mo-THP1 fue

evaluada con Azul de Tripan (Amersham biosciences corp. Piscataway, NJ USA) y para realizar experimentos esta fue mayor al 96%.

Para realizar la estimulación de los Mo-THP1 fueron utilizadas placas de 6 pozos donde se sembraron 750,000 células/ml, posteriormente, se estimularon con LPS de *Salmonella entérica* (serotipo Minnesota) (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA) (1 µg/ml), PRL-rh (20 100, 200 y 2000 ng/ml) y CFP-*M. bovis* (50 µg/ml) a diferentes tiempos (1, 2, 4 8, 48 y 72 horas). También se realizaron co-estimulaciones de LPS más PRL-rh y CFP-*M. bovis* más PRL-rh. Las células fueron cosechadas en tubos de 2 ml centrifugándose por 10 minutos a 1200 g, el botón celular fue homogenizado con trizol o buffer RIPA para la extracción de ARN y proteína, respectivamente.

5.1.8 Análisis de la expresión del PRLR y la PRL por PCR en tiempo real

A partir de los extractos celulares en trizol (Invitrogen™ Corporation Grand Island, NY USA) se purificó el ARN en columnas de acuerdo a las recomendaciones (QIAGEN® Valencia, CA USA). El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Utah SL, USA) a 260 y 280 nm colocando 2 µl de muestra, la calidad y cantidad se evaluó en geles de agarosa al 0.8% con formaldehído, la hebra complementaria de ADN fue generada usando 1 µg del ARN total y el sistema Superscrip III, a un volumen de 20 µl (Invitrogen™ Corporation Grand Island, NY USA). Los transcritos de PRL y el PRLR fueron analizados por triplicado usando un termociclador PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). La secuencia que se utilizó para los transcritos del PRLR fueron *forward* 5'-AGA CCA TGG ATA CTG GAG TA -3' y *reverse* 5'-GGA AAG ATG CAG GTC ACC AT -3', (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). La sonda TaqMan que se usó para el PRLR fue 6FAM@TCT GCT GTC ATC TGT TTG ATT A (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). La secuencia que se utilizó para los transcritos de la PRL fue Assay IDHs01062137_m1 (Applied Biosystems, Foster City CA, USA), la sonda TaqMan que se utilizó fue 6FAM (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). Los resultados fueron normalizados utilizando el 18S ribosomal ARN (rARN) gene (Applied Biosystems, Foster City CA, USA), la expresión relativa se determinó utilizando el método Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Wong and Medrano 2005).

5.1.9 Inhibición del complejo PRL/PRLR

Se utilizó un anticuerpo contra el epitopo conformacional del dominio N-terminal del PRLR (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN USA) bloqueando la unión de la PRL con el PRLR en la superficie de los Mo-THP1. En placas de 6 pozos se sembraron 750,000 células/ml, estas fueron estimuladas con LPS de *Salmonella entérica* (serotipo Minnesota) (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA) (1 µg/ml) y CFP-*M. bovis* 50 ug/ml de 1 a 8 horas, al mismo tiempo se agregó un anticuerpo monoclonal anti-PRLR a una concentración de 10 µg/ml (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN USA). Posteriormente, las células fueron cosechadas y analizadas por citoquímica.

5.2 Análisis del PRLR y la PRL por inmunocitoquímica fluorescente

Después de realizar los estímulos en los Mo-THP1 se utilizó una centrifuga para laminillas StatSpin® Express 2 (Iris Sample Processing, Inc, Westwood, MA USA) donde fueron colocadas aproximadamente 75,000 células en 100 µl de medio condicionado, después se centrifugaron por 10 minutos a 1200 g y se decantó el medio de cultivo dando 2 lavados de 5 minutos con PBS, después fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido de 3 lavados con PBS con Tween 20 al 0.2% en PBS por 10 minutos para permeabilizar. Posteriormente los especímenes se bloquearon con PBS suplementado con 10% de SFB y 1% de BSA por 1 hora (Equitech-bio Inc. Kerrville, TX USA). Se incubaron con el anticuerpo primario anti-PRLR y anti-PRL 1:50 toda la noche a 4°C (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Delaware, CA USA). Posteriormente, se lavó 3 veces por 5 minutos con PBS y a partir de este paso todo se manejó en oscuridad, ya que se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora, (Alexa Fluor® 488 anti-ratón IgG para la PRL y Alexa Fluor® 568 anti-conejo IgG para el PRLR (Invitrogen™ Corporation Grand Island, NY USA); después se realizaron 3 lavados con PBS por 5 minutos y se incubó con DAPI 1:10,000 por 5 minutos a temperatura ambiente en PBS, posteriormente se dieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y por último se lavaron las laminillas con una dilución 1:1 glicerol/PBS para colocar el cubreobjetos que fue sellado con esmalte de uñas. Inmediatamente después se observaron en un microscopio Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), las imágenes se capturaron usando una cámara AxioCam MRm y se analizaron en el software AxioVs40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

5.2.1 Bioensayo de la PRL en células Nb2

Para determinar la presencia y bioactividad de la PRL en el sobrenadante de los Mo-THP1 estimulados con LPS (1 µg/ml) y *M. bovis* (50 µg/ml), se realizaron ensayos de proliferación en células Nb2, esta línea celular es dependiente de hormonas lactogénicas (Tanaka, Shiu et al. 1980). Las células fueron cultivadas en medio completo DMEM Advanced (Gibco BRL Life Technologies Grand Island, NY USA) suplementado con 1% antibiótico, 10% de SFB y 10% de suero de caballo (Gibco BRL Life Technologies Grand Island, NY USA).

Aproximadamente, 24 horas antes del ensayo, se transfirieron las células Nb2 a medio de mantenimiento (1% de SFB) con la finalidad de mantenerlas en estado estacionario. Posteriormente, se sembraron 40,000 células/pozo en medio de bioensayo suplementado únicamente con 1% antibiótico y 10% de suero de caballo. Para determinar la bioactividad de la PRL se montó una curva estándar con diferentes concentraciones de la PRL-rh (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA). Los sobrenadantes condicionados de los Mo-THP1 fueron clarificados por centrifugación 10 minutos a 1200 g y posteriormente se reconcentraron aproximadamente 24X con una centrifugación tangencial en un centricon de 10 kDa (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), finalmente se agregaron al bioensayo de proliferación de las células Nb2 diferentes concentraciones de medio condicionado de los Mo-THP1 5, 10, 25 y 45 µl. Se incubaron durante 60 horas a 37°C y posteriormente se determinó la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio MTT (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA) (Green, Reade et al. 1984), determinándose la densidad óptica a 550 nm de absorbancia en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Inc. Philadelphia, PA USA).

5.2.2 Ensayo de Proliferación en Mo-THP1

Para determinar la proliferación celular se colocaron 30, 000 células Mo-THP1 por pozo en volumen de 130 µl de medio suplementado, posteriormente fueron estimuladas con PRL-rh 20, 100, 200, 2000 ng/ml o LPS 1µg/ml (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA) ó CFP-*M. bovis* 50 µg/ml por 48 y 72 horas. Al término de la incubación se agregaron 10 µl de reactivo de proliferación WST-1 por pozo a una dilución final 1:10 y se encubó por 2 horas a 37°C (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany). La viabilidad celular fue

determinada midiendo la formación de sales de formazan representada por los valores de densidad óptica a una absorbancia de 480 nm en un lector de microplacas Synergy H4 (BioTek Instruments, Inc. Vermont W, USA).

5.2.3 Determinación de apoptosis por Anexina V en Mo-THP1

La muerte celular por apoptosis se determinó mediante citometría de flujo, tras teñir las células con anexina V conjugada con FITC, usando un citómetro EPICS ELITE (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA), los datos fueron analizados con el software WINMDI 2.9. Los Mo-THP1 fueron estimuladas con Etoposido (8.3 μ M) utilizado como control positivo de apoptosis, utilizando condiciones previamente descritas (van Genderen, Wielders et al. 2006), con PRL-rh 20, 100, 200, 2000 ng/ml, LPS 1 μ g/ml (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), CFP-*M. bovis* 50 μ g/ml; durante 48 y 72 horas. Las células se obtuvieron por centrifugación a 492 g por 10 minutos y se resuspendieron en 400 μ l de buffer de unión, agregando 3 μ l de Annexina-V-FITC y 3 μ l de yoduro de propidio-Ficoeritrina (BioLegend, Inc. San Diego, CA USA) y se incubaron por 5 minutos protegido de la luz. Se contaron por lo menos 10,000 eventos por muestra. Se analizaron 75,000 células, de las cuales se obtuvo el valor promedio de la intensidad de fluorescencia y la desviación estándar.

5.2.4 Determinación de óxido nítrico por el reactivo de Greiss

Los productos de oxidación del óxido nítrico fueron determinados en los sobrenadantes de los Mo-THP1 estimuladas por 48 y 72 horas con: PRL-rh 20, 100, 200, 2000 ng/, LPS 1 μ g/ml (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), CFP-*M. bovis* 5 y 50 μ g/ml y CFP-*M. bovis* más PRL-rh 20ng/ml por 48 horas por el reactivo de Greiss (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA) descrito previamente (Tripathi and Sodhi 2007). El contenido de nitritos y nitratos se cuantificó mediante la extrapolación de los valores en una curva estándar de nitrato de sodio (14.44, 11.2, 8.4, 5.6, 2.8, 1.4 0.7 μ M) (BAKER ANALYZED® A.C.S. Reagent Center Valley, U.S.A). En placas de 96 pozos se colocaron 100 μ l de sobrenadante más 100 μ l de reactivo de griess por pozo, después de 15 minutos se determinó la absorbancia a 540 nm. Los resultados se normalizaron restando el valor en DO de los sobrenadantes de las células no estimuladas.

5.2.5 Determinación de citocinas proinflamatorias por ELISA

Los niveles de citocinas fueron determinados sembrando 750,000 células Mo-THP1/ml, en placas de 24 pozos, posteriormente, se estimularon con PRL-rh 20, 100, 200, 2000 ng/ml, LPS 1µg/ml (Sigma Chemical CO. St Luis, MO USA), CFP-*M. bovis* 50 µg/ml y CFP-*M. bovis* más PRL-rh 20 ng/ml por 48 horas. Los sobrenadantes fueron colectados por centrifugación y conservados hasta su utilización a -80 °C. Para la determinación de los niveles de IL1-β, IL-6 and TNF-α fue utilizado un kit de ELISA para IL-1β, IL-6 y TNF-α de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BioLegend, Inc. San Diego, CA USA).

5.2.6 Análisis Estadístico

Todos los resultados obtenidos por PCR en tiempo real y citometria de flujo fueron analizados con el software Prism® 5.02 software (Graph Pad Software Inc. San Diego, CA USA). Los datos se obtuvieron por triplicado de cada experimento y se presentaron en media y desviación estándar. La prueba estadística que se utilizó fue ANOVA de dos vías determinando la diferencia estadística entre cada tratamiento y periodo de estimulación. La significancia fue definida como $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Pruebas inmunológicas y patológicas

Los bovinos infectados naturalmente con *M. bovis* fueron positivos a las pruebas diagnósticas de intradermorreacción e IFN- γ . La inspección post mortem mostró lesiones sugestivas a TBb de tipo tardío (III y IV) en las vacas en producción y de tipo temprano (I y II) en las vacas en periodo seco (Tabla 3 y 4) nomenclatura previamente descrita por (Vordermeier, Chambers et al. 2002). También fueron positivos a la tinción de *Ziehl-Neelsen* identificando bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). La infección se confirmó con el aislamiento de *M. bovis* del homogenizado de diferentes órganos de las vacas infectadas naturalmente (Tabla 4). Esto fue realizado en el CENID-fisiología, INIFAP Queretaro por el Dr. Feliciano Milán Suazo. En la glándula mamaria y el nódulo linfático retromamario no se observaron lesiones sugestivas a TBb. Por PCR anidada se determinó la presencia del ADN de *M. bovis* en estos tejidos analizando el gen que codifica la proteína MPB70. Este análisis nos permitió identificar el ADN de *M. bovis* en glándula mamaria de 6 vacas en producción y 2 en periodo seco (40% de los 20 animales infectados naturalmente) en nódulo linfático retromamario el resultado fue negativo (Tabla 5, Figura 1B). Las 6 muestras de glándula mamaria en producción positivas a MPB70 fueron analizadas por PCR *in situ* amplificando la secuencia de inserción IS6110, en 2 de ellas se identificó el ADN de la micobacteria y microgranulomas por Hematoxilina-eosina (Figura 1A). Los bovinos expuestos a *M. bovis* fueron negativos a intradermorreacción e IFN- γ . Post mortem la necropsias no mostró lesiones sugestivas a TBb en ningún órgano (Tabla 4). También fueron negativas a la tinción *Ziehl-Neelsen*. Por PCR anidada se identificó la presencia del ADN de *M. bovis* en 3 vacas en producción (15% de los 20 animales expuestos a la infección) en nódulo linfático retromamario el resultado fue negativo (Tabla 5, Figura 1B). Los 2 controles libres de TBb procedentes de un hato libre de tuberculosis y brucelosis incluidos en este estudio fueron negativos a tuberculina, INF- γ , *Ziehl-Neelsen* y cultivo de *M. bovis*.

Tabla 3. Escala de clasificación para las lesiones macroscópicas

INSPECCIÓN POSTMORTEM (lesiones macroscópicas)	
Escala	PARÁMETROS DE CLASIFICACIÓN
(0)	No se presentan lesiones
(1)	1 o 2 lesiones de < 5 mm de diámetro
(2)	Más de 2 lesiones de > 5 mm de diámetro y áreas necróticas
(3)	Múltiples lesiones (>5) con áreas necróticas de más de 10 mm diámetro
(4)	Lesiones coalescentes o extendidos en la mayor parte del órgano

mm=milímetros

Tabla 4. Diagnóstico inmunopatológico de las vacas expuestas e infectadas con *M. bovis*

Grupos	No. de vacas	Intradermorreacción			Histopatología		Cultivo	Necropsia				
		PAC	PC	INF- γ	ZN	Tipificación	Lesión (Tipo 1,2,3,4)					
							RF	T	M	GM	NLRM	
<i>Infectadas naturalmente</i>												
Producción	10	+	+	+	+	<i>M. bovis</i>	3,4	1	3,4	0	0	
Seco	10	+	+	+	+	<i>M. bovis</i>	1	1	2,1	0	0	
<i>Expuestas a M. bovis</i>												
Producción	10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	
Seco	10	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	
<i>Controles Libres de TBb</i>												
Producción	2	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	

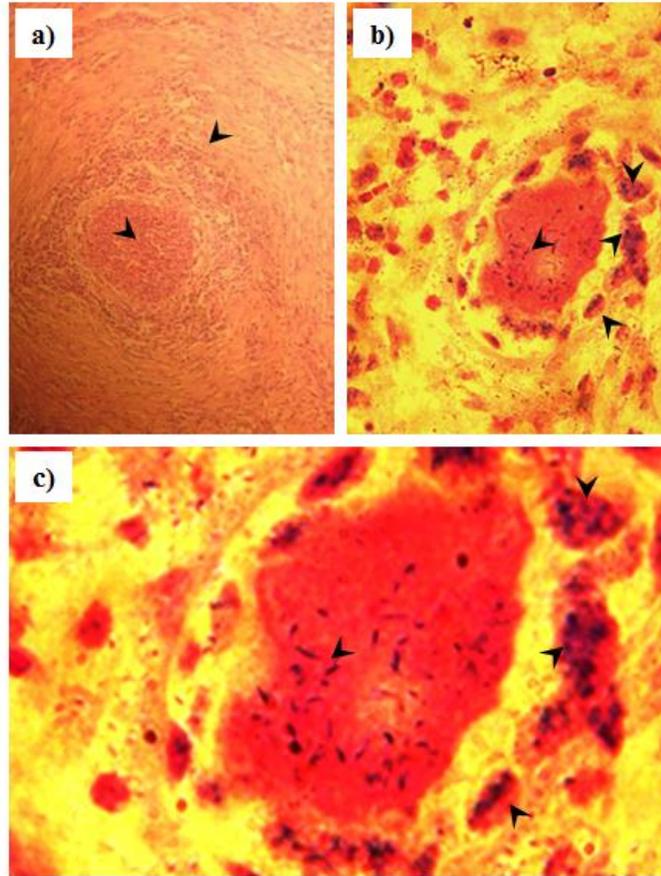
PAC=Pliegue ano caudal, PC=Cervical comparativa, ZN= *Ziehl-Neelsen*, INF- γ =Interferón gamma, +=Positivo, -=Negativo, T=Traqueobronquial, Rf=Retrofaríngeo, M=Mediastínico, GM=Glándula mamaria, NLRM= Nódulo linfático retromamario.

Tabla 5. Resultados de la PCR anidada en los diferentes tejidos bajo estudio.

Grupos	No. de vacas	PCR positivos		Porcentaje	PCR negativos	
		GM	NLRM		GM	NLRM
Infectadas naturalmente						
Producción	10	6	0	60%	4	10
Seco	10	2	0	20%	8	10
Expuestas a <i>M. bovis</i>						
Producción	10	3	0	30%	7	10
Seco	10	0	0	0%	10	10
Controles Libres de TBb						
Producción	2	0	0	0%	2	2
Total	42	11	0	26.19%	31	42

GM=Glándula mamaria, NLRM=Nódulo linfático retromamario

A) PCR in situ



B) PCR Anidada

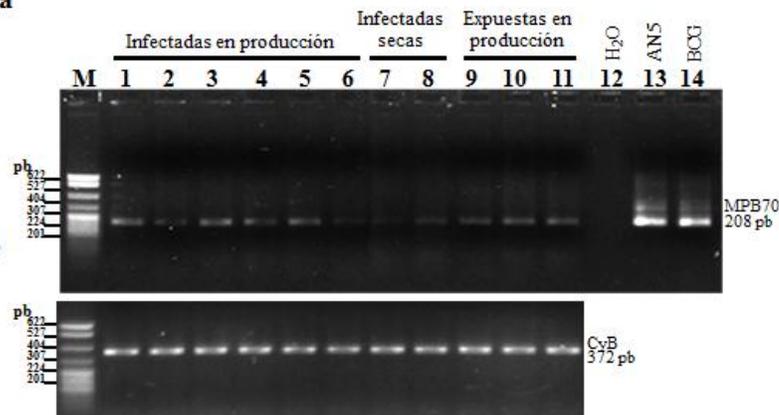
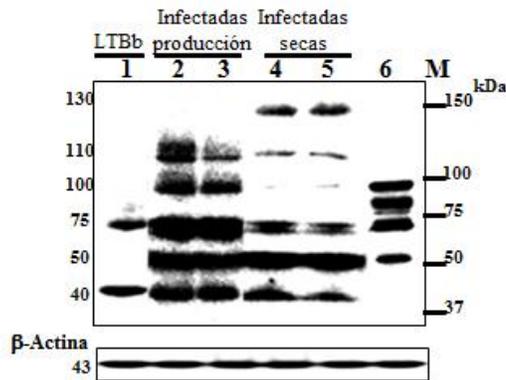


Figura 1. Detección del ADN de *M. bovis* en glándula mamaria de vacas infectadas con *M. bovis*. (A) **PCR in situ.** a). La detección de lesiones microscópicas se determinó mediante la tinción hematoxilina-eosina imagen vista a 40 aumentos. b). La localización del ADN de la micobacteria fue detectado usando la secuencia de inserción 1S6110, se observó positividad en MØ y células epiteloides (flechas negras) imagen vista a 100 aumentos. c). Ampliación vista a 200 aumentos. (B) **PCR anidada.** Amplificación de un fragmento de 208 pb del gen MPB70, de la línea 1 a la 6 glándula mamaria de vacas infectadas en producción, línea 7 y 8 infectadas secas, línea 9 a la 11 expuestas en producción, línea 12 H₂O control negativo, línea 13 ADN genómico de *M. bovis* AN5 y línea 14 ADN genómico de *M. bovis*-BCG utilizado como control positivo. (C) **PCR testigo.** La expresión del gen mitocondrial *citocromo b* fue usada como control de integridad del ADN. El carril M corresponde al marcador de peso molecular pBR322/ Msp I de 201-622 (pb).

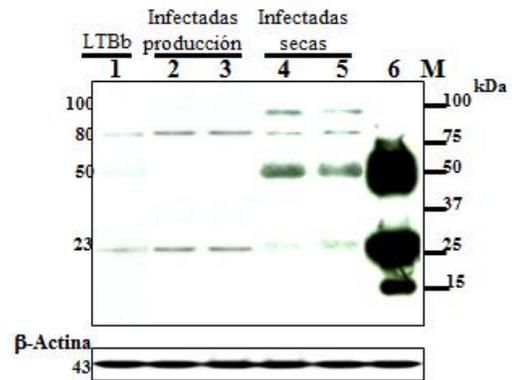
6.1.2 La infección por *M. bovis* indujo la expresión del PRLR y la PRL en glándula mamaria de bovinos lecheros

La expresión del PRLR y de la PRL en glándula mamaria fue determinada extrayendo proteínas totales a partir de lisis celular con el buffer RIPA. La integridad fue evaluada en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie. Como control positivo del PRLR se utilizaron proteínas totales de líneas celulares de cáncer cérvico uterino y cáncer de mama dado que han demostrado tener expresión de esta proteína. El análisis del PRLR en la glándula mamaria de ganado infectado con *M. bovis* en periodo lactante nos permitió observar el aumento de la expresión de la isoforma de 75 y 40 kDa, además se observó la expresión de la isoforma intermedia de 50 kDa a diferencia de animales sin infección. La isoforma de 50 kDa fue observada independientemente del periodo fisiológico de la vaca ya que también se identificó en ganado en periodo seco (Figura 2A). En los animales infectados en producción también se observaron isoformas largas del 100 y 110 kDa que en periodo seco se ven disminuidas. Las proteínas más abundantes en animales infectados fueron las de 50 y 75 kDa (Figura 2A). El análisis de la expresión de la PRL reveló la presencia de 2 variantes de la PRL, de 23 y 80 kDa de forma independiente a la infección ya que se observaron en tejido mamario de animales libres de TBb e infectados en producción (Figura 2B). En el tejido mamario de animales infectados secos, se reveló la presencia de 2 variantes de la PRL, de 50 y 100 kDa (Figura 2B). Al identificar la inmunolocalización del PRLR en glándula mamaria se observó en membrana y citoplasma de lactocitos, células mioepiteliales, fibroblastos, macrófagos y como parte del fluido contenido en los acinos mamaros. En los animales infectados la marca fue más intensa comparado con lo observado en animales expuestos a *M. bovis* y libres de TBb (Figura 2C). Por otra parte, el análisis de la inmunolocalización de la PRL, permitió identificar la proteína en citoplasma y la membrana de lactocitos de animales infectados con *M. bovis* en producción. En contraste, prácticamente no se observó marca en animales libres de TBb (Figura 2D). En cuanto a los animales en periodo seco se apreció menor expresión de la PRL principalmente localizada en fibroblastos.

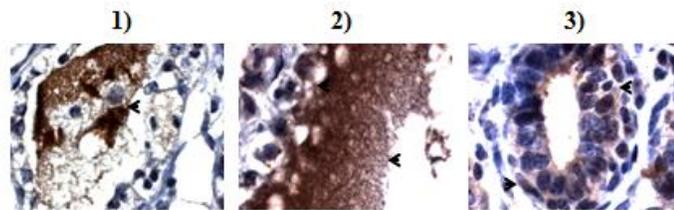
A) PRLR



B) PRL



C) PRLR



D) PRL

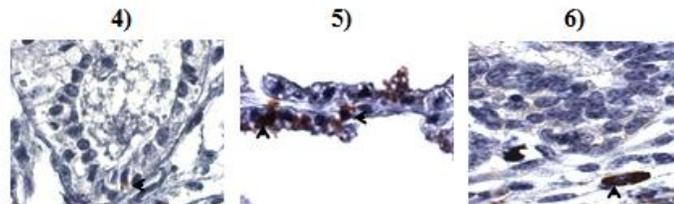


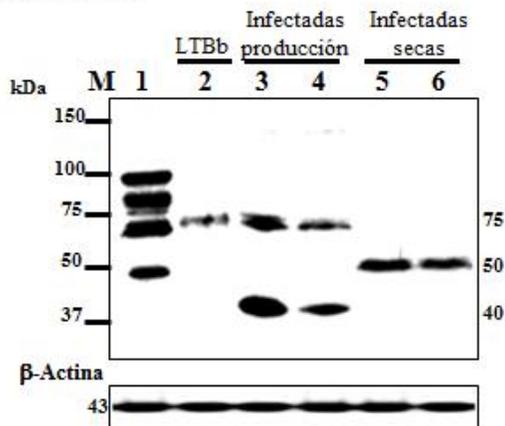
Figura 2. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en glándula mamaria de vacas infectadas con *M. bovis*. (A). La expresión del PRLR se determinó por WB. Esto reveló diversas isoformas del PRLR dependientes del estado fisiológico. Línea 1 GM de vacas libres de TBb, línea 2 y 3 GM de vacas infectadas en producción, línea 4 y 5 GM de vacas infectadas secas, línea 6 control positivo del experimento línea celular de cáncer de mama MCF7. La isoforma de 50 kDa solo fue observada en animales infectados. (B). La expresión de la PRL se determinó por WB. Esto reveló 4 variantes dependientes del estado fisiológico. Línea 1 GM de vacas LTBB, línea 2 y 3 GM de vacas infectadas en producción, línea 4 y 5 GM de vacas infectadas secas, línea 6 control positivo del experimento PRL-rh. Control endógeno β -actina. (C). La localización del PRLR por inmunohistoquímica reveló su inmunolocalización en lactocitos, MØ y liberación de formas solubles (flechas negras). 1) GM de vacas LTBB en producción, 2) GM de vacas infectadas en producción. 3) GM de vacas infectadas secas. (D). La localización de la PRL por inmunohistoquímica reveló su inmunolocalización en lactocitos de animales infectados con *M. bovis* (flechas negras). 4) GM de vacas LTBB en producción, 5) GM de vacas infectadas en producción. 6) GM de vacas infectadas secas.

6.1.3 La infección por *M. bovis* indujo la expresión del PRLR y la PRL en nódulo linfático retromamario

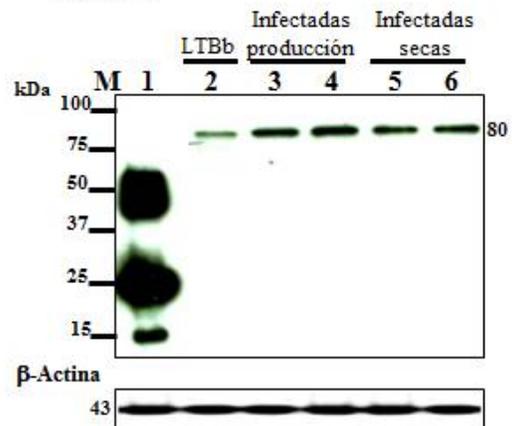
En el nódulo linfático retromamario, se observó la expresión diferencial del PRLR en función de la infección y del estado fisiológico. En las vacas libres de TBb, se observó la expresión de la isoforma de 75 kDa del PRLR, mientras que las infectadas en producción expresaron isoformas de 40 y 75 kDa y las infectadas secas expresaron, abundantemente la isoforma de 50 kDa (Figura 3A). Las formas cortas del PRLR 40 y 50 kDa fueron observadas en nódulos linfáticos retromamarios de animales infectados con *M. bovis*. Al analizar en nódulo linfático retromamario la expresión de la PRL se observó que no sufrió cambio en relación al periodo fisiológico y la infección. Únicamente se encontró una variante de la PRL de aproximadamente 80 kDa, en bovinos infectados se observó con mayor intensidad (Figura 3B).

Por otra parte, al identificar la inmunolocalización del PRLR en el nódulo linfático retromamario de bovinos LTbB en producción se observó el PRLR esporádicamente en el citoplasma de macrófagos. En los nódulos linfáticos de bovinos expuestos e infectados en producción, el PRLR fue expresado en nucleoplasma de macrófagos, la mayor cantidad de células marcadas se ven en los cordones medulares (Figura 3D). En contraste, en nódulo linfático retromamario de bovinos infectados en periodo seco, el PRLR fue expresado en el citoplasma y núcleo de linfocitos T y macrófagos en la corteza del nódulo linfático (Figura 3D). También se observó que en los bovinos infectados había mayor expresión del PRLR comparado con los LTbB y los expuestos. La inmunohistoquímica mostró la presencia de la PRL en la membrana y citoplasma de macrófagos de animales infectados con *M. bovis* en producción (Figura 3D). La principal diferencia observada mediante inmunotinción es la cantidad de células marcadas y su localización, ya que en los bovinos infectados en periodo seco se observaron escasamente células marcadas en la corteza del nódulo linfático y en los infectados en periodo de producción son abundantes la células marcadas en la médula medula del nódulo linfático. En los animales LTbB se observó marcaje débil de la PRL en el citoplasma de linfocitos (Figura 3D).

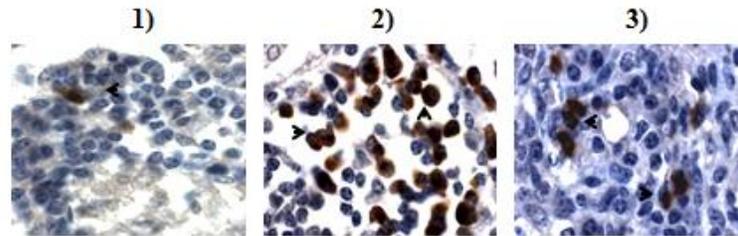
A) PRLR



B) PRL



C) PRLR



D) PRL

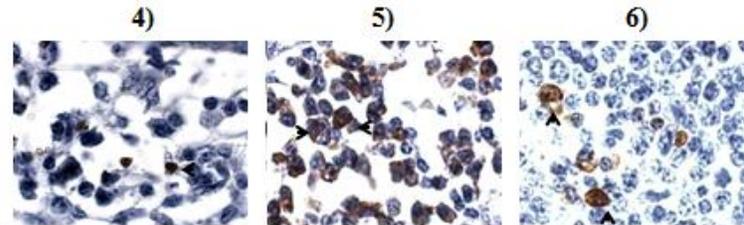


Figura 3. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en nódulo linfático retromamario de vacas infectadas con *M. bovis*. (A). La expresión del PRLR se determinó por WB. Esto reveló sobreexpresión de la isoforma de 40 y 50 kDa del PRLR animales infectados. Línea 1 control positivo del experimento línea celular de cáncer de mama MCF7, línea 2 NLRM de vacas LTBb, línea 3 y 4 NLRM de vacas infectadas en producción, línea 5 y 6 NLRM de vacas infectadas secas. (B). La expresión de la PRL se determinó por WB. Esto reveló la variante de la PRL de 80 kDa. Línea 1 control positivo del experimento PRL-rh, línea 2 NLRM de vacas LTBb, línea 3 y 4 NLRM de vacas infectadas en producción, línea 5 y 6 NLRM de vacas infectadas secas. Control endógeno β -actina. (C). La localización del PRLR por inmunohistoquímica reveló su inmunolocalización principalmente en membrana y citoplasma de MØ en animales infectados con *M. bovis* (flechas negras). 1) NLRM de vacas LTBb en producción, 2) NLRM de vacas infectadas en producción. 3) NLRM de vacas infectadas secas. (F). La localización de la PRL por inmunohistoquímica reveló su inmunolocalización en membrana y citoplasma de MØ y linfocitos en animales infectados con *M. bovis* (flechas negras). 4) NLRM de vacas LTBb en producción, 5) NLRM de vacas infectadas en producción. 6) NLRM de vacas infectadas secas.

6.1.4 Sobreexpresión del PRLR y la PRL en PBMC de sangre periférica estimulados con PPD-bovino

El análisis del PRLR en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de bovinos infectados naturalmente con *M. bovis* (PPD+/INF- γ +) mostró expresión de las isoformas de 40 y 50kDa (Figura 4A). En contraste, en PBMC de animales expuestos (PPD-/INF- γ -) se observó la expresión abundantemente de las isoformas largas de 75, 90 y 100 kDa. Al analizar la expresión de la PRL en las mismas muestras se observó la presencia de la forma nativa de la PRL endócrina 23 kDa, independientemente de la infección (Figura 4B). En contraste, al ser estimulada la sangre con PPD de *M. bovis* se observó la sobreexpresión de la isoforma de 40 y 50 kDa del PRLR en PBMC de bovinos infectados, expuestos y libres de TBb (Figura 4 C). Al analizar la expresión de la PRL se identificaron las variantes de 23, 40, 60 y 80 kDa (Figura 4D).

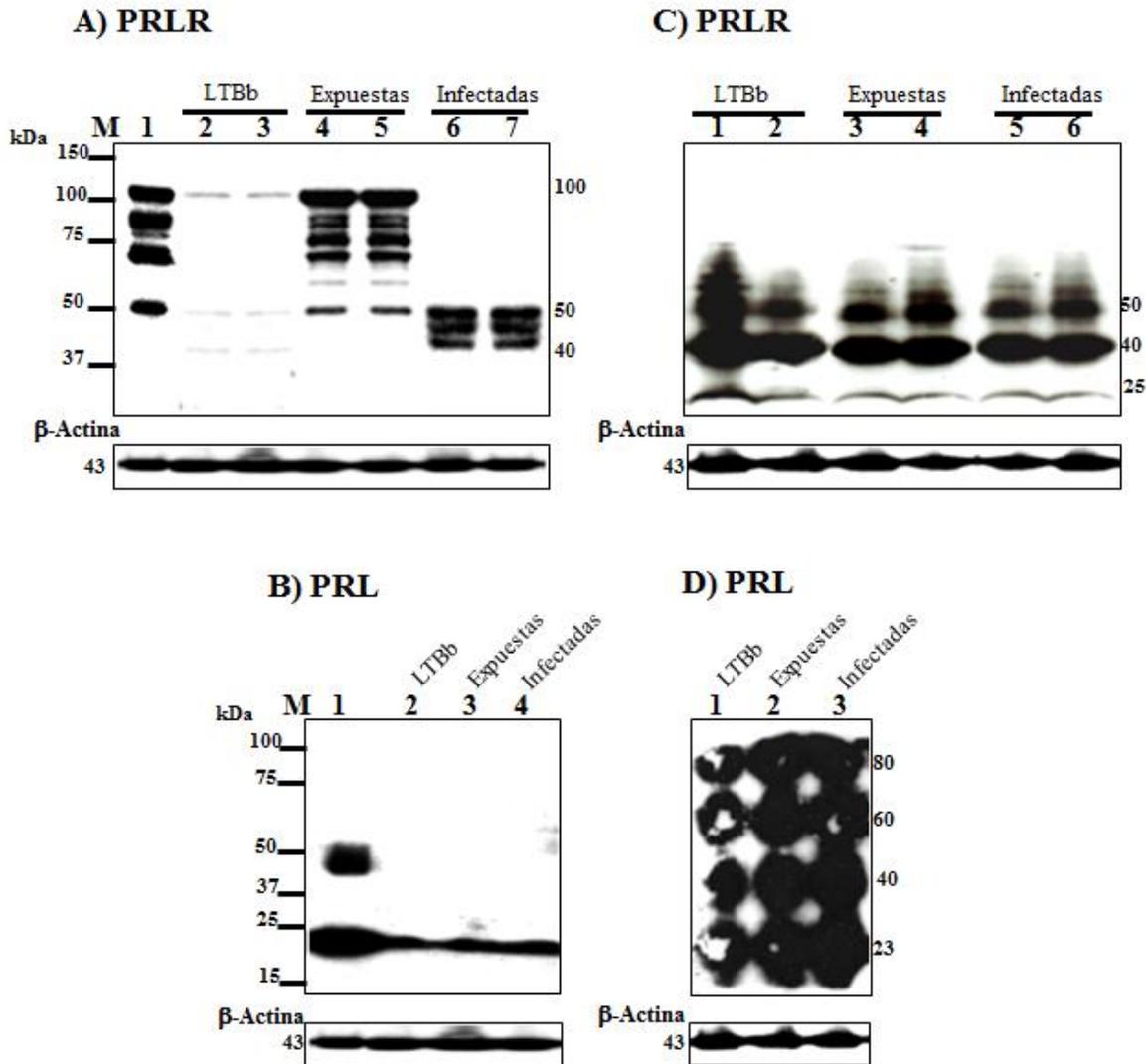


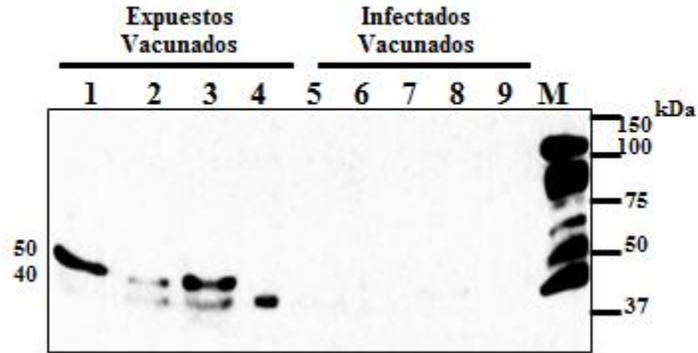
Figura 4. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en PBMC de vacas expuestas e infectadas con *M. bovis*. (A). La expresión del PRLR se determinó por WB. Línea 1 control positivo del experimento línea celular de cáncer de mama MCF7, línea 2 y 3 PBMC de vacas LTBb, línea 4 y 5 PBMC de vacas expuestas a la infección, línea 6 y 7 PBMC de vacas infectadas. Esto reveló sobreexpresión de isoformas 75, 90 y 100 kDa del PRLR en animales expuestos, en animales infectados se observaron isoformas de 40 y 50 kDa (B). La expresión de la PRL se determinó por WB. Línea 1 Control positivo del experimento PRL-rh, línea 2 PBMC de vacas LTBb, línea 3 PBMC de vacas expuestas a la infección, línea 4 PBMC de vacas infectadas. Esto reveló la PRL nativa de 23 kDa. (C). Expresión del PRLR en PBMC estimulados *in vitro* con PPD de *M. bovis* se determinó por WB. Línea 1 y 2 PBMC de vacas LTBb, línea 3 y 4 PBMC de vacas expuestas a la infección, línea 5 y 6 PBMC de vacas infectadas. Esto reveló inducción de la expresión de la isoforma de 50 y 40 kDa. (D). Expresión del la PRL en PBMC estimulados *in vitro* con PPD de *M. bovis* se determinó por WB. Línea 1 PBMC de vacas LTBb, línea 2 PBMC de vacas expuestas a la infección, línea 3 PBMC de vacas infectadas. Esto reveló inducción de variantes de alto peso molecular de la PRL (40, 60 y 80 kDa). Control endógeno β -actina.

6.1.5 Expresión de la PRL de alto peso molecular y formas cortas del PRLR en plasma de bovinos expuestos e infectados con *M. bovis*

Se determinó la expresión de isoformas solubles del PRLR en plasmas y suero de bovinos infectados y expuestos a *M. bovis*; después de la estimulación de sangre con PPD de *M. bovis* a 4 y 16 horas, se apreció un aumento en la expresión de la isoforma de 50 kDa del PRLR soluble en plasma de bovinos expuestos en función del tiempo de estimulación. En animales positivos a *M. bovis* se observó la expresión de la isoforma de 40 y 50 kDa del PRLR en plasma, la expresión de ambas isoformas disminuyó en función del tiempo de estimulación y en suero solo se observó la banda de 50 kDa (Figura 5A). Al analizar la expresión de la PRL en estas mismas muestras de plasmas y suero se apreció la sobreexpresión de 3 variantes de la PRL de aproximadamente 16, 25 y 60 kDa observándose mayor expresión de la variante de 60 kDa en animales infectados naturalmente con *M. bovis* (Figura 5B).

De igual manera se analizaron las isoformas solubles del PRLR en los mismos grupos de animales infectados y expuestos 3 meses después de ser vacunados con BCG+CFP-*M. bovis*. En los animales expuestos vacunados se observó la liberación de la isoforma soluble de 40 y 50 kDa en plasma, en suero identificamos la forma soluble de 40 kDa. En infectados vacunados fue indetectable la presencia de alguna de las isoformas del PRLR, tanto en plasma como en suero con y sin estimulación *in vitro* a 4 y 16 horas (Figura 6A). Al analizar la expresión de la PRL en estas mismas muestras de plasmas y suero se apreció la disminución de las 3 variantes de la PRL 16, 25 y 60 kDa observándose que en los infectados vacunados BCG+CFP-*M. bovis* la variante de 60 kDa prácticamente fue indetectable en plasma y suero (Figura 6B).

A) PRLR



B) PRL

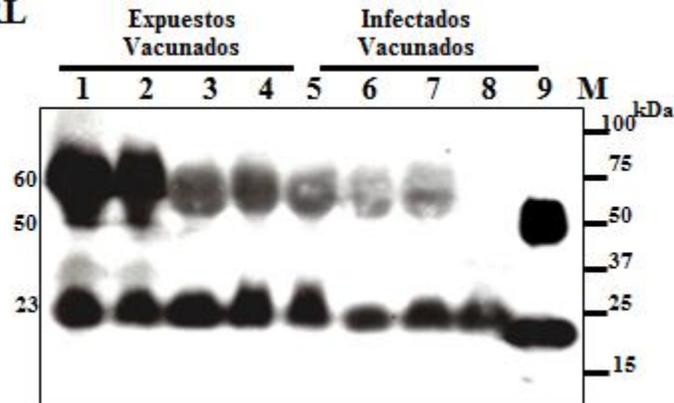


Figura 6. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en plasma estimulado *in vitro* con PPD de *M. bovis* en vacas expuestas e infectadas con *M. bovis* tres meses post-vacunación. La expresión del PRLR se determinó por WB. Esto reveló la expresión de las isoformas de 40 y 50 kDa en vacas expuestas, línea 1 sin estímulo, línea 2 estimulación por 4 horas, línea 3 estimulación por 16 horas, línea 4 suero. En infectados se apreció la ausencia del PRLR, línea 5 sin estímulo, línea 6 estimulación por 4 horas, línea 7 estimulación por 16 horas, línea 8 suero, línea 9 control positivo del experimento línea celular de cáncer de mama MCF7. **(B).** La expresión de la PRL se determinó por WB. Esto reveló la disminución de las 3 variantes de la PRL 16, 25 y 60 kDa en ambos grupos. Línea 1 a la 4 vacas expuestas vacunadas, 5 a la 4 vacas infectadas vacunadas. Línea 9 control positivo del experimento se utilizó PRL-rh.

6.1.6 El *CFP-M. bovis* indujo la expresión de la PRL de alto peso molecular y formas cortas del PRLR en MØ derivados de PBMC

En macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica, estimulados con *CFP-M. bovis* se observó la expresión de 3 isoformas del PRLR de 40 y 50 kDa expresadas en función del tiempo, 100 kDa muy tenue a partir de las 12 horas de estímulo (Figura 7A). Al analizar la expresión de la PRL en los macrófagos derivados de PBMC, estimulados con *CFP de M. bovis* se observó la variante de la PRL de aproximadamente 80 kDa (Figura 7B). En contraste, en los MØ sin estímulo se apreció la ausencia del PRLR y de la PRL.

A) PRLR

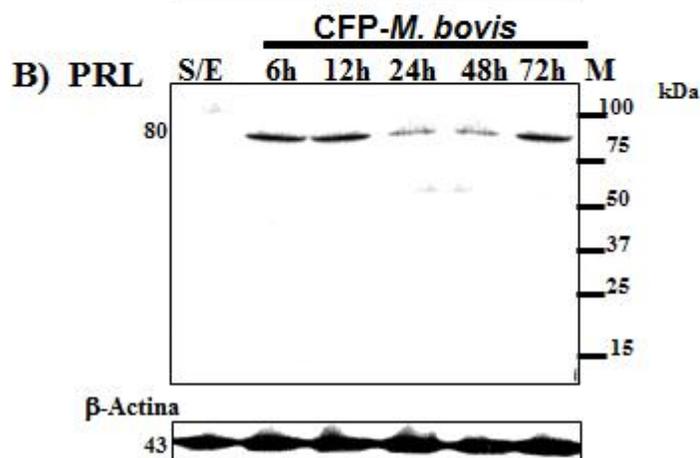
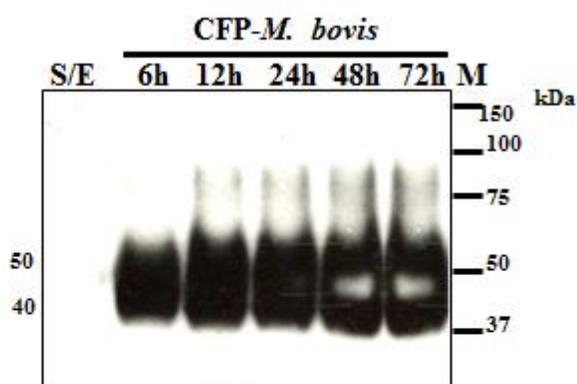
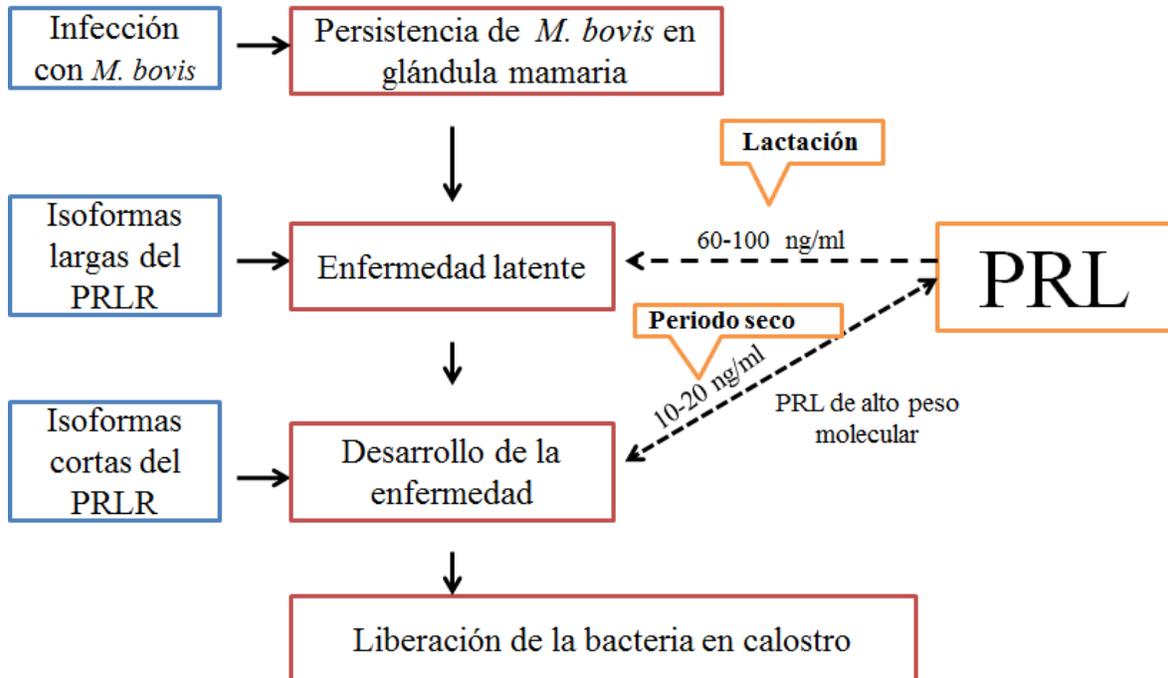


Figura 7. Caracterización de la expresión del PRLR y de la PRL en MØ derivados de PBMC de vacas libres de TBb. (A). La expresión del PRLR se determinó por WB. MØ bovinos sin estímulo (S/E), MØ bovinos estimulados con *CFP-M. bovis* a 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Esto permitió observar la sobreexpresión de las isoformas de 40 y 50 kDa. **(B).** La expresión de la PRL se determinó por WB. Esto reveló expresión de la PRL de 80 kDa entre 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Control endógeno β -actina.

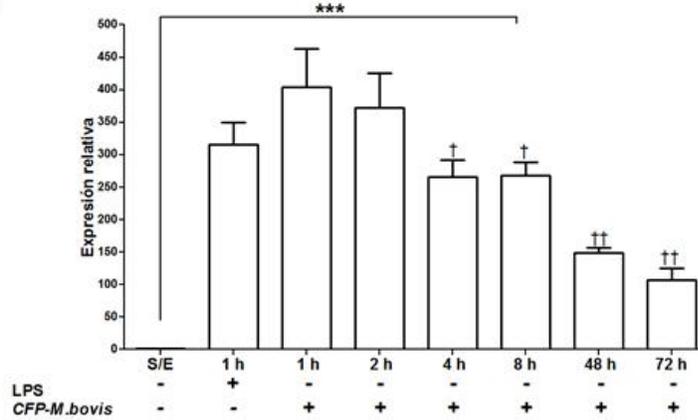


Esquema 4. Modelo de acción del PRLR y la PRL en la tuberculosis del ganado lechero.

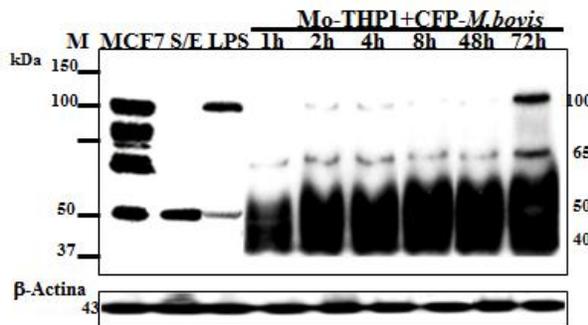
6.2. El CFP-*M. bovis* indujo la sobreexpresión de formas cortas del PRLR en Mo-THP1

Mediante PCR tiempo real se analizó la expresión relativa del gen del PRLR en Mo-THP1 estimulados con CFP-*M. bovis* a diferentes tiempos 1, 2, 4, 8, 48 y 72 horas este análisis nos permitió observar un incremento transcripcional del PRLR de 404 a 372 veces entre una 1 y 2 horas y 267 veces entre 4 y 8 horas. Se pudo apreciar la disminución de la transcripción del PRLR a 48 y 72 horas el incremento fue de 149 a 107 veces comparado con las células sin estímulo (Figura 8A). Mediante western blot se identificaron 4 isoformas de 40, 50, 65, y 100 kDa del PRLR, siendo más abundantes las de 40 y 50 kDa conforme avanzó el tiempo de estimulación, mientras que la de 65 kDa se apreció constante, la de 100 kDa se observó mayor expresión a las 72 horas (Figura 8B). En las células sin estímulo solo se apreció la isoforma de 50 kDa. Por inmunocitoquímica se determinó la localización del PRLR, ésto nos permitió observar la localización en la membrana celular de los monocitos, pero también fuera de las células a 1, 2, 4 y 8 horas (Figura. 8C). Por otra parte, a 48 y 72 horas se observó la localización del PRLR en la superficie celular, núcleoplasma y en el medio condicionado (Figura. 8C). En las células sin estímulo el PRLR se localizó de manera muy esporádica en algunas células. Mediante western blot se identificaron 2 isoformas solubles del PRLR (40 y 50 kDa) en el medio condicionado de las células estimuladas con CFP-*M. bovis* (Figura 8D). Al analizar extractos nucleares de las células estimuladas con CFP-*M. bovis* se observaron las dos isoformas sobreexpresadas 40 y 50 kDa (Figura 8D).

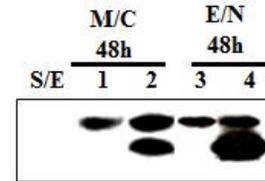
A) PRLR



B) PRLR



D) PRLR



C) PRLR

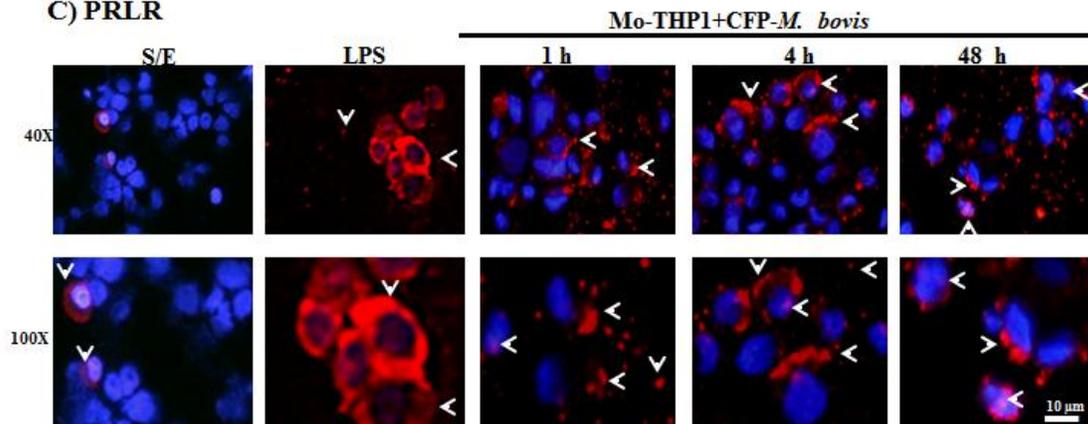
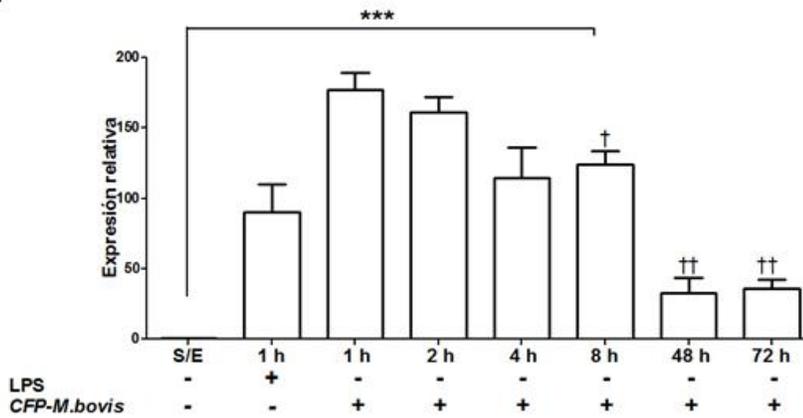


Figura 8. Análisis de la expresión del PRLR en Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis* (A). Expresión relativa del PRLR por RT-PCR utilizando el método (2^{-DDCt}). Se observó un aumento del ARNm del PRLR de 400 veces a 1 hora, disminuyendo a 72 horas a 107 veces. Datos expresados en media y desviación estándar (n=6) de 2 experimentos por triplicado ***P<0.001 comparando cada estímulo vs células sin estímulo (S/E), †† P<0.01, † p<0.05 comparando el estímulo de 1 hora vs 4, 8 y 72 horas. **(B)** Expresión del PRLR por WB. Se observó la sobreexpresión de 2 isoformas 40 y 50 kDa tiempo dependiente de 1 a 72 horas de estimulación **(C)** Inmunolocalización del PRLR por inmunofluorescencia. El PRLR marcado en rojo fue observado en membrana celular, núcleoplasma y medio condicionado de 1 a 72 horas (flechas blancas). Imágenes vistas a 40 y 100 aumentos. **(D)** Expresión del PRLR en medio condicionado (M/C) y extractos nucleares (E/N) de Mo-THP1 estimulados a 48 horas con *CFP-M. bovis* por WB. El LPS fue utilizado como control positivo de activación en Mo-THP1.

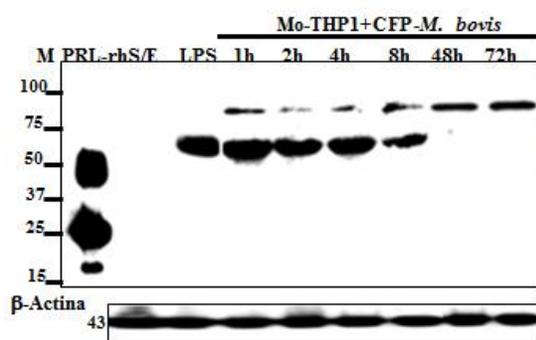
6.2.1 El CFP-*M. bovis* indujo la expresión de la PRL de alto peso molecular en Mo-THP1

Mediante PCR tiempo real se analizó la expresión relativa del gen de PRL en Mo-THP1 estimulados con proteínas totales del filtrado de cultivo de *M. bovis* a diferentes tiempos 1, 2, 4, 8, 48 y 72 horas este análisis nos permitió observar un incremento transcripcional de la PRL de 176 a 160 veces entre 1 y 2 horas; y de 114 a 124 veces entre 4 y 8 horas (Figura 9A). Se pudo apreciar la disminución de la transcripción de la PRL a 48 y 72 horas el incremento fue de 32 a 35 veces mas comparado con las células sin estímulo (Figura 9A). Mediante western blot se identificaron 2 variantes de la PRL 60 y 80 kDa, siendo más abundantes la de 60 kDa de 1 a 8 horas de estimulación, mientras que la de 80 kDa se apreció tenue (Figura 9B). En contraste, de 48 a 72 horas se observó más abundante la de 80 kDa, en las células sin estímulo no se observó la expresión de la PRL (Figura 9B). Por inmunocitoquímica se determinó la localización de la PRL, esto nos permitió observar la localización de la hormona fuera de las células y en la membrana celular de los monocitos de 1 a 2 horas (Figura 9C), sin embargo, de 4 a 8 horas esta proteína se observó sobre acumulada en la membrana celular y ligera marca en citoplasma y núcleo (Figura 9C). En extractos totales pudimos identificar el incremento de la expresión de ciclofilina b tiempo dependiente de 1 a 48 horas (Figura 9D). Mediante western blot se identificó la variante de la PRL de 60 kDa en sobrenadante de células estimuladas con *CFP-M. bovis* (Figura 9D). Al analizar extractos nucleares pudimos apreciar solamente la variante de la PRL de 80 kDa (Figura 9E).

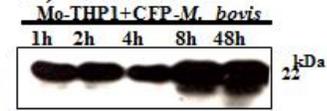
A) PRL



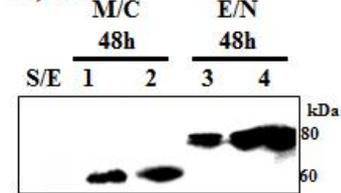
B) PRL



D) Ciclofilina b



E) PRL



C) PRL

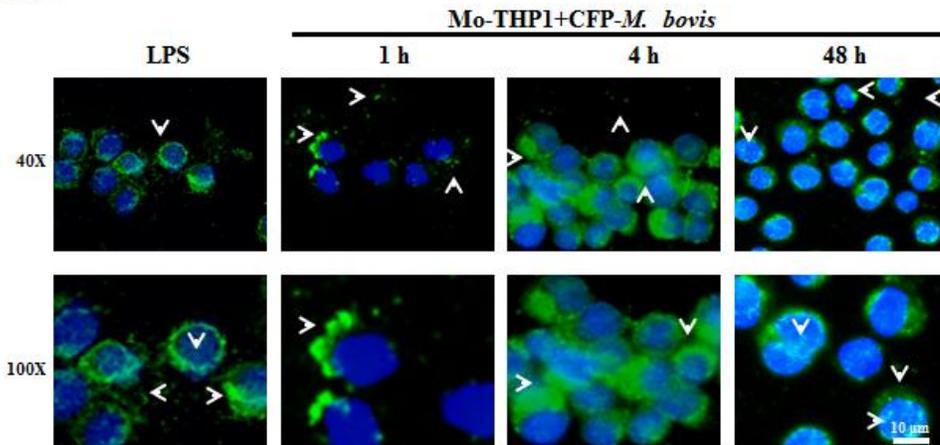


Figura 9. Análisis de la expresión de la PRL en Mo-THP1 estimulados con CFP-M. bovis. (A) Expresión relativa de la PRL por RT-PCR utilizando el método (2^{-DDCt}). Se observó un aumento del ARNm de la PRL de 176 veces a 1 hora, disminuyendo a 72 horas a 35 veces. Datos expresados en media y desviación estándar (n=6) de 2 experimentos por triplicado ***P<0.001 comparando cada estímulo vs células sin estímulo (S/E), †† P<0.01, † p<0.05 comparando 1 hora vs 4, 8 y 72 horas. (B) Expresión de la PRL por WB. Se observó la expresión de 2 variantes de la PRL 60 y 80 kDa de 1-8 horas, a 48 y 72 horas predominó la variante de 80 kDa. (C) Inmunolocalización de la PRL por inmunofluorescencia. La PRL marcada en verde fue observada en membrana celular y medio condicionado a 1 hora, de 2-72 horas se observó acumulada en membrana célula y nucleoplasma (flechas blancas). Imágenes vistas a 40 y 100 aumentos. (D) Expresión de ciclofilina b por WB. Esta proteína se observó incrementada en las células estimuladas con CFP-M. bovis de 1-48 horas. (E) Expresión de la PRL en medio condicionado (M/C) y extractos nucleares (E/N) de Mo-THP1 estimulados a 48 horas con CFP-M. bovis por WB. El LPS fue utilizado como control positivo de activación en Mo-THP1.

Mediante doble inmunocitoquímica se observó la formación de complejos ligando-receptor (PRL/PRLR) observándose una tonalidad entre anaranjado y amarillo. A 1 hora se observó la localización del complejo PRL/PRLR en membrana celular y en el medio condicionado (Figura 10A). De 4 a 8 horas se identificó claramente la interacción ligando-receptor en la membrana celular y de forma mas esporádica en núcleoplasma (Figura 10A). Entre 48 y 72 horas se observó la disminución del complejo PRL/PRLR en membrana celular y núcleoplasma.

Por otra parte, se realizó un bloqueó estérico de la unión de la PRL con el PRLR en la superficie de los Mo-THP1 usando el anticuerpo monoclonal anti-PRLR (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN USA). La inmucitoquímica reveló que tanto la PRL como su receptor después de 1 hora de estimulación fueron liberados al medio condicionado, se pudo apreciar que la mayoría de estas moléculas libres se unieron en el medio condicionado siendo observadas principalmente en la membrana celular (Figura 10B). Los resultados de 1 a 8 horas fueron muy similares, sin embargo, se observó una disminución de la marca de los complejos PRL/PRLR alrededor de las células. De manera interesante no se observó el complejo PRL/PRLR en citoplasma o núcleo de los monocitos en condiciones de inhibición.

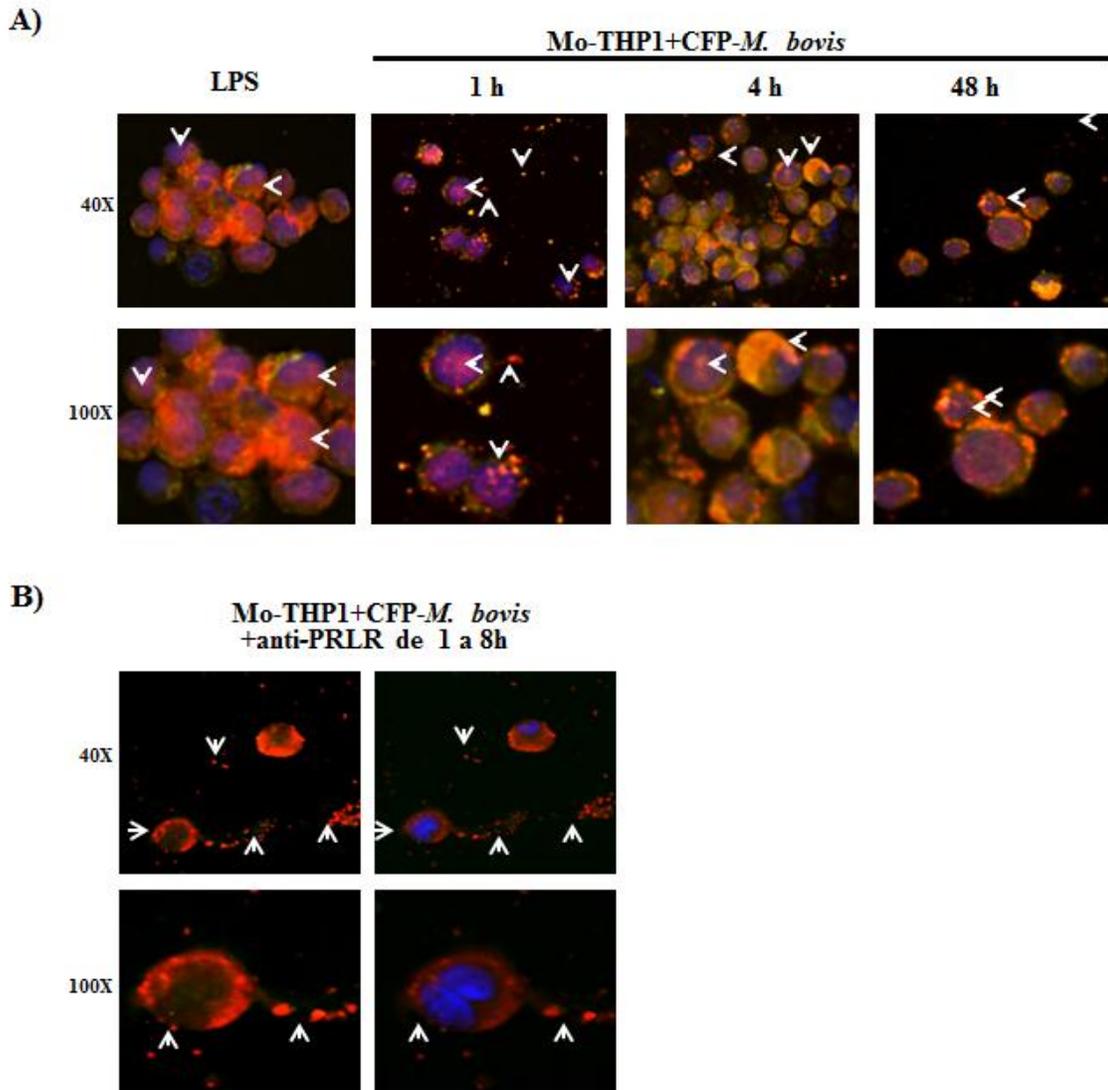
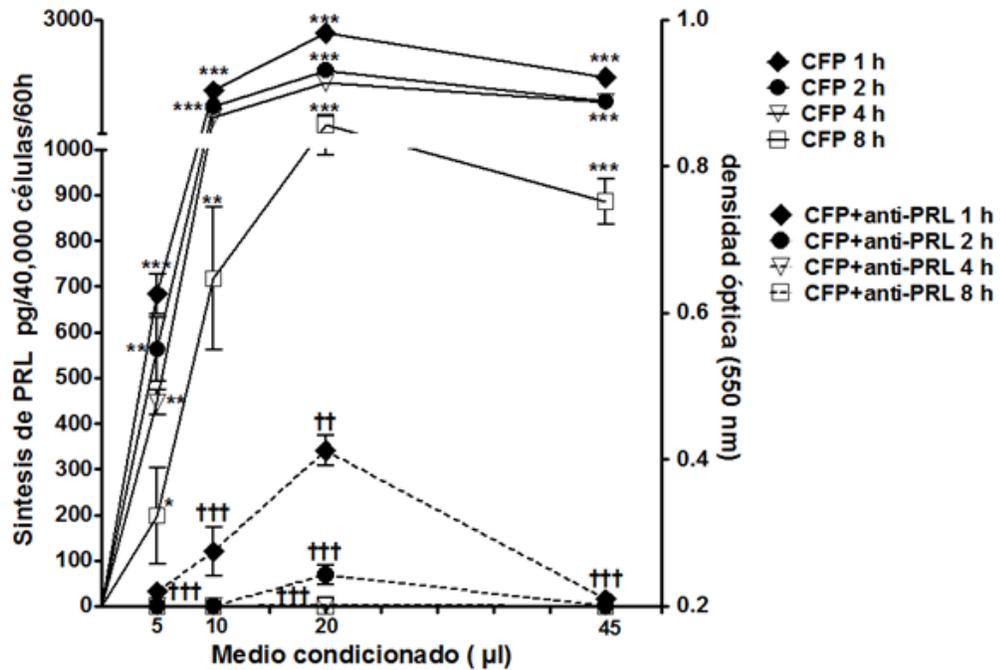


Figura 10. Localización del PRLR y la PRL en Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis* y coestimulados con anti-PRLR . (A) La doble inmunolocalización del PRLR en (Rojo) y de la PRL en (Verde), reveló complejos ligando-receptor (anaranjado y amarillo) en la membrana y medio condicionado de 1-8 horas (flechas blancas), de 48 a 72 horas se observó la unión ligando-receptor solo en membrana celular. Imágenes vistas a 40 y 100 aumentos por inmunofluorescencia. LPS fue utilizado como control positivo de activación en Mo-THP1. **(B)** Localización del PRLR y de la PRL en Mo-THP1 coestimulados con *CFP-M. bovis* y anti-PRLR. Se identificaron complejos ligando-receptor (anaranjado y amarillo) en la membrana y medio condicionado a 1-8 horas (flechas blancas). Imágenes vistas a 40 y 100 aumentos por inmunofluorescencia.

6.2.2 La PRL autocrina indujo proliferación de la línea celular Nb2 lactógeno dependiente

El medio condicionado de los monocitos tratados con *CFP-M. bovis* 1, 2, 4 y 8 h fueron utilizados en bioensayos de proliferación con la línea celular Nb2. Este estudio permitió observar que el sobrenadante condicionado de una 1 hora indujo proliferación 4 veces más comparado con el sobrenadante condicionado de 2 a 8 horas; sin embargo, con la dosis más alta (45 ul) la proliferación se vio disminuida significativamente (Figura 11A). Realizando una regresión lineal conforme a la curva de PRL-rh (1,10, 100, 500 y 1000 pg) con 20 ul de medio condicionado de 1 a 8 horas había más de 1000 pg de PRL autocrina (Figura 11A). Para comprobar que el efecto proliferativo en las Nb2 fuera determinado por la PRL autocrina se agregó al experimento un anti-PRL en conjunto a los medios condicionados de 1 a 8 horas, observando categóricamente la disminución de proliferación entre 2, 4 y 8 horas, en el medio condicionado a 1 hora se apreció la disminución de menos de 300 pg de PRL (Figura 11A). La PRL autocrina bioactiva del medio condicionado se identificó como una variante de la PRL de 60 kDa por western Blot. Sin embargo, la expresión de la PRL autocrina disminuyó significativamente en las muestras de 8 horas, ya que la banda de 60 kDa se apreció más tenue (Figura 11B).

A)



B) PRL

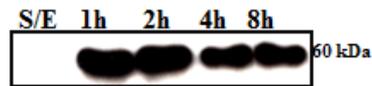


Figura 11. La PRL de 60 kDa indujo proliferación en células lactogénicas Nb2. (A) Diferentes concentraciones de medio condicionado obtenido de los Mo-THP1 estimuladas con *CFP-M. bovis* de 1-8 horas (5, 10, 20 y 45 µl reconcentrado 24 veces) indujeron altos índices de proliferación en la línea celular Nb2. La proliferación celular fue determinada por el método colorimétrico MTT. Datos expresados en media y desviación estándar (n=3) ***P<0.001 comparado cada estímulo vs control. Al coestimular un anticuerpo anti-PRL se observó la disminución del índice de proliferación en la línea celular Nb2. ††† P<0.001 comparando en índice de proliferación del medio condicionado vs coestimulación con anti-PRLR. **(B)** Expresión de la PRL de 60 kDa en medio condicionado de 1-8 horas por WB .

6.2.3 La PRL-rh indujo la expresión de la PRL autocrina y de isoformas cortas del PRLR en Mo-THP1

Mediante western blot se determinó la expresión del PRLR en Mo-THP1 estimulados con PRL-rh (20ng/ml) en este análisis se observó la expresión de 3 isoformas del PRLR (40, 50 y 100 kDa), la expresión de esas isoformas se apreció constante de 1 a 8 horas, la isoforma de 40 kDa se observó expresada en mayor cantidad (Figura 12A). Al analizar la expresión de la PRL en estos mismos extractos celulares 1 a 8 horas se observaron las variantes 16, 23 y 50 kDa de origen recombinante. Sin embargo, también, se observó que la PRL-rh estimuló la variante de (60 kDa) entre 1 y 8 horas (Figura 12B).

Por otra parte, cuando las células fueron estimuladas con PRL-rh utilizando diferentes concentraciones a 48 y 72 horas se observó la expresión de 5 isoformas del PRLR 40, 50, 65, 90 y 100 kDa (Figura. 12C). Al analizar la expresión de la PRL en estos extractos celulares se observó que a 48 y 72 horas no se reveló la expresión de la PRL.

Mediante PCR en tiempo real se analizó la expresión relativa del PRLR en células THP1 estimulada con PRL 20ng/ml a 1 y 48 horas. Este análisis nos permitió observar una expresión del ARNm del PRLR aumentado aproximadamente 272 veces a 1 hora, sin embargo, a 48 horas se observó un incremento de 600 veces comparado con las células sin estímulo (Figura 13A). Al analizar la expresión de la PRL pudimos observar un incremento de 77 veces a 1 hora. En contraste, se observó por completo la ausencia del mensajero de la PRL a 48 horas (Figura 13A). Por inmunocitoquímica la PRL-rh adicionada a las células fue localizada en medio condicionado 30 m después del estímulo. Sin embargo, a 1 hora de estimulación, se observó en la membrana y citoplasma de los monocitos (Figura 13B). El PRLR fue inmunolocalizado en la membrana celular de los monocitos de 1 a 8 hora (Figura 13C). Pudimos apreciar una ligera marca de ambas moléculas PRL/PRLR en núcleo.

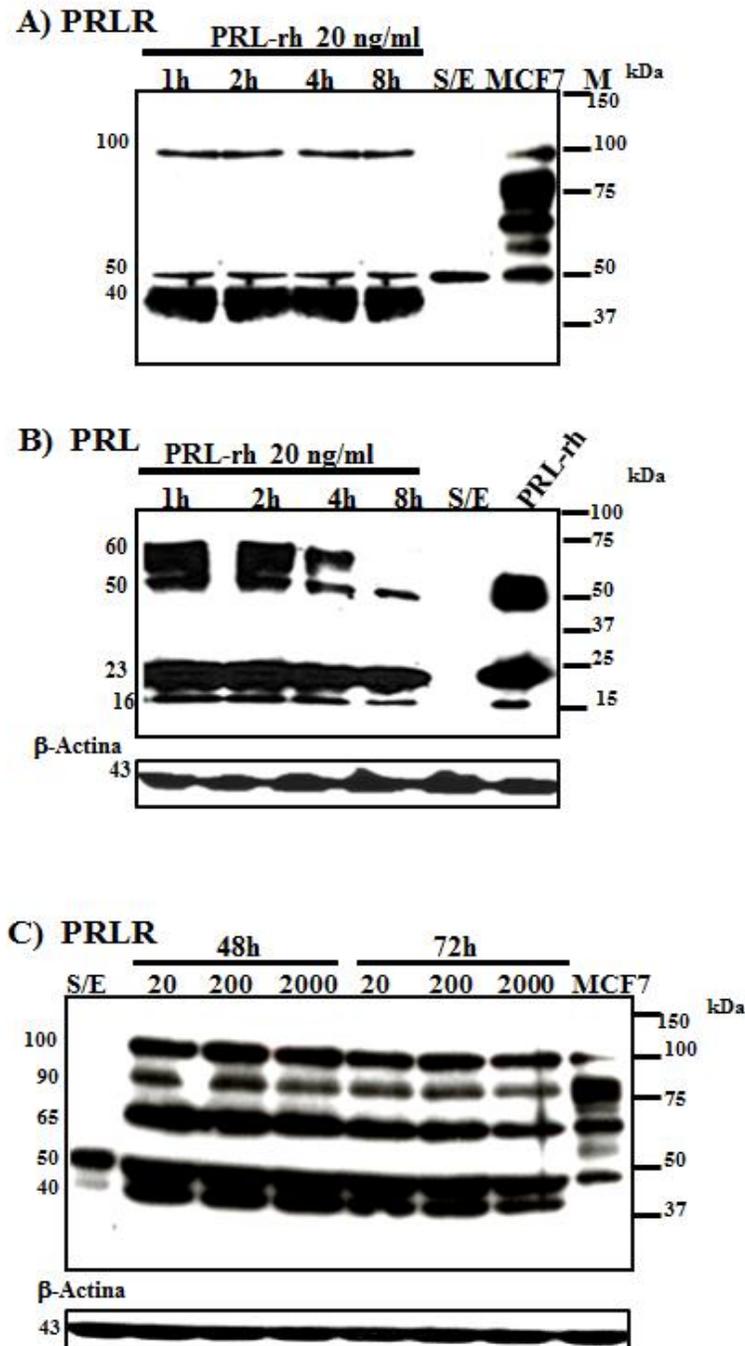


Figura 12. Caracterización de la expresión del PRLR y de la PRL en Mo-THP1 estimulados con PRL-rh. (A) La expresión del PRLR se determinó por WB. Con concentraciones fisiológicas de 20 ng/ml de la PRL-rh revelaron 3 isoformas del PRLR la más abundante fue la de 40 kDa de 1 a 8 horas. Control positivo del experimento línea celular de cáncer de mama MCF7. (B) La expresión de la PRL se determinó por WB. Esto reveló 4 variantes 16, 23, 50 kDa de origen recombinante y la de 60 kDa inducida por el estímulo de PRL-rh de 1-6 horas. Celulas sin estímulo (S/E). Control positivo del experimento PRL-rh. Control endógeno β-actina. (C) La estimulación con concentraciones suprafisiológicas de PRL-rh (20, 200, 2000 ng/ml) a 48 y 72 horas indujo la expresión de 5 isoformas 40, 50, 65, 90 y 100 kDa.

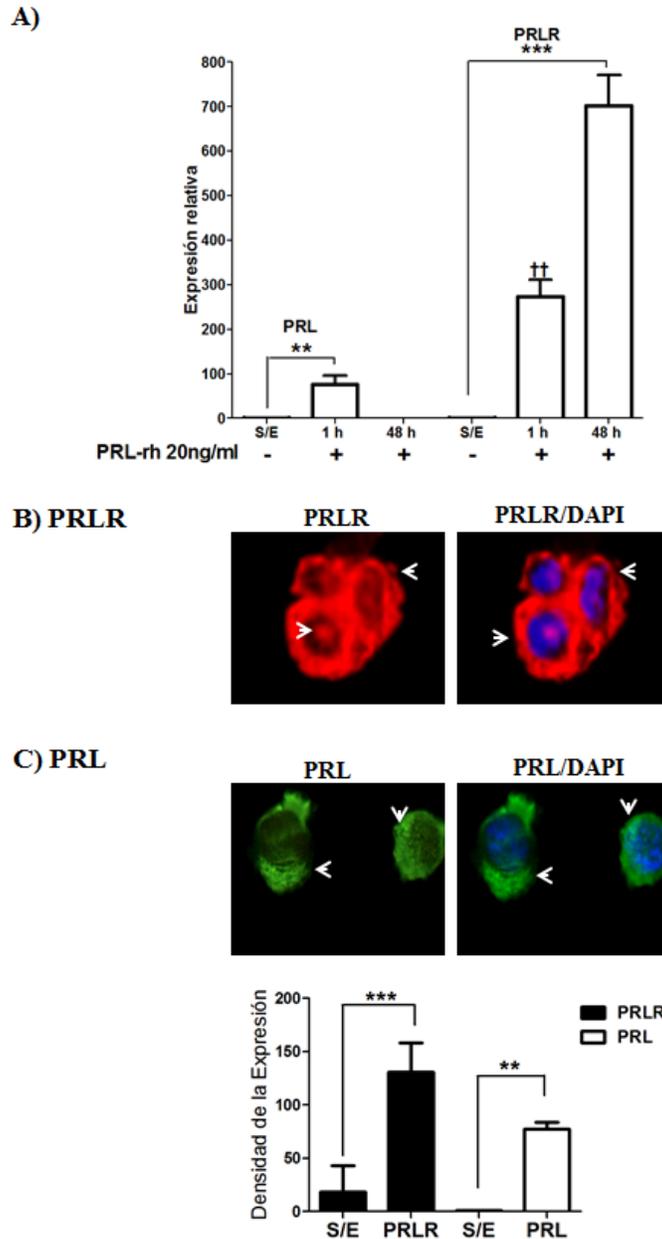


Figura 13. Análisis de la expresión de la PRL y el PRLR en Mo-THP1 estimulados con PRL-rh. (A). Expresión relativa de la PRL y del PRLR por RT-PCR utilizando el método (2^{-DDCt}). Se observó un aumento del ARNm de la PRL a 1 hora 77 veces, a 48 horas no se detectó ARNm de la PRL. Datos expresados en media y desviación estándar (n=6) de 2 experimentos por triplicado **P<0.01 comparado 1 hora vs células sin tratamiento. El análisis del ARNm del PRLR nos permitió observar 272 veces más a 1 hora, aumentando a 48 horas hasta 701 veces. Datos expresados en media y desviación estándar (n=6) de 2 experimentos por triplicado ***P<0.001 comparado 1 y 48 horas vs células sin tratamiento. **(B)** La localización del PRLR por inmunocitoquímica reveló su inmunolocalización principalmente en membrana y citoplasma (flechas blancas). **(C)** La localización de la PRL por inmunocitoquímica reveló su inmunolocalización de 1 a 8 horas en membrana y citoplasma (flechas blancas). Imágenes vistas a 100 aumentos por inmunofluorescencia. La densidad de la expresión de la PRL **P<0.01 y el PRLR ***P<0.001 en comparación con las células sin estímulo fue determinada midiendo la intensidad de fluorescencia en pixeles de 30 células de cada condición utilizando el software (ImageJ 1.45m).

6.2.4 Sobreexpresión de isoformas cortas del PRLR en Mo-THP1 coestimulados con PRL-rh y *CFP-M. bovis*

Mediante western blot se determinó la expresión del PRLR en monocitos coestimulados con PRL-rh y *CFP-M. bovis* identificándose 4 isoformas de 1 a 8 horas, 40, 50, 90 y 100 kDa, la proteína de mayor expresión fue la de 40 kDa. A tiempos más largos 48 y 72 horas se observó el aumento categórico de 3 isoformas 40, 50 y 65 kDa conforme al tiempo. En contraste, se observó una disminución de la isoforma de 100 kDa (Figura 14A). Al analizar la expresión de la PRL solo se observó una sola banda de 23 kDa correspondiente a la PRL-rh adicionada *in vitro* de 1 a 8 horas (Figura 14B). Por otra parte, después de las 8 horas la PRL de 23 kDa ya no se identificó. De igual manera no se apreció la expresión de la PRL autocrina de 60 kDa inducida por *CFP-M. bovis* (Figura 14B).

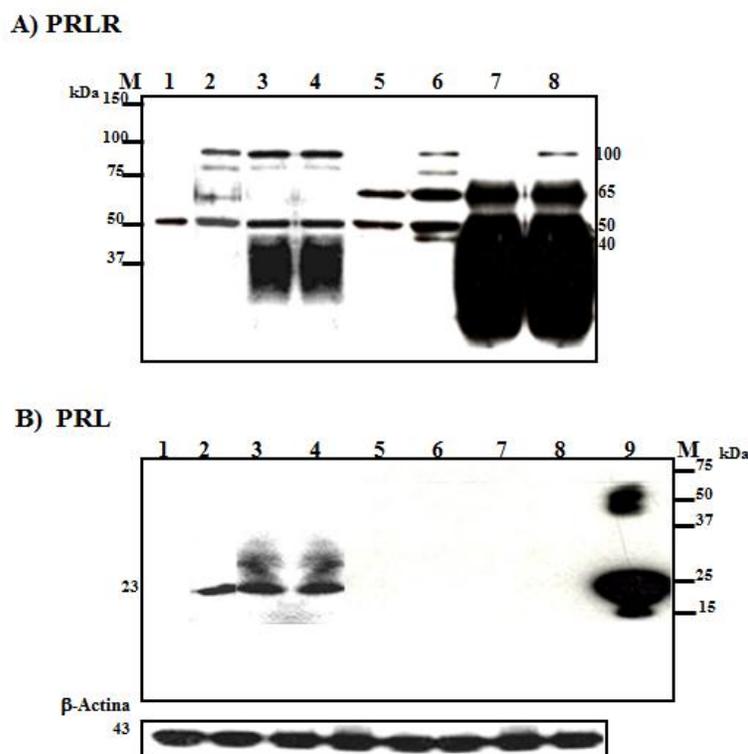


Figura 14. Caracterización de la expresión del PRLR y la PRL en Mo-THP1 coestimulados con PRL-rh+*CFP-M. bovis*. (A) La expresión del PRLR se determinó por WB. Línea 3 y 4 al coestimular la PRL-rh 20 pg/ml+*CFP-M. bovis* de 1 a 8 horas se revelaron 3 isoformas 40, 50 y 100 kDa, línea 7 y 8 de 48 y 72 horas se observaron 4 isoformas 40, 50, 65 y 100 kDa. Línea 2 LPS+ PRL-rh de 1 a 8 horas, línea 5 y 6 LPS+PRL-rh de 48 y 72 horas utilizados como control positivo, línea 1 células sin estímulo. (B) La expresión de la PRL se determinó por WB. Línea 3 y 4 al coestimular la PRL-rh 20 pg/ml+*CFP-M. bovis* de 1 a 8 horas, se reveló solo la PRL de 23 kDa, línea 7 y 8 de 48 y 72 horas no se observó esta proteína, línea 2 LPS+PRL-rh de 1 a 8 horas, línea 5 y 6 LPS+PRL-rh de 48 y 72 horas utilizados como control positivo, línea 1 células sin estímulo, línea 9 control positivo PRL-rh. Control endógeno del experimento β -actina.

6.2.5 La PRL-rh disminuyó citocinas proinflamatorias inducidas por el *CFP-M. bovis* en Mo-THP1

El análisis de nitritos y nitratos mediante el reactivo de *Greiss* nos permitió identificar que la PRL a concentración fisiológica indujo la producción de óxido nítrico en 6 μ Moles a 48 horas. En contraste, concentraciones suprafisiológicas de 100 y 200 ng/ml indujeron 10.28 y 15.53 μ M más que las células sin tratamiento (Figura 15A). Al coestimular los Mo-THP1 con PRL-rh concentración fisiológica de (20 ng/ml) y *CFP-M. bovis* se observó un decremento significativo en la síntesis de óxido nítrico de aproximadamente de 12.53 μ M a 48 horas en comparación con el estímulo de *CFP-M. bovis* (Figura 15B). Mediante ELISA se analizó el efecto inflamatorio en sobrenadante condicionado con PRL-rh 20, *CFP-M. bovis* y la coestimulación *CFP-M. bovis* más PRL 20ng/ml, esto nos permitió observar que PRL-rh no indujo la síntesis citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) (Figura 15C, D, E).

En los sobrenadantes condicionados con *CFP-M. bovis* más PRL 20ng/ml se identificó una drástica disminución de IL-1 β de 608 a 104 pg/ml aproximadamente 504 pg/ml menos (Figura 15C). Al analizar IL-6 se observó una disminución de 222 a 110 pg/ml aproximadamente 112pg/ml menos (Figura 15E). El mismo efecto se observó al determinar TNF- α apreciando una disminución de 30 a 18 pg/ml aproximadamente 12pg/ml menos (Figura 16D), la comparación de las 3 citocinas analizadas fue respecto a los sobrenadantes de las células tratadas solo con *CFP-M. bovis*. Al analizar la expresión de IL-10 se pudo observar que en la coestimulación de *CFP-M. bovis* + PRL se indujo la síntesis de esta citocina antiinflamatoria en 15 pg/ml comparado con los sobrenadantes condicionados solamente con *CFP-M. bovis*. Al bloquear el PRLR de forma estérica se observa la disminución de esta citocina considerablemente (Figura 16 D).

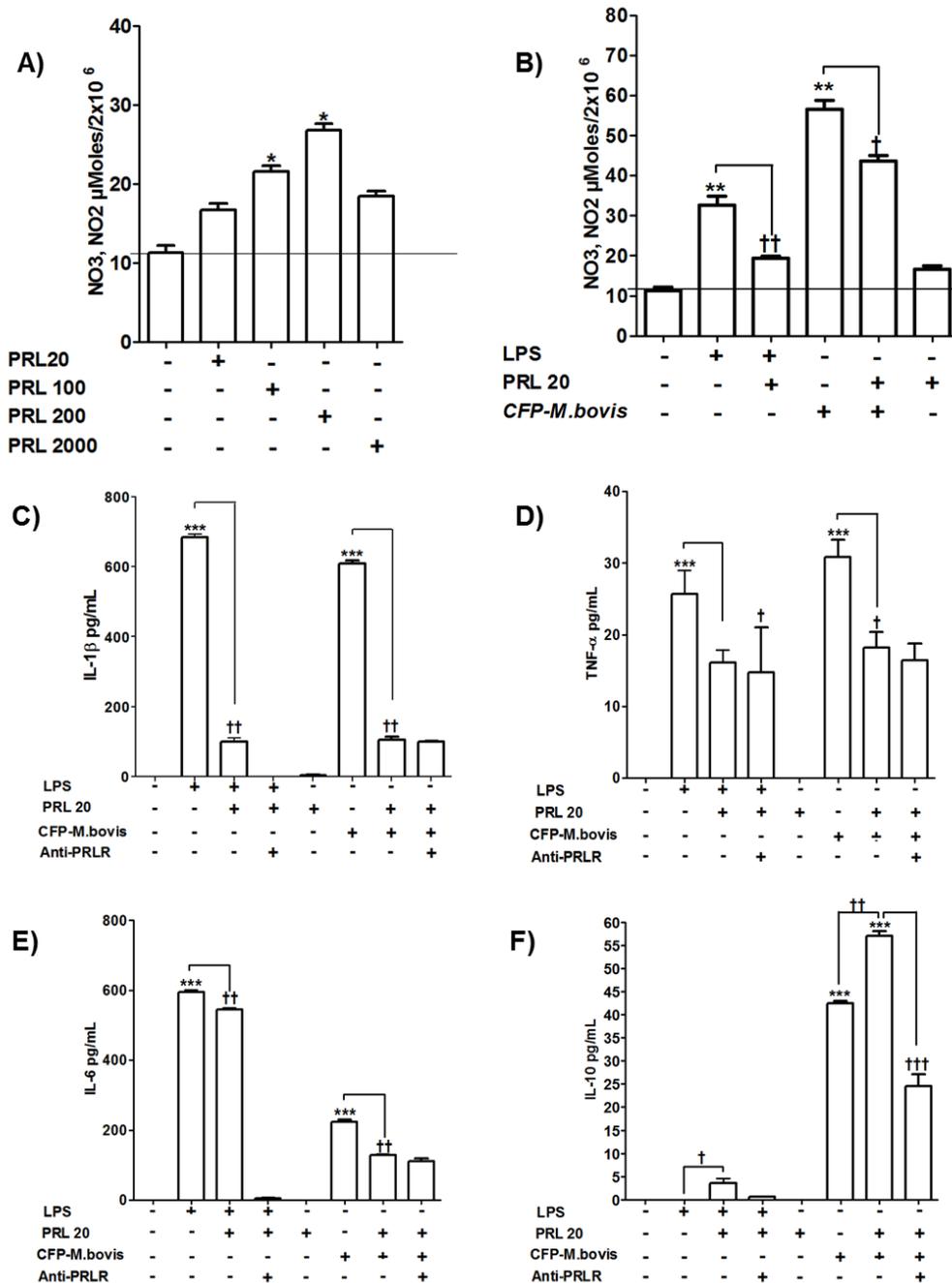


Figura 15. La PRL-rh disminuye la síntesis de ON y citocinas proinflamatorias en Mo-THP1 estimulados con CFP-M. bovis. (A) La PRL-rh indujo estrés nitrosativo a partir de 100 ng/ml, *P<0.05 comparando cada estímulo vs células sin estímulo. La producción de ON fue determinada con el reactivo de Greiss. Datos expresados en media y desviación estándar (n=3). (B) La coestimulación de PRL-rh 20 ng/ml+CFP-M. bovis se observó reducción en la síntesis de ON en (13 μMoles) a 48 horas **P<0.01 comparado CFP-M. bovis vs PRL 20 ng/ml+CFP-M. bovis. La liberación de citocinas proinflamatorias se determinó por ELISA. (C) Al coestimular PRL-rh 20 ng/ml +CFP-M. bovis se observó la disminución de la IL-1β en 504 pg/ml. (D) En el análisis del TNF-α se observó la disminución en 12 pg/ml, a 48 horas. (E) En el análisis de la IL-6 se observó la disminución en 112 pg/ml. ***P<0.001 comparado CFP-M. bovis vs células sin estímulo. †† P<0.001 comparado CFP-M. bovis vs CFP-M. bovis+PRL 20 ng/ml.

6.2.6 El CFP-*M. bovis* indujo apoptosis y proliferación celular en Mo-THP1.

Con la finalidad de investigar la funcionalidad de la PRL en los Mo-THP1 se determinó apoptosis por citometría de flujo (Anexina V/Ioduro de propidio, observándose la ausencia de muerte celular en las células estimuladas con PRL 20, 200, 2000 ng/ml a 48 horas. En contraste, las células estimuladas con CFP-*M. bovis* se observó la inducción de apoptosis temprana de aproximadamente 60% a 48 horas, también se observó diferenciación celular (Figura 16A). Al analizar proliferación por el método WST pudimos apreciar que PRL 20 ng/ml favorece la proliferación de los Mo-THP1 cinco veces más comparado con la células sin estímulo. En la coestimulación PRL+CFP-*M. bovis* pudimos observar que disminuye la proliferación comparado con el estímulo de PRL, sin embargo, se indujo 2 veces más proliferación comparado con las células sin tratamiento (Figura 16B).

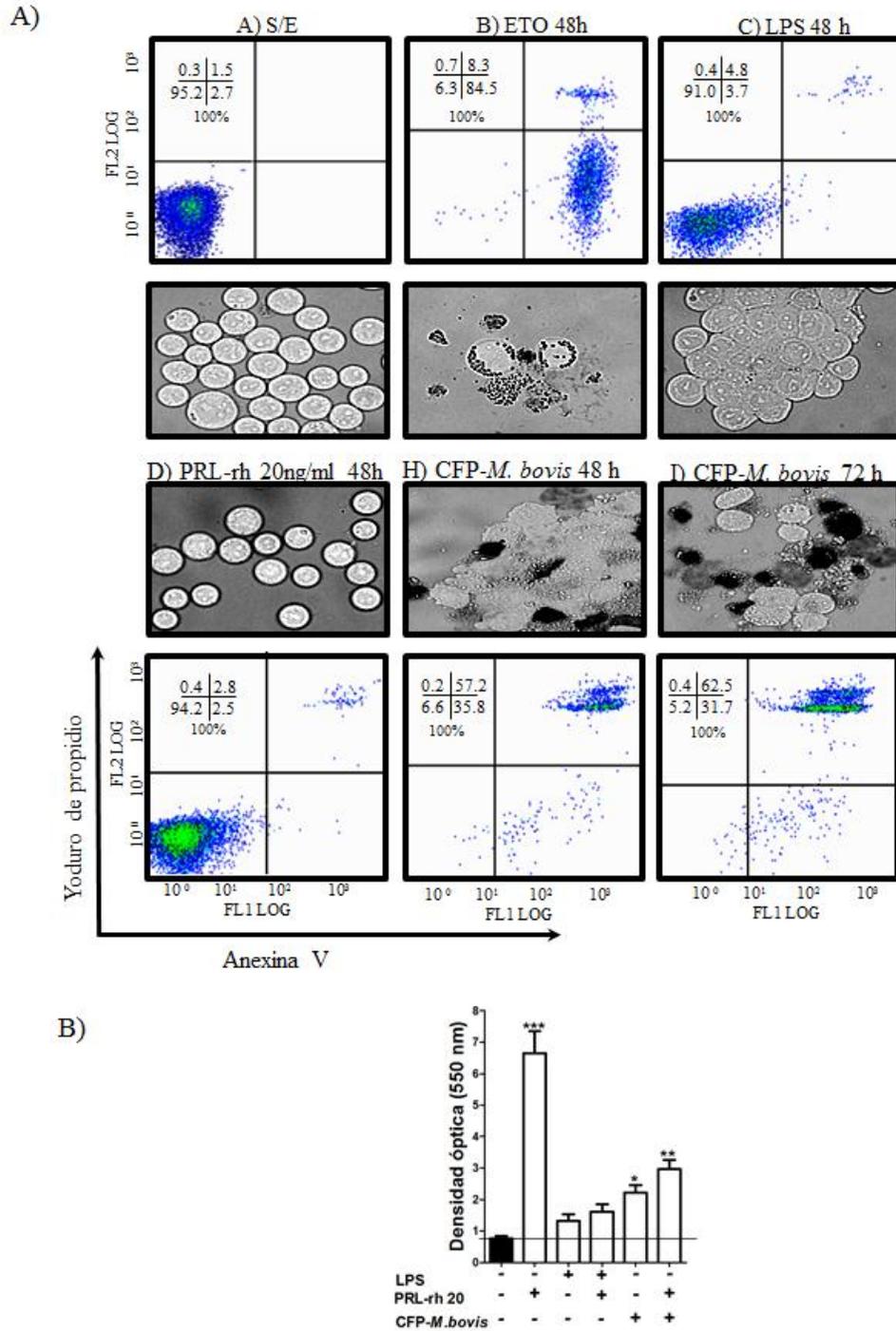
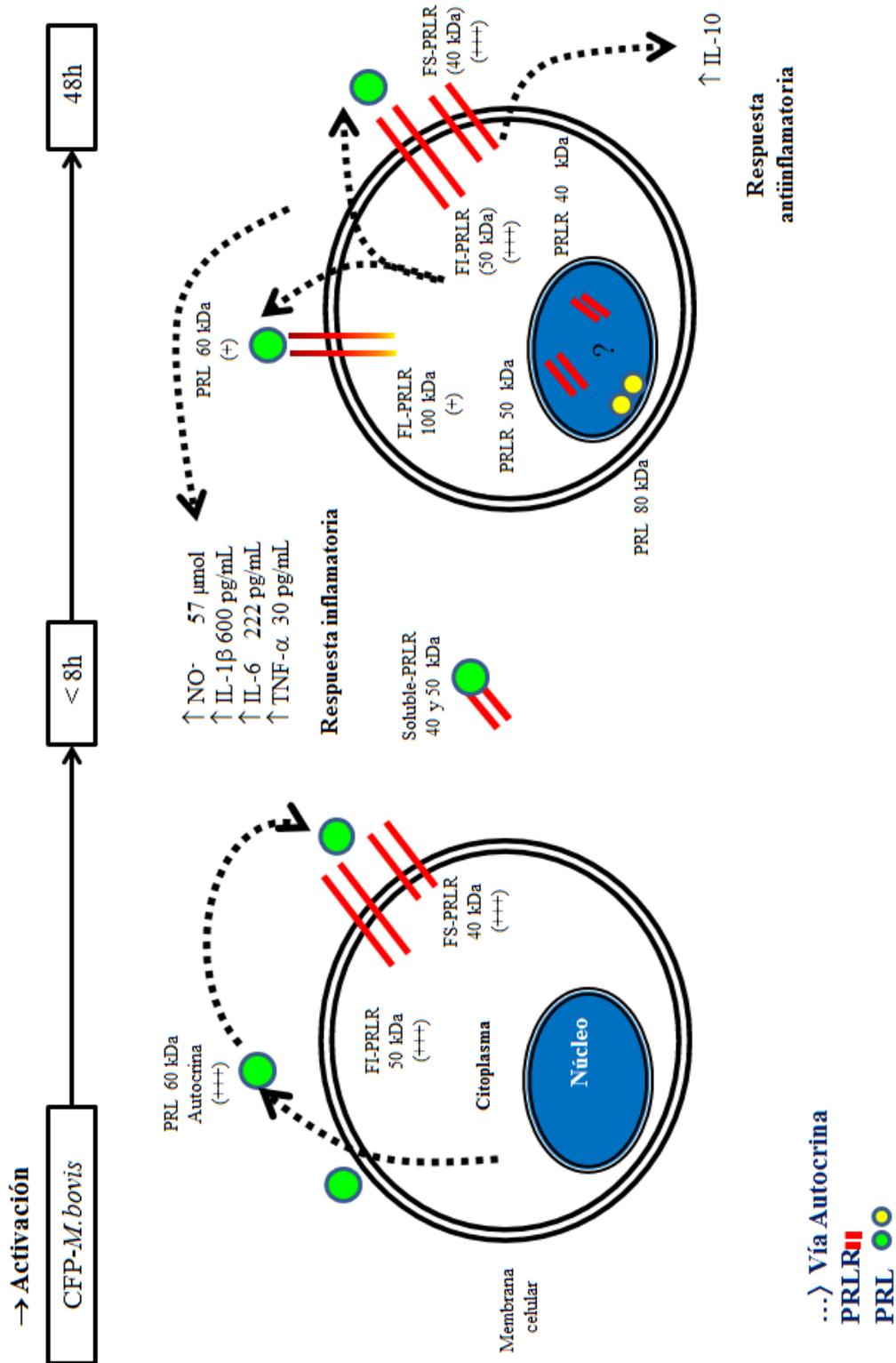
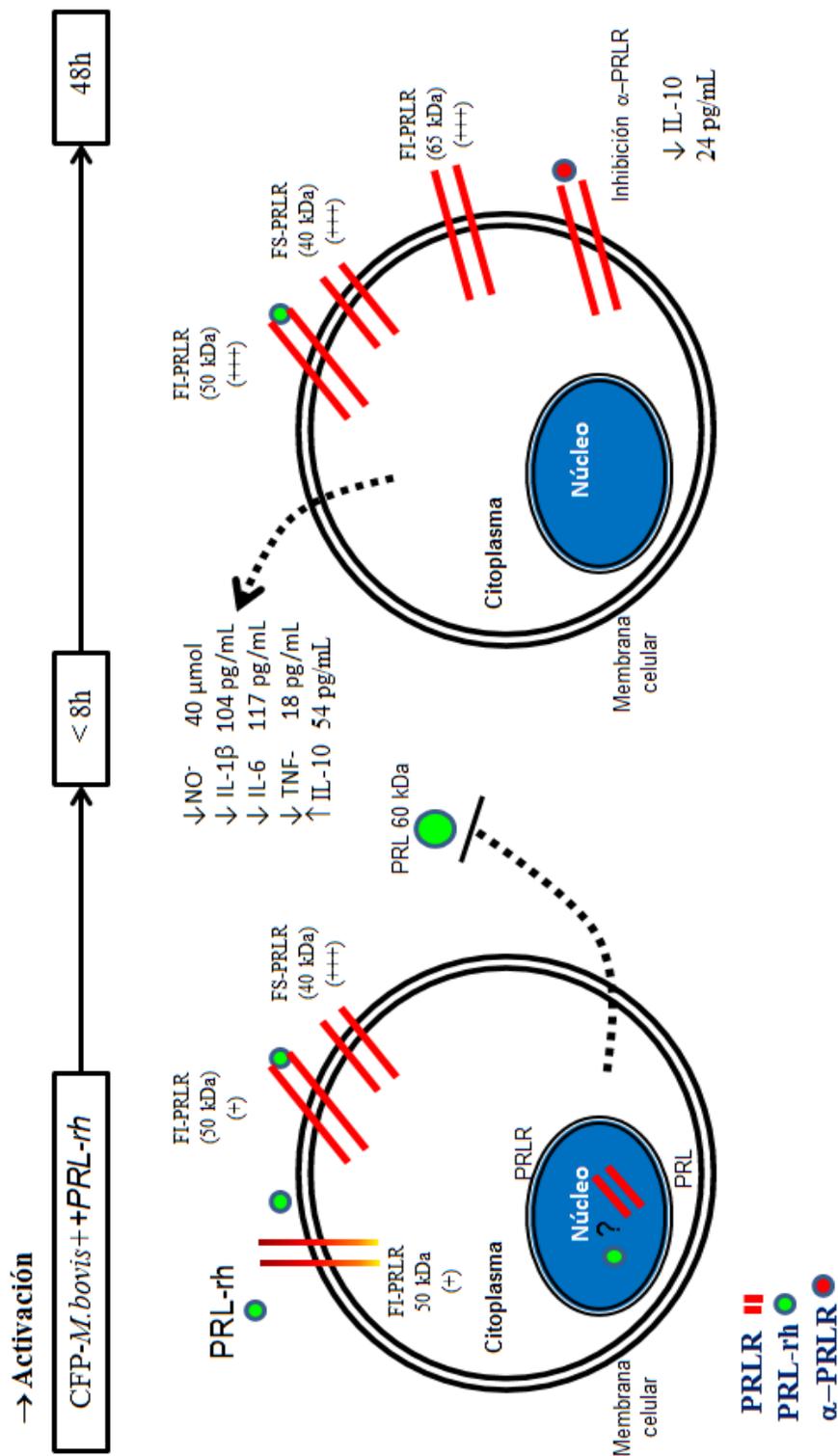


Figura 16. El CFP-*M. bovis* indujo apoptosis y proliferación celular en Mo-THP1. (A). La determinación de apoptosis se realizó por citometría de flujo (Anexina V). Podemos ver los *Dot plot* representativos de tres experimentos independientes. El CFP-*M. bovis* indujo apoptosis tardía el 60% de las células entre 48-72 horas. La PRL-rh 20 ng/ml no indujo apoptosis. Control positivo Etopósido. Por microscopía se valoraron los cambios morfológicos bajo el estímulo de CFP-*M. bovis* a 48 y 72 horas se observaron células adheridas y diferenciadas. PRL-rh 20 ng/ml no indujo cambios morfológicos a ningún tiempo. Las células fueron contra teñidas con azul de tripán. (B) La proliferación celular fue determinada por el método colorimétrico (WST-1). La estimulación con PRL-rh 20ng/ml indujo 6 veces más proliferación comparado con las células sin estímulo a 48 horas. El CFP-*M. bovis* indujo 2.8 veces más proliferación comparado con las células sin estímulo a 48 horas. Al coestimular CFP-*M. bovis*+PRL-rh 20 ng/ml se inhibe el efecto proliferativo de la PRL-rh. Los datos son expresados en media y desviación estándar (n=3). *P<0.05 comparado cada estímulo vs células sin estímulo.



Esquema 5. Sistema autocrino del PRLR y la PRL en Mo-THP1 inducido por el CFP-*M. bovis* de 1-48 horas de estimulación.



Esquema 6. Sistema autocrino del PRLR y de la PRL en Mo-THP1 coestimulados con CFP-*M. bovis*+PRL-rh de 1-48 horas de estimulación.

7.- Discusión

La PRL es un polipéptido multifuncional capaz de inducir proliferación y diferenciación celular. Ha sido documentada la síntesis de PRL en células linfoides y se considera un factor clave en la interacción de los sistemas inmuno-euroendocrino (Malaguarnera, Imbesi et al. 2004; Bellavance and Rivest 2012). No se conoce con certeza el mecanismo a través del cual la PRL ejerce su efecto inmunomodulador y podría estar afectando los procesos inflamatorios directa o indirectamente. La PRL aumenta en el suero de pacientes con TB severa junto con IFN- γ , IL-6, IL-10, cortisol, estradiol y la hormona del crecimiento (Bottasso, Bay et al. 2007; Bottasso, Bay et al. 2009; Bottasso, Maria Luisa et al. 2010); pero se desconoce si modula la inflamación granulomatosa. Los macrófagos responden a la PRL produciendo citocinas proinflamatorias, óxido nítrico y superóxido, pero su efecto real podría ser enmascarado por diversos factores autocrinos liberados en el medio condicionado. El efecto modulador de la inflamación podría derivar, principalmente, de la expresión de diversas isoformas del PRLR y/o variantes de la PRL en células de estirpe mieloide (macrófagos y monocitos). Debido a esta hipótesis, en este trabajo se investigó si la PRL participa en la inmunopatogénesis de la TBb modulando la respuesta inflamatoria en macrófagos y monocitos, mediante la expresión de diferentes isoformas del PRLR. Estudios recientes en humanos revelan que el éxito de *M. tuberculosis* recae en su capacidad para mantenerse latente por largos periodos de tiempo, se ha confirmado la persistencia del bacilo sin lesiones características de TB en pulmón y diversos tejidos extrapulmonares como riñón, bazo, hígado y tejido adiposo de la periferia de nódulo linfático, estómago y corazón; el 15% de los casos de reactivación de la enfermedad se presenta sin patología característica de TB en los pulmones (Small, Hopewell et al. 1994; Neyrolles, Hernandez-Pando et al. 2006; Barrios-Payan, Saqui-Salces et al. 2012). En bovinos nuestro grupo de trabajo y otros han observado la presencia de *M. bovis* sin respuesta celular a la tuberculina y recientemente se demostró por PCR al identificar alta frecuencia del ADN de *M. bovis* en muestras de calostro (vacas periparturientas), en comparación con muestras de leche (vacas producción)(Serrano-Moreno, Romero et al. 2008). Estos hallazgos nos sugieren que *M. bovis* podría estar en estado latente en función de los periodos fisiológicos de las vacas. Asimismo, en este trabajo se apreció que la infección por este patógeno induce la expresión de isoformas cortas del

PRLR en vacas infectadas natural y experimentalmente. Sugiriendo un efecto hormonal dependiente del estado fisiológico de la vaca lechera. Sin embargo, no hay estudios que determinen la fisiopatología de la TBb en relación a efectos neuroinmunoendocrinos. En este trabajo se relacionó la persistencia de *M. bovis* y la heterogenicidad de las isoformas del PRLR en glándula mamaria de vacas lecheras con diferentes perfiles fisiológicos e inmunológicos. Los resultados demuestran microgranulomas y células positivas a IS6110 por PCR *in situ* principalmente en MØ y células epiteloides en glándula mamaria de vacas en producción infectadas naturalmente con *M. bovis*. En humanos se ha demostrado la persistencia de *M. tuberculosis* por PCR *in situ* en tejido pulmonar proveniente de individuos sin evidencia de manifestaciones clínicas de tuberculosis, encontrando evidencia de la infección en diferentes tipos celulares incluyendo macrófagos alveolares e intersticiales, neumocitos tipo II, células endoteliales y fibroblastos provenientes de tejido pulmonar sin presencia de inflamación granulomatosa (Hernandez-Pando, Jeyanathan et al. 2000). En este trabajo, mediante PCR anidada (MPB70), se identificó positividad del 60% de las muestras de glándula mamaria de vacas en producción infectadas naturalmente. La identificación de la micobacteria en diferentes órganos y células favorecería su persistencia, evadiendo al sistema inmune y permaneciendo en el huésped durante largos períodos de tiempo. Los adipocitos se han propuesto como nichos para albergar *M. tuberculosis* en estado latente. La glándula mamaria de los bovinos en producción posee gran cantidad de tejido adiposo, que podrían favorecer la persistencia del bacilo. En contraste, en el periodo seco ocurren cambios metabólicos por la disminución en el consumo de materia seca (MS), induciendo la movilización de grasa desde el tejido adiposo (Hans 2001), esto podría favorecer la excreción de *M. bovis*. Además la identificación del ADN de la micobacteria en órganos de secreción como la glándula mamaria es de gran importancia ya que se ha demostrado que *M. bovis* es un problema de salud pública en niños que consumen productos lácteos no pasteurizados provocando altos índices de mortalidad 31% (Portillo-Gomez and Sosa-Iglesias 2011).

Las vacas en producción tienen niveles altos de la PRL en suero 60-100ng/ml y minutos después del ordeño de hasta 300 ng/ml (Eley, Thatcher et al. 1981; Negrao 2008). Estudios *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratón han demostrado que la PRL a concentraciones mayores de 100 ng/ml inducen la producción de ON, TNF- α , IL-1 β , IL-

12p40 e IFN- γ favoreciendo el perfil Th1 (Tripathi and Sodhi 2007; Sodhi and Tripathi 2008; Tripathi and Sodhi 2008). Por lo tanto, los altos niveles de la PRL que presentan las vacas en producción podrían favorecer el desarrollo de una adecuada respuesta inmune y predisponer a *M. bovis* a entrar en estado latente. En contraste, durante el periodo seco cuando los niveles de la PRL bajan a 10-20 ng/ml se podría favorecer la reactivación y diseminación de la TBb en el calostro. Estudios *in vitro* en MØ humanos demuestran que la PRL a concentraciones bajas de 5-50 ng/ml induce la expresión de Hemo-Oxigenasa (HO-1) e IL-10 favoreciendo el perfil Th2 (Malaguarnera, Imbesi et al. 2004; Mandal, Pratt et al. 2011).

La variabilidad de las isoformas del PRLR también podría determinar la funcionalidad de la PRL, sin embargo, no se ha estudiado la expresión del PRLR en los diferentes estados fisiológicos de la vaca lechera. Los resultados de este trabajo demuestran que en glándula mamaria de vacas infectadas en periodo seco y producción se induce la expresión de isoformas cortas del PRLR 40 y 50 kDa, también se detectó inmunoreacción del PRLR en el contenido de los acinos mamarios sugiriendo la expresión de formas solubles. No se sabe cuál es la funcionalidad de las formas cortas y solubles, sin embargo, en esta tesis se ha observado que son inducidas por *M. bovis*, en humanos se ha determinado que estas isoformas del PRLR modulan la expresión de las isoformas largas por un mecanismo aún no determinado (Tan and Walker 2010).

En ratones y humanos se ha determinado la expresión de una isoforma soluble del PRLR de aproximadamente 30 kDa cuya funcionalidad es comprometer al ligando (Ben-Jonathan, Mershon et al. 1996; Muthuswamy 2012). En nódulo linfático retromamario de vacas infectadas también observamos isoformas cortas de 40 y 50 kDa. En contraste, en nódulo retromamario de animales libres de TBb solo se observó la isoforma larga del PRLR de 75 kDa. Al analizar en nódulo linfático retromamario la PRL se encontró una variante de aproximadamente 80 kDa independiente a la infección y estado fisiológico de las vacas expresada principalmente en linfocitos T y macrófagos. La expresión de una variante de 80 kDa de la PRL en macrófagos sugiere que podrían ligar PRL al expresar el PRLR y/o sintetizar PRL de *ново* en consecuencia del estado patológico. La glándula mamaria podría ser un órgano donde el bacilo de la TBb persiste por largos periodos de tiempo latente, principalmente en los MØ, adipocitos y células del epitelio mamario, debido a cambios

hormonales propios de los ciclos fisiológicos de la vaca lechera, como lactancia-gestación y periodo seco-parto, cuyos perfiles hormonales podrían modular la respuesta inmune favoreciendo su activación o suprimiéndola, respectivamente. Así, la evaluación de la glándula mamaria puede contribuir a la comprensión de la patogénesis de *M. bovis* en relación al fenómeno de latencia-reactivación que podría presentarse en la vaca lechera. Esto, aunado a que existe una alta prevalencia en establos lecheros de nuestro país hace necesario estudiar y caracterizar el proceso de latencia en vacas lecheras y más aún plantear estrategias que nos permitan identificar animales que cursen por este estadio de la enfermedad. En humanos la preocupación es muy similar ya que aproximadamente un tercio de la población mundial cursa con infección latente (Cabello 2011; Gupta, Kaul et al. 2012). La tuberculina y el INF- γ son pruebas que pueden determinar que la infección se ha producido pero no si está activa o latente. El estudio de la biología de la latencia podría permitir plantear nuevas estrategias de diagnóstico y tratamientos (Esmail, Barry et al. 2012). Continuando el análisis de la participación de la prolactina y su receptor en la tuberculosis bovina, se analizó su expresión en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de animales sanos, expuestos e infectados con *M. bovis* lo que nos permitió observar que el desarrollo de la enfermedad activa podría estar induciendo formas cortas e intermedias del PRLR ya que en animales infectados se aprecia la expresión de la isoforma de 40 y 50 kDa. Sin embargo, el análisis de la PRL permitió identificar solo la variante de origen endocrino (23 kDa). Al estimular células mononucleares de animales libres de TBb con *PPD M. bovis* se corroboró la sobreexpresión de ambas isoformas del PRLR 40 y 50 kDa y una de entre 25 y 30 kDa que podría ser una isoforma soluble del PRLR. De manera interesante, también se observó la expresión de diferentes variantes de la PRL autocrina (60 y 80 kDa) en respuesta a los antígenos de la micobacteria. En humanos se ha determinado que la defensa del huésped a la tuberculosis está determinada por la interacción de los sistemas neuro-inmuno-endocrino y la prolactina puede ser un actor clave (Bottasso, Maria Luisa et al. 2010). (Bottasso, Bay et al. 2007; Bottasso, Bay et al. 2009; Bottasso, Maria Luisa et al. 2010). Está bien establecido que la PRL estimula el IFN- γ y otras citocinas proinflamatorias en modelos de infección por patógenos intracelulares como *Toxoplasma gondii* y *Leishmania sp.* (Plocinski, Dzitko et al. 2007).

Con el propósito de investigar la expresión de formas solubles del PRLR y del aumento de la PRL durante la TBb se analizó el plasma condicionado obtenido mediante la estimulación de las células de sangre periférica con PPD de *M. bovis* en animales expuestos e infectados. Este análisis nos permitió observar variantes de 16, 25, y 60 kDa de la prolactina en ambos casos: expuestos e infectados a *M. bovis*. Y en el caso del PRLR en los expuestos se observa la isoforma intermedia de 50 kDa, en infectados se observó la de 40 y 50 kDa. Interesantemente al analizar el plasma condicionado obtenido mediante la estimulación de sangre periférica con PPD de *M. bovis* en animales expuestos e infectados después de ser vacunados con (BCG+CFP +adyuvante (carbopol), se observó que la inmunización cambió el patrón de isoformas del PRLR y de la PRL en animales expuestos e infectados con *M. bovis*. En los expuestos se inducen las formas solubles de 40 y 50 kDa del PRLR, probablemente por los antígenos de la micobacteria contenidos en la vacuna. Mientras que en animales infectados se observó la ausencia total del PRLR en plasma. En cuanto a la PRL se observó que disminuyó en animales expuestos e infectados siendo más evidente en los infectados. Por lo tanto, el sistema PRL/PRLR puede ser inducido por el estado patológico de los bovinos y podría ser determinante en inmunidad innata de la tuberculosis bovina, las formas largas favoreciendo la respuesta inmune, mientras que las formas cortas podrían antagonizar el efecto pudiendo ser un mecanismo de virulencia del patógeno que le permita sobrevivir y evadir la respuesta inmunológica. Las formas cortas de 40 kDa también podrían ser útiles como un biomarcador de la infección por *M. bovis*.

Los datos observados *ex vivo* nos indujeron a buscar una correlación *in vitro* donde las variables fueron planeadas y controladas, para corroborar la participación del PRLR y la PRL en la patogénesis de la TBb. Los monocitos y MØ desempeñan importantes funciones reguladoras y efectoras del sistema inmune. La inmunidad innata es una respuesta instantánea al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos principalmente a través de familias receptores tipo Toll (TLR) (Berczi, Quintanar-Stephano et al. 2009). En MØ derivados de mononucleares de sangre periférica de bovinos lecheros libres de TBb se determinó la expresión del complejo PRL/PRLR bajo el estímulo de CFP-*M. bovis* detectando la expresión de las isoformas cortas del PRLR 40 y 50 kDa y la variante autocrina de la PRL de 80 kDa. En contraste, en MØ sin estímulo no se observaron estas proteínas. Durante la inflamación rápidamente las terminaciones simpáticas del

sistema nervioso sintetizan y libera catecolaminas y dopamina. Recientemente se ha determinado que las células inmunes incluyendo MØ también sintetizan estos neurotransmisores (Flierl, Rittirsch et al. 2007) y más aún, también expresan receptores de la dopamina y catecolaminas (Carvalho-Freitas, Rodrigues-Costa et al. 2008; Sarkar, Basu et al. 2010). Por lo tanto, las catecolaminas y la dopamina también podrían regular la síntesis de la PRL en las células mieloides. La sobreexpresión del PRLR y de la PRL autocrina podría estar determinada por el estímulo antigénico de *CFP-M. bovis*, estas observaciones permitirían postular la descripción de un nuevo sistema autocrino en MØ. Los macrófagos podrían ser claves en la inflamación por su plasticidad en respuesta a neurotransmisores y hormonas que dependiendo de la isoforma del receptor que expresen pueden favorecer un perfil proinflamatorio o antiinflamatorio (Ley, Weigert et al. 2010; Scotland, Patil et al. 2011). Sin embargo, los MØ tienen diversos mecanismos de regulación autocrina TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-18, IL-1b, IL-10, NE, PGE2, ON (Ma, Chen et al. 2003; Berczi 2010) y cada uno de ellos podría influir en el análisis de las moléculas bajo estudio (la PRL y el PRLR). Por lo tanto, para corroborar las observaciones en MØ se analizó la expresión de la prolactina y su receptor en los Mo-THP1 sin derivar a MØ estimulados con *CFP-M. bovis* (Plocinski, Dzitko et al. 2007), disminuyendo la interacción de otras moléculas secretadas por mecanismos autocrinos (citocinas y hormonas). Como control positivo de los experimentos fue utilizado LPS ya que se ha caracterizado que induce una respuesta inflamatoria en Mo-THP1 (Tsuchiya, Yamabe et al. 1980; Auwerx 1991; Daigneault, Preston et al. 2010). El LPS activa la respuesta innata en los fagocitos mononucleares, siendo regulada por la interacción de citocinas, hormonas, neurotransmisores y péptidos (Berczi, Chow et al. 1998). Es un ligando específico para TLR4, que en conjunto con otros receptores pueden cooperar para facilitar el reconocimiento y conducir a la pronta erradicación de diferentes patógenos en torrente sanguíneo y los tejidos (Calvano, Agnese et al. 2003). Esta caracterizado que después del estímulo con LPS los monocitos y MØ sintetizan citocinas proinflamatorias a través de vías de señalización que activan el factor de transcripción NF-kappa B (Medzhitov and Janeway 1998). Un estímulo primario puede influenciar el perfil de los MØ, a desafíos posteriores, ya que una vez activado los MØ son secretores de grandes cantidades de productos nocivos (Gordon and Taylor 2005). Sin embargo, poco se sabe sobre el papel de la PRL en la

homeostasis durante la inflamación en los monocitos, ya que la mayoría de trabajos se han realizado utilizando MØ diferenciados (Pellegrini, Lebrun et al. 1992; Tripathi and Sodhi 2007; Sodhi and Tripathi 2008; Tripathi and Sodhi 2008). Los resultados demuestran que los antígenos del *CFP-M. bovis* inducen la síntesis ARNm del PRLR en Mo-THP1. Los *primers* utilizados para amplificar el gen del PRLR fueron diseñados para detectar todas las isoformas que tengan los exones 7, 8, y 9 que incluye las isoformas LF, IF, Δ SF1, SF1a, SF1b, Δ 4-SF1b, Δ 4/6-SF1a y SF1c (Wei and Wei 2010; Brooks 2012). (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PRLRID42891ch5p14.html>). En este trabajo fue detectada la expresión bifásica del PRLR a nivel ARNm a 1 hora post estimulación se observó 404.64 veces más ARNm del PRLR comparado con las células sin estímulo, disminuyendo tiempo dependiente ya que a 72 horas solo se determinó un incremento de 107.04 veces más.

En cuanto a proteínas, el patrón de expresión fue tiempo dependiente para las isoformas cortas del PRLR 40 y 50 kDa inducidas por el *CFP-M. bovis*. La sobreexpresión de las isoformas cortas fue observada de 1 a 48 horas, adicionalmente estas isoformas fueron observadas en el medio condicionado. La heterogenicidad del PRLR sugiere una regulación transcripcional del PRLR en Mo-THP1 tratados con *CFP-M. bovis*. Sin embargo, la isoforma de 50 kDa podría estar regulada por splicing alternativo o modificaciones postraduccionales, como se ha reportado en cáncer de mama (Kline, Roehrs et al. 1999). La variabilidad de las isoformas del PRLR está determinada en el dominio intracelular principalmente atribuida a *splicing* alternativo y/o proteólisis de isoformas largas (Wei and Wei 2010). La expresión de formas cortas (SF1a and SF1b) actúan como dominantes negativas de la PRL a través de la formación de heterodímeros con isoformas largas (Tan and Walker 2010). El incremento de la isoforma de 40 y 50 kDa así como las formas solubles inducidas por los antígenos de la micobacteria, podrían ser determinante en la patogénesis de la tuberculosis ya que la sobreexpresión de formas cortas y solubles podría inducir vías de señalización alternas como (PI3K/AKT) favoreciendo la persistencia y diseminación del bacilo.

Los resultados de PCR en tiempo real se realizaron flanqueando una región altamente conservada del gen de la PRL correspondiente a los exones 4 y 5, este estudio nos permitió observar un incremento bifásico en la transcripción del ARNm de la PLR en

Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis*, se observó 176.93 veces más ARNm de la PRL comparado con las células sin estímulo, disminuyendo tiempo dependiente a 72 horas solo se determinó un incremento de 35.52 veces más. A nivel proteína se identificaron dos proteínas de 60 y 80 kDa entre 1 y 8 horas correspondiente a una PRL de alto peso molecular, a 48 y 72 horas solo se observó la proteína de 80 kDa, la PRL de 60 kDa ya había sido reportada previamente usando un anti-PRL mAB por WB e IHQ (Shoupe, Montz et al. 1983). La variabilidad del peso a 80 kDa podría ser determinada por la unión de proteínas chaperonas a la PRL por ejemplo ciclofilina b con un peso de 22 kDa, estudios previos han determinado que ciclofilina b potencia significativamente la acción biológica de la PRL ya que facilita su traslocación al núcleo y favorece la expresión génica (Rycyzyn, Reilly et al. 2000; Rycyzyn and Clevenger 2002). Este mismo grupo de trabajo ha determinado que el complejo ciclofilina b/PRL favorece proliferación y motilidad celular favoreciendo la tumorigenesis (Fang, Flegler et al. 2009; Fang, Zheng et al. 2010).

Recientemente, se ha demostrado la localización del PRLR en núcleo de células T47D y MCF7 funcionando como coactivador en la transcripción de STAT5a sugiriendo su participación en la patofisiología del cáncer (Fiorillo, Medler et al. 2011). También podría ser clínicamente importante en enfermedades autoinmunes donde se ha observado el incremento del PRLR en células B (Ledesma-Soto, Blanco-Favela et al. 2012). En este trabajo se determinó la expresión de la PRL de 60 kDa en sobrenadante condicionado de 1-4 horas, después de 8 horas de estímulo la PRL fue inmunolocalizada en núcleo de Mo-THP1. En contraste, la PRL de 60 y 80 kDa no fue expresada en células sin tratamiento. Mediante ensayos de proliferación en células Nb2 lactógeno dependientes se corroboró la bioactividad de la PRL de 60 kDa en medio condicionado, dependiente y saturable. La bioactividad de la PRL de 60 kDa fue específica ya que fue inhibida con un anti-PRL (mAB) adicionado al medio condicionado. El análisis de la bioactividad mediante ensayos de proliferación de células Nb2 refuerza nuestras observaciones de síntesis, liberación y localización de la PRL de alto peso molecular en Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis*. Esta variante de la PRL de 60 kDa fue previamente descrita en suero, plasma y linfocitos humanos (Champier, Claustrat et al. 1987; Larrea, Martinez-Castillo et al. 1997), pero este es el primer reporte que demuestra la síntesis, expresión y localización de esta hormona en células mieloides. Los Mo-THP1 no diferenciados comparten características con monocitos

de sangre periférica lo que nos permite hipotetizar que podrían ser fuente de la PRL de alto peso molecular identificada *in vivo* durante el curso de varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes en humanos (Hurme, Viherluoto et al. 1992; Paraiba, Soares et al. 2010; Jara, Medina et al. 2011; Shelly, Boaz et al. 2012). Este es el primer reporte de la localización del PRLR y la PRL en medio de cultivo, membrana celular y en núcleoplasma en Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis*. La inmunoinhibición del PRLR con un anti-PRLR mAB contra el dominio extracelular promovió la formación del complejo ligando-receptor en el medio y superficie celular pero no en el citoplasma o núcleoplasma, sugiriendo que el impedimento estérico impidió la traslocación de la PRL al interior de la célula (Trott, Hovey et al. 2003). La liberación de la PRL autocrina y la exportación al núcleo podría mediar algunos efectos génicos en los monocitos, como previamente ha sido propuesto en células cancerígenas (Rycyzyn and Clevenger 2002; Clevenger, Gadd et al. 2009). La colocalización de la PRL de alto peso molecular con el PRLR sugiere una interacción autocrina en monocitos semejante al observado en las células lactotropas de glándula pituitaria (Grattan and Kokay 2008; Grattan, Steyn et al. 2008); pero el mecanismo de como interacciona la PRL y el PRLR en monocitos es incierto. Nosotros no podemos descartar la hidrólisis de las isoformas largas del PRLR y la liberación de isoformas solubles en Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis* (Clevenger, Freier et al. 1998; Kline, Roehrs et al. 1999; Hu, Meng et al. 2001; Kline, Rycyzyn et al. 2002; Piazza, Lu et al. 2009). Algunos antígenos de *M. bovis* son reconocidos inmediatamente por los receptores tipo toll (TLR2, 4, 9) (Medzhitov and Janeway 1998; Akira, Uematsu et al. 2006). Los receptores TLR2 y TLR 4 son expresados en Mo-THP1, por lo tanto, experimentos con monocitos no diferenciados podrían ser útiles para determinar el mecanismo de acción de la PRL y el PRLR asociado al reconocimiento de PAMS del *CFP-M. bovis* (Yang, Tamai et al. 2001). El extracto proteico de *M. tuberculosis* ha demostrado la inducción de citocinas inflamatoria (IL-1 β , TNf- α , INF- γ) y la expresión de receptores en la membrana de fagocitos mononucleares para modular el sistema inmunitario del hospedero de manera muy similar a la infección con la bacteria viva (Arce Mendoza, Rosas Taraco et al. 2008). En este trabajo nosotros observamos que el *CFP-M. bovis* indujo la expresión del PRLR y la PRL en Mo-THP1, la expresión de PRL de alto peso molecular fue observada previamente en células linfoides (Pellegrini, Lebrun et al. 1992; Larrea, Martinez-Castillo

et al. 1997). También detectamos la expresión de la PRL y el PRLR en monocitos derivados de sangre periférica de humanos y vacas estimuladas con LPS (Datos no mostrados). La reprogramación es un proceso regulatorio en respuesta a posibles daños en fagocitos mononucleares, esto impulsado principalmente por hormonas y citocinas que potencializan el proceso (Ma, Chen et al. 2003; Dai, Matsuno et al. 2004; Flierl, Rittirsch et al. 2007; Carvalho-Freitas, Rodrigues-Costa et al. 2008). El sistema autocrino de la PRL identificado en los Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis* podría jugar un importante rol en la restauración de la homeostasis durante la respuesta inmune innata y procesos inflamatorios *in vivo*. En peces se ha determinado que la PRL concentraciones suprafiológica 100 ng/ml polariza a los MØ a un perfil M1 manteniendo una comunicación bidireccional entre receptores tipo Toll y el PRLR favoreciendo citocinas proinflamatorias (Olavarria, Sepulcre et al. 2010; Romero, Manriquez et al. 2012). En MØ peritoneales de ratón concentraciones suprafiológicas de la PRL de 100 ng/ml inducen estrés nitrosativo de más de 20 uM. a 36 horas de estímulo (Tripathi and Sodhi 2007). En este mismo modelo se ha determinado que la PRL induce activación MØ a través de la vía de señalización (Jak2/STAT1/ NF-kappa B) con la inducción de citocinas proinflamatorias como IL- β , TNF- α , IL-12p40 e INF- γ (Tripathi and Sodhi 2008).

La síntesis de la PRL de la glándula pituitaria podría tener implicaciones fisiológicas o ser una consecuencia patológica. Se ha observado que algunas variantes de la PRL antagonizan la función biológica de la PRL nativa, por ejemplo, se sabe que la PRL nativa tiene propiedades angiogénicas, mientras la variante de 16 kDa derivada de proteólisis tiene funciones anti-angiogénicas (Aranda, Rivera et al. 2005; Lkhider, Seddiki et al. 2010). La PRL de 60 kDa es un dímero de subunidades glicosiladas de 25 kDa unidas covalentemente (Champier, Claustrat et al. 1987). La glicosilación de asparagina 31 en la PRL es característica de la unión covalente y la formación de dímeros (Barnes, Hansen et al. 1984; Haynes 1998), esta variante ha sido detectada en humanos y ganado (Lewis, Singh et al. 1989; Sinha 1995). Comparada con la forma monomérica las formas diméricas tienen menor afinidad por el PRLR lo que reduce su capacidad biológica posiblemente por enmascarar sitios de unión a su receptor (Bollengier, Mahler et al. 2001). Sin embargo, hay evidencias de que formas glicosiladas están envueltas en mecanismos de secreción (Sinha

1995), almacenamiento (Mena, Hummelt et al. 1992) y formación de diferentes fragmentos por proteólisis con diferentes funciones biológicas (Champier, Claustrat et al. 1987).

Por otra parte, con la finalidad de investigar los efectos de la prolactina neuroendocrina los Mo-THP1 fueron estimuladas con la PRL recombinante humana (PRL-rh) y se observó la inducción en expresión de su propio receptor. La isoforma de mayor expresión es la corta de 40 kDa de 4 a 8 horas. De igual manera, se identificó que la PRL-rh indujo la síntesis de la PRL autocrina de 60 kDa de 1-4 horas. Posiblemente esta molécula tiene mayor afinidad a receptores. También observó que el ARNm del PRLR aumentó 701.46 veces a 48 horas, en contraste, fue inhibida la expresión del ARNm de PRL autocrina. Al coestimular los Mo-THP1 con *CFP-M. bovis* y PRL-rh se determinó la inducción de la forma corta del PRLR de 40 kDa de 1-8 horas, a 48 y 72 horas podemos apreciar la sobreexpresión de las isoformas de 40, 50 y 65 kDa y la inhibición de la expresión de la isoforma larga de 100 kDa.

Por otra parte, la PRL-rh bloqueó completamente la síntesis de la PRL autocrina de 60 kDa. Por lo tanto, la inhibición de la PRL autocrina y la sobreexpresión de las formas cortas del PRLR podrían modular la inflamación. Se ha demostrado la presencia de una molécula de la PRL de 60 kDa muy similar en linfocitos, con actividad biológica similar a la PRL endocrina (DiMattia, Gellersen et al. 1988; Larrea, Martinez-Castillo et al. 1997). En pacientes con el síndrome de Sjögren's se ha identificado una PRL de 60 kDa sintetizada y sobreexpresada en células epiteliales de glándulas salivales asociada al incremento de la gravedad de la enfermedad (Steinfeld, Rommes et al. 2000). La dominancia de la PRL endocrina sobre la autocrina/paracrina podría deberse principalmente a las diferencias de afinidad de cada isoforma del PRLR expresada en los monocitos o a la activación de una diferente vía de señalización, como STAT5b que demostró inhibir la sintasa de óxido nítrico inducida por LPS (Corbacho, Macotela et al. 2003). Se ha demostrado que la secreción de la PRL autocrina secretada en células epiteliales de glándula mamaria induce la vía de señalización Akt/STAT5 a y b favoreciendo la transcripción de genes que codifican para proteínas y lípidos de la leche; además favorece el desarrollo y diferenciación de células lactogénicas de la glándula mamaria (Chen, Boxer et al. 2010; Chen, Stairs et al. 2012; Muthuswamy 2012). En MØ peritoneales de peces también se ha observado que al coestimular con la PRL y diferentes homotopos se aprecia un efecto anti-

inflamatorio (Olavarria, Sepulcre et al. 2010). En este trabajo también se analizó la liberación de citocinas proinflamatorias en los sobrenadantes de los Mo-THP1 estimulados con *CFP-M. bovis* se pudo corroborar la inducción de altos niveles de citosinas proinflamatorias, en contraste, al coestimular con PRL-rh 20 ng/ml se observó un notable decremento de estas citocinas. Este efecto principalmente se asocia a la sobreexpresión de isoformas cortas 40 y 50 kDa y a la inhibición de la PRL autocrina de 60 kDa que posiblemente este favoreciendo el perfil proinflamatorio. Sin embargo, también se determinó que PRL-rh 20ng/ml al ser administrada con *CFP-M. bovis* indujo la expresión y liberación de IL-10 favoreciendo el efecto antiinflamatorio. Al inhibir estéricamente el PRLR con anti-PRLR se observó la disminución tajante de IL-10. Por lo tanto, la PRL concentraciones fisiológicas en coestimulación con homotopos podrían favorecer el perfil antiinflamatorio en Mo-THP1. En contraste, concentraciones suprafisiológicas de más de 50ng/ml de PRL han demostrado favorecer el perfil de citocinas TH1 regulando la función supresora de las células T reguladoras. Esto se puede relacionar con enfermedades autoinmunes donde la hiperprolactinemia podría suprimir la actividad de las T reguladoras y favorecer la activación de las T efectoras exacerbando la inflamación y con ello la progresión de enfermedad (Legorreta-Haquet, Chavez-Rueda et al. 2012).

8.-Conclusiones

- Los resultados *ex vivo* durante la TBb e *in vitro* en Mo-THP1 demuestran que concentraciones fisiológicas de la PRL 20 ng/ml y la expresión de isoformas cortas de su receptor inducidas por *M.bovis* podrían modular la inflamación granulomatosa en la tuberculosis bovina favoreciendo una respuesta Th2 y la persistencia del bacilo.
- En este estudio se demuestra un mecanismo autocrino mediado por la PRL de (60 y 80 kDa) y la expresión de 2 isoformas del PRLR (40 y 50 kDa) durante la respuesta inflamatoria inducida por *M. bovis* y el estímulo del CFP- *M. bovis*.
- Concentraciones de la PRL mayores a 50ng/ml podrían favorecer el perfil de citocinas Th1. En contraste, concentraciones fisiológicas menores a 20 ng/ml inducirían la expresión de citocinas antiinflamatorias modulando el curso clínico de la tuberculosis.
- La variación en las concentraciones de la PRL podrían modificar la expresión de las isoformas del PRLR y con ello inducir diferentes vías de señalización y expresión génica.

9.-Perspectivas

- Estudiar y comprender la regulación del sistema autocrino de la prolactina y del PRLR en monocitos y macrófagos.
- Secuenciar aminoácidos y ADN de las isoformas del PRLR (40, 50 y 65 kDa) inducidas por los antígenos de la micobacteria en Mo-THP1.
- Secuenciar aminoácidos y ADN de las variantes de la PRL autocrina (60 y 80 kDa) inducidas por los antígenos de la micobacteria en Mo-THP1.
- Clonar las isoformas del PRLR y determinar funcionalidad en Mo-THP1 estimulados con CFP-*M. bovis*.
- Analizar vías clásicas de señalización de la PRL y del PRLR (STAT1 (a y b), STAT3 (a y b), y STAT5 (a y b) en Mo-THP1 estimulados con CFP-*M. bovis*.
- Analizar vías alternas de señalización de la PRL y del PRLR MAPK/ERK (1 y 2) y PI3k/Akt (1, 2 y 3) en monocitos estimulados con CFP-*M. bovis*.
- Analizar vías de señalización clásicas y alternas en Mo-THP1 estimulados con PRL-rh.
- Determinar si las isoformas cortas del PRLR favorecen la expresión de citocinas antiinflamatorias IL-10, IL-14, TGF- β .
- Determinar los mecanismos que regulan la expresión de la PRL autocrina inducida por CFP-*M. bovis*.
- Buscarcar nuevos blancos terapéuticos para bloquear los efectos adversos en la inflamación asociados a hiperprolactinemia, contemplando la variabilidad de las isoformas del PRLR.

10.-. Bibliografía

- Ahmad, S. (2011). "Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection." Clin Dev Immunol **2011**: 814943.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Alvarez-Nemegyei, J., A. Cobarrubias-Cobos, et al. (1998). "Bromocriptine in systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled study." Lupus **7**(6): 414-419.
- Anderson, G. M., P. Beijer, et al. (2006). "Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation." Endocrinology **147**(10): 4996-5005.
- Anderson, S. T., J. L. Barclay, et al. (2006). "Mechanisms underlying the diminished sensitivity to prolactin negative feedback during lactation: reduced STAT5 signaling and up-regulation of cytokine-inducible SH2 domain-containing protein (CIS) expression in tuberoinfundibular dopaminergic neurons." Endocrinology **147**(3): 1195-1202.
- Aranda, J., J. C. Rivera, et al. (2005). "Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(8): 2947-2953.
- Arce Mendoza, A. Y., A. G. Rosas Taraco, et al. (2008). "Los extractos de Mycobacterium tuberculosis inducen la producción selectiva de citocinas inflamatorias y receptores de membrana." Medicina Universitaria **10**((39)): 79-86.
- Auwerx, J. (1991). "The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation." Experientia **47**(1): 22-31.
- Bacalhau, S., C. Freitas, et al. (2011). "Successful Handling of Disseminated BCG Disease in a Child with Severe Combined Immunodeficiency." Case Report Med **2011**: 527569.
- Barnes, G., W. J. Hansen, et al. (1984). "Asparagine-linked glycosylation in Saccharomyces cerevisiae: genetic analysis of an early step." Mol Cell Biol **4**(11): 2381-2388.
- Barrios-Payan, J., M. Saqui-Salces, et al. (2012). "Extrapulmonary Locations of Mycobacterium tuberculosis DNA During Latent Infection." J Infect Dis.
- Bellavance, M. A. and S. Rivest (2012). "The neuroendocrine control of the innate immune system in health and brain diseases." Immunol Rev **248**(1): 36-55.
- Ben-Jonathan, N., J. L. Mershon, et al. (1996). "Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects." Endocr Rev **17**(6): 639-669.
- Berczi, I. (2010). "NEW INSIGHTS TO NEUROIMMUNE BIOLOGY." Elsevier First edition: 284.
- Berczi, I., D. A. Chow, et al. (1998). "Neuroimmunoregulation and natural immunity." Domest Anim Endocrinol **15**(5): 273-281.
- Berczi, I., E. Nagy, et al. (1981). "Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones." Acta Endocrinol (Copenh) **98**(4): 506-513.
- Berczi, I., A. Quintanar-Stephano, et al. (2009). "Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing." Ann N Y Acad Sci **1153**: 220-239.

- Bernichtein, S., P. Touraine, et al. (2010). "New concepts in prolactin biology." J Endocrinol **206**(1): 1-11.
- Bernton, E. W., M. S. Meltzer, et al. (1988). "Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice." Science **239**(4838): 401-404.
- Berrington, W. R. and T. R. Hawn (2007). "Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?" Immunol Rev **219**: 167-186.
- Bole-Feysot, C., V. Goffin, et al. (1998). "Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice." Endocr Rev **19**(3): 225-268.
- Bollengier, F., A. Mahler, et al. (2001). "Glycosylated rat prolactin: isolation and structural characterization." Arch Physiol Biochem **109**(2): 180-190.
- Bottasso, O., M. L. Bay, et al. (2007). "The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis." Scand J Immunol **66**(2-3): 166-175.
- Bottasso, O., M. L. Bay, et al. (2009). "Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology." Neuroimmunomodulation **16**(2): 68-77.
- Bottasso, O., B. Maria Luisa, et al. (2010). "THE IMMUNE-ENDOCRINE-METABOLIC UNIT DURING HUMAN TUBERCULOSIS." Current Immunology Reviews **6** ((4)): 314-322.
- Bottasso, O., B. Maria Luisa, et al. (2010). "THE IMMUNE-ENDOCRINE-METABOLIC UNIT DURING HUMAN TUBERCULOSIS." Current Immunology Reviews **6** ((4)): 314-322. .
- Brooks, C. L. (2012). "Molecular mechanisms of prolactin and its receptor." Endocr Rev **33**(4): 504-525.
- Brudey, K., J. R. Driscoll, et al. (2006). "Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology." BMC Microbiol **6**: 23.
- Cabello, C. F. (2011). "[Tuberculosis: steady dynamics between past and present to imagine the future]." Rev Med Chil **139**(7): 829-832.
- Calvano, J. E., D. M. Agnese, et al. (2003). "Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance." Shock **20**(5): 415-419.
- Carvalho-Freitas, M. I., E. C. Rodrigues-Costa, et al. (2008). "In vitro macrophage activity: biphasic effect of prolactin and indirect evidence of dopaminergic modulation." Neuroimmunomodulation **15**(2): 131-139.
- Cavaco, B., V. Leite, et al. (1995). "Some forms of big big prolactin behave as a complex of monomeric prolactin with an immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia or prolactinoma." J Clin Endocrinol Metab **80**(8): 2342-2346.
- Clevenger, C. V., D. O. Freier, et al. (1998). "Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system." J Endocrinol **157**(2): 187-197.
- Clevenger, C. V., S. L. Gadd, et al. (2009). "New mechanisms for PRLr action in breast cancer." Trends Endocrinol Metab **20**(5): 223-229.
- Cohen, H., P. Guillaumot, et al. (1993). "Characterization of a prolactin binding protein in rat serum." Endocrinology **132**(6): 2601-2606.

- Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-544.
- Cooper, A. M. (2009). "Cell-mediated immune responses in tuberculosis." Annu Rev Immunol **27**: 393-422.
- Cooper, A. M., J. Magram, et al. (1997). "Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis." J Exp Med **186**(1): 39-45.
- Corbacho, A. M., Y. Macotela, et al. (2003). "Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts." FEBS Lett **544**(1-3): 171-175.
- Corbacho, A. M., Y. Macotela, et al. (2000). "Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms." J Endocrinol **166**(1): 53-62.
- Corbacho, A. M., G. Valacchi, et al. (2004). "Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides." Am J Physiol Endocrinol Metab **287**(4): E750-757.
- Coss, D., C. B. Kuo, et al. (1999). "Dissociation of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5 activation after treatment of Nb2 cells with a molecular mimic of phosphorylated prolactin." Endocrinology **140**(11): 5087-5094.
- Champier, J., B. Claustrat, et al. (1987). "Detection and enzymatic deglycosylation of a glycosylated variant of prolactin in human plasma." FEBS Lett **212**(2): 220-224.
- Chen, C. C., R. B. Boxer, et al. (2010). "Akt is required for Stat5 activation and mammary differentiation." Breast Cancer Res **12**(5): R72.
- Chen, C. C., D. B. Stairs, et al. (2012). "Autocrine prolactin induced by the Pten-Akt pathway is required for lactation initiation and provides a direct link between the Akt and Stat5 pathways." Genes Dev **26**(19): 2154-2168.
- Chilton, B. S. and A. Hewetson (2005). "Prolactin and growth hormone signaling." Curr Top Dev Biol **68**: 1-23.
- Chuang, E. and M. E. Molitch (2007). "Prolactin and autoimmune diseases in humans." Acta Biomed **78 Suppl 1**: 255-261.
- Dagil, R., M. J. Knudsen, et al. (2012). "The WSXWS motif in cytokine receptors is a molecular switch involved in receptor activation: insight from structures of the prolactin receptor." Structure **20**(2): 270-282.
- Dai, S. M., H. Matsuno, et al. (2004). "Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta production induced by direct contact with T lymphocytes: implications in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **50**(2): 432-443.
- Daigneault, M., J. A. Preston, et al. (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages." PLoS One **5**(1): e8668.
- de Kantor, I. N. and V. Ritacco (2006). "An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries." Vet Microbiol **112**(2-4): 111-118.
- Demaria, J. E., G. M. Nagy, et al. (2000). "Dopamine transporters participate in the physiological regulation of prolactin." Endocrinology **141**(1): 366-374.
- Dheda, K., S. K. Schwander, et al. (2010). "The immunology of tuberculosis: from bench to bedside." Respirology **15**(3): 433-450.
- DiMattia, G. E., B. Gellersen, et al. (1988). "A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin." Endocrinology **122**(6): 2508-2517.

- Elenkov, I. J., R. L. Wilder, et al. (2000). "The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system." Pharmacol Rev **52**(4): 595-638.
- Eley, D. S., W. W. Thatcher, et al. (1981). "Periparturient and postpartum endocrine changes of conceptus and maternal units in Jersey cows bred for milk yield." J Dairy Sci **64**(2): 312-320.
- Endsley, J. J., M. A. Endsley, et al. (2006). "Bovine natural killer cells acquire cytotoxic/effector activity following activation with IL-12/15 and reduce Mycobacterium bovis BCG in infected macrophages." J Leukoc Biol **79**(1): 71-79.
- Esmail, H., C. E. Barry, 3rd, et al. (2012). "Understanding latent tuberculosis: the key to improved diagnostic and novel treatment strategies." Drug Discov Today **17**(9-10): 514-521.
- Estrada, C. C., O. F. Diaz, et al. (2004). "Agreement between PCR and conventional methods for diagnosis of bovine tuberculosis." Vet. Méx. **35**(3): 225-236.
- Fang, F., A. J. Flegler, et al. (2009). "Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer." Am J Pathol **174**(1): 297-308.
- Fang, F., J. Zheng, et al. (2010). "Cyclophilin B as a co-regulator of prolactin-induced gene expression and function in breast cancer cells." J Mol Endocrinol **44**(6): 319-329.
- Felig Philip, F. L. A. (2001). "Endocrinology and Metabolism. ." McGraw-Hill 4th edn(6): 1562.
- Filipin Mdel, V., V. Brazao, et al. (2011). "Prolactin: does it exert an up-modulation of the immune response in Trypanosoma cruzi-infected rats?" Vet Parasitol **181**(2-4): 139-145.
- Fiorillo, A. A., T. R. Medler, et al. (2011). "HMGN2 inducibly binds a novel transactivation domain in nuclear PRLr to coordinate Stat5a-mediated transcription." Mol Endocrinol **25**(9): 1550-1564.
- Flierl, M. A., D. Rittirsch, et al. (2008). "Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box?" Mol Med **14**(3-4): 195-204.
- Flierl, M. A., D. Rittirsch, et al. (2007). "Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury." Nature **449**(7163): 721-725.
- Flierl, M. A., D. Rittirsch, et al. (2009). "Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response." PLoS One **4**(2): e4414.
- Flynn, J. L. and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, et al. (1992). "Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12013-12017.
- Freeman, M. E., B. Kanyicska, et al. (2000). "Prolactin: structure, function, and regulation of secretion." Physiol Rev **80**(4): 1523-1631.
- Garcia, M., M. E. Colombani-Vidal, et al. (2004). "Analysis of molecular heterogeneity of prolactin in human systemic lupus erythematosus." Lupus **13**(8): 575-583.
- Gellersen, B., G. E. DiMattia, et al. (1989). "Regulation of prolactin secretion in the human B-lymphoblastoid cell line IM-9-P3 by dexamethasone but not other regulators of pituitary prolactin secretion." Endocrinology **125**(6): 2853-2861.

- Gerlo, S., J. R. Davis, et al. (2006). "Prolactin in man: a tale of two promoters." Bioessays **28**(10): 1051-1055.
- Goffin, V., S. Bernichtein, et al. (2005). "Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists." Endocr Rev **26**(3): 400-422.
- Goffin, V., N. Binart, et al. (2002). "Prolactin: the new biology of an old hormone." Annu Rev Physiol **64**: 47-67.
- Gómez-Pérez, R. and L. U. Rosa Roa (2003). "PROLACTINA SÉRICA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO." Rev Venez Endocrinol Metab **1** ((2)): 22-26.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
- Gorocica, P. Jimenez-Martinez, et al. (2005). "Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis." REV INST NAL ENF RESP MEX **18**(2): 144-153.
- Grattan, D. R. and I. C. Kokay (2008). "Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone." J Neuroendocrinol **20**(6): 752-763.
- Grattan, D. R., F. J. Steyn, et al. (2008). "Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion." J Neuroendocrinol **20**(4): 497-507.
- Green, L. M., J. L. Reade, et al. (1984). "Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines." J Immunol Methods **70**(2): 257-268.
- Guevara GA, J. H., Zenteno CR (2003). "Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas tecnologías diagnósticas." MEDUNAB **6**(16): 46-51.
- Gupta, A., A. Kaul, et al. (2012). "Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation." Immunobiology **217**(3): 363-374.
- Guyot-Revol, V., J. A. Innes, et al. (2006). "Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **173**(7): 803-810.
- Hans, A. S. (2001). "VACAS SECAS Y EN TRANSICIÓN." Rev Inv Vet Perú **12**((2)): 36-48.
- Harding, C. V. and W. H. Boom (2010). "Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors." Nat Rev Microbiol **8**(4): 296-307.
- Hartmann, D. P., J. W. Holaday, et al. (1989). "Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin." FASEB J **3**(10): 2194-2202.
- Hawn, T. R., E. A. Misch, et al. (2007). "A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides." Eur J Immunol **37**(8): 2280-2289.
- Hayashi, D., T. Takii, et al. (2010). "Biochemical characteristics among Mycobacterium bovis BCG substrains." FEMS Microbiol Lett **306**(2): 103-109.
- Haynes, P. A. (1998). "Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation?" Glycobiology **8**(1): 1-5.
- Henao, M. I., C. Montes, et al. (2006). "Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **86**(1): 11-19.
- Hernandez-Pando, R., M. Jeyanathan, et al. (2000). "Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection." Lancet **356**(9248): 2133-2138.

- Herrera, M. T., M. Torres, et al. (2009). "Compartmentalized bronchoalveolar IFN-gamma and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **89**(1): 38-47.
- Herz, J., F. Zipp, et al. (2010). "Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation." Exp Neurol **225**(1): 9-17.
- Hope, J. C. and B. Villarreal-Ramos (2008). "Bovine TB and the development of new vaccines." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **31**(2-3): 77-100.
- Horseman, N. D. (2002). "Prolactin receptor diversity in humans: novel isoforms suggest general principles." Trends Endocrinol Metab **13**(2): 47-48.
- Hu, Z. Z., J. Meng, et al. (2001). "Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11." J Biol Chem **276**(44): 41086-41094.
- Hu, Z. Z., L. Zhuang, et al. (1999). "The human prolactin receptor gene structure and alternative promoter utilization: the generic promoter hPIII and a novel human promoter hP(N)." J Clin Endocrinol Metab **84**(3): 1153-1156.
- Hu, Z. Z., L. Zhuang, et al. (2002). "Complex 5' genomic structure of the human prolactin receptor: multiple alternative exons 1 and promoter utilization." Endocrinology **143**(6): 2139-2142.
- Hudson, C. A., G. P. Christophi, et al. (2008). "Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia." J Leukoc Biol **84**(3): 631-643.
- Hurme, M., J. Viherluoto, et al. (1992). "The effect of calcium mobilization on LPS-induced IL-1 beta production depends on the differentiation stage of the monocytes/macrophages." Scand J Immunol **36**(3): 507-511.
- Jacobi, A. M., W. Rohde, et al. (2001). "Enhanced serum prolactin (PRL) in patients with systemic lupus erythematosus: PRL levels are related to the disease activity." Lupus **10**(8): 554-561.
- Jara, L. J., G. Medina, et al. (2011). "Prolactin and autoimmunity." Clin Rev Allergy Immunol **40**(1): 50-59.
- Jo, E. K. (2008). "Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs." Curr Opin Infect Dis **21**(3): 279-286.
- Kaufmann, S. H. (2001). "How can immunology contribute to the control of tuberculosis?" Nat Rev Immunol **1**(1): 20-30.
- Kaufmann, S. H., S. T. Cole, et al. (2005). "Mycobacterium tuberculosis and the host response." J Exp Med **201**(11): 1693-1697.
- Kerschensteiner, M., E. Meinl, et al. (2009). "Neuro-immune crosstalk in CNS diseases." Neuroscience **158**(3): 1122-1132.
- Kline, J. B. and C. V. Clevenger (2001). "Identification and characterization of the prolactin-binding protein in human serum and milk." J Biol Chem **276**(27): 24760-24766.
- Kline, J. B., H. Roehrs, et al. (1999). "Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor." J Biol Chem **274**(50): 35461-35468.
- Kline, J. B., M. A. Ryczyn, et al. (2002). "Characterization of a novel and functional human prolactin receptor isoform (deltaS1PRLr) containing only one extracellular fibronectin-like domain." Mol Endocrinol **16**(10): 2310-2322.
- Klucar, P., P. F. Barnes, et al. (2008). "Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen." Hum Immunol **69**(8): 475-483.

- Kopchick, J. J. and J. M. Andry (2000). "Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction." Mol Genet Metab **71**(1-2): 293-314.
- Korbel, D. S., B. E. Schneider, et al. (2008). "Innate immunity in tuberculosis: myths and truth." Microbes Infect **10**(9): 995-1004.
- Kursar, M., M. Koch, et al. (2007). "Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **178**(5): 2661-2665.
- Lalvani, A., A. A. Pathan, et al. (2001). "Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells." Am J Respir Crit Care Med **163**(4): 824-828.
- Larrea, F., A. Martinez-Castillo, et al. (1997). "A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus." J Clin Endocrinol Metab **82**(11): 3664-3669.
- Ledesma-Soto, Y., F. Blanco-Favela, et al. (2012). "Increased levels of prolactin receptor expression correlate with the early onset of lupus symptoms and increased numbers of transitional-1 B cells after prolactin treatment." BMC Immunol **13**: 11.
- Legorreta-Haquet, M. V., K. Chavez-Rueda, et al. (2012). "Prolactin down-regulates CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-} regulatory T cell function in humans." J Mol Endocrinol **48**(1): 77-85.
- Lewis, U. J., R. N. Singh, et al. (1989). "Two forms of glycosylated human prolactin have different pigeon crop sac-stimulating activities." Endocrinology **124**(3): 1558-1563.
- Ley, S., A. Weigert, et al. (2010). "Neuromediators in inflammation--a macrophage/nerve connection." Immunobiology **215**(9-10): 674-684.
- Lkhider, M., T. Seddiki, et al. (2010). "[Prolactin and its cleaved 16 kDa fragment]." Med Sci (Paris) **26**(12): 1049-1055.
- Lorente, L., J. A. Aller, et al. (1996). "Psycho-neuro-immune-endocrine system: a three-phase-old response." J Intern Med **239**(1): 83.
- Ma, J., T. Chen, et al. (2003). "Regulation of macrophage activation." Cell Mol Life Sci **60**(11): 2334-2346.
- Macias Parra, M., J. Kumate Rodriguez, et al. (2011). "Mycobacterium tuberculosis Complex Genotype Diversity and Drug Resistance Profiles in a Pediatric Population in Mexico." Tuberc Res Treat **2011**: 239042.
- MacMicking, J. D., G. A. Taylor, et al. (2003). "Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47." Science **302**(5645): 654-659.
- Maher D, Floyd K, et al. (2002). "A strategic framework to decrease the burden of TB." World Health Organization.
- Malaguarnera, L., R. M. Imbesi, et al. (2004). "Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages." J Cell Biochem **93**(1): 197-206.
- Mandal, P., B. T. Pratt, et al. (2011). "Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin." J Biol Chem **286**(15): 13460-13469.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1998). "Self-defense: the fruit fly style." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 429-430.
- Meli, R., G. M. Raso, et al. (1997). "Prolactin modulation of nitric oxide and TNF-alpha production by peripheral neutrophils in rats." Life Sci **61**(14): 1395-1403.

- Mena, F., G. Hummelt, et al. (1992). "Changes in molecular variants during in vitro transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat." Endocrinology **130**(6): 3365-3377.
- Méndez, I., C. Cariño, et al. (2005). "La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos." Revista de investigacion clinica **57**: 447-456.
- Milian-Suazo, F., B. Harris, et al. (2008). "Molecular epidemiology of Mycobacterium bovis: usefulness in international trade." Prev Vet Med **87**(3-4): 261-271.
- Montgomery, D. W., C. F. Zukoski, et al. (1987). "Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity." Biochem Biophys Res Commun **145**(2): 692-698.
- Muthuswamy, S. K. (2012). "Autocrine prolactin: an emerging market for homegrown (prolactin) despite the imports." Genes Dev **26**(20): 2253-2258.
- Nagy, G., B. Kacsóh, et al. (1986). "Episodic prolactin and growth hormone secretion not related to the actual suckling activity in lactating rats." J Endocrinol **111**(1): 137-142.
- Negrao, J. A. (2008). "Hormone release and behavior during suckling and milking in Gir, Gir x Holstein, and Holstein cows." J Anim Sci **86**(13 Suppl): 21-26.
- Neill, S. D., D. G. Bryson, et al. (2001). "Pathogenesis of tuberculosis in cattle." Tuberculosis (Edinb) **81**(1-2): 79-86.
- Nevalainen, M. T., E. M. Valve, et al. (1997). "Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate." J Clin Invest **99**(4): 618-627.
- Neyrolles, O., R. Hernandez-Pando, et al. (2006). "Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence?" PLoS One **1**: e43.
- North, R. J. and Y. J. Jung (2004). "Immunity to tuberculosis." Annu Rev Immunol **22**: 599-623.
- Olavarria, V. H., M. P. Sepulcre, et al. (2010). "Prolactin-induced production of reactive oxygen species and IL-1beta in leukocytes from the bony fish gilthead seabream involves Jak/Stat and NF-kappaB signaling pathways." J Immunol **185**(7): 3873-3883.
- Ottenhoff, T. H., F. A. Verreck, et al. (2005). "Control of human host immunity to mycobacteria." Tuberculosis (Edinb) **85**(1-2): 53-64.
- Pan, H., B. S. Yan, et al. (2005). "Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis." Nature **434**(7034): 767-772.
- Paraiba, D. B., C. R. Soares, et al. (2010). "Lymphocytic prolactin does not contribute to systemic lupus erythematosus hyperprolactinemia." Clin Exp Rheumatol **28**(6): 866-872.
- Peeva, E., D. Michael, et al. (2003). "Prolactin modulates the naive B cell repertoire." J Clin Invest **111**(2): 275-283.
- Peirce, S. K. and W. Y. Chen (2004). "Human prolactin and its antagonist, hPRL-G129R, regulate bax and bcl-2 gene expression in human breast cancer cells and transgenic mice." Oncogene **23**(6): 1248-1255.
- Pellegrini, I., J. J. Lebrun, et al. (1992). "Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells." Mol Endocrinol **6**(7): 1023-1031.
- Perez-Guerrero, L., F. Milian-Suazo, et al. (2008). "[Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico]." Salud Publica Mex **50**(4): 286-291.

- Piazza, T. M., J. C. Lu, et al. (2009). "SRC family kinases accelerate prolactin receptor internalization, modulating trafficking and signaling in breast cancer cells." Mol Endocrinol **23**(2): 202-212.
- Plocinski, P., K. Dzitko, et al. (2007). "[Prolactin as a modulator of antiparasitic immunity]." Wiad Parazytol **53**(4): 263-270.
- Pollock, J. M. and S. D. Neill (2002). "Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle." Vet J **163**(2): 115-127.
- Pollock, J. M., M. D. Welsh, et al. (2005). "Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease." Vet Immunol Immunopathol **108**(1-2): 37-43.
- Portillo-Gomez, L. and E. G. Sosa-Iglesias (2011). "Molecular identification of Mycobacterium bovis and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients." Int J Tuberc Lung Dis **15**(10): 1409-1414.
- Raja, A. (2004). "Immunology of tuberculosis." Indian J Med Res **120**(4): 213-232.
- Ramana, C. V., M. Chatterjee-Kishore, et al. (2000). "Complex roles of Stat1 in regulating gene expression." Oncogene **19**(21): 2619-2627.
- Reem, G. H., D. W. Ray, et al. (1999). "The human prolactin gene upstream promoter is regulated in lymphoid cells by activators of T-cells and by cAMP." J Mol Endocrinol **22**(3): 285-292.
- Reiche, E. M., S. O. Nunes, et al. (2004). "Stress, depression, the immune system, and cancer." Lancet Oncol **5**(10): 617-625.
- Rodriguez, S., J. Bezos, et al. (2011). "Mycobacterium caprae infection in livestock and wildlife, Spain." Emerg Infect Dis **17**(3): 532-535.
- Romero, A., R. Manriquez, et al. (2012). "Prolactin-releasing peptide is a potent mediator of the innate immune response in leukocytes from Salmo salar." Vet Immunol Immunopathol **147**(3-4): 170-179.
- Russell, D. G., P. J. Cardona, et al. (2009). "Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma." Nat Immunol **10**(9): 943-948.
- Rycyzyn, M. A. and C. V. Clevenger (2002). "The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6790-6795.
- Rycyzyn, M. A., S. C. Reilly, et al. (2000). "Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation." Mol Endocrinol **14**(8): 1175-1186.
- SAGARPA (2010). "Plan estategico de la campaña contra tuberculosis bovina." Dirección General de Salud Animal: 1-51.
- Sarkar, C., B. Basu, et al. (2010). "The immunoregulatory role of dopamine: an update." Brain Behav Immun **24**(4): 525-528.
- Scotland, P. E., M. Patil, et al. (2011). "Endogenous prolactin generated during peripheral inflammation contributes to thermal hyperalgesia." Eur J Neurosci **34**(5): 745-754.
- Schuler, L. A., R. J. Nagel, et al. (1997). "Prolactin receptor heterogeneity in bovine fetal and maternal tissues." Endocrinology **138**(8): 3187-3194.
- Serrano-Moreno, B. A., T. A. Romero, et al. (2008). "High frequency of Mycobacterium bovis DNA in colostrum from tuberculous cattle detected by nested PCR." Zoonoses Public Health **55**(5): 258-266.
- Shelly, S., M. Boaz, et al. (2012). "Prolactin and autoimmunity." Autoimmun Rev **11**(6-7): A465-470.

- Shoupe, D., F. J. Montz, et al. (1983). "Prolactin molecular heterogeneity. Response to thyrotropin-releasing hormone stimulation of concanavalin A-bound and -unbound immunoassayable prolactin during human pregnancy." Am J Obstet Gynecol **147**(5): 482-487.
- Sinha, Y. N. (1995). "Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance." Endocr Rev **16**(3): 354-369.
- Small, P. M., P. C. Hopewell, et al. (1994). "The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods." N Engl J Med **330**(24): 1703-1709.
- Sodhi, A. and A. Tripathi (2008). "Prolactin induced production of cytokines in macrophages involves Ca⁺⁺ and p42/44 MAP kinase signaling pathway." Growth Factors **26**(4): 212-219.
- Spengler, R. N., S. W. Chensue, et al. (1994). "Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro." J Immunol **152**(6): 3024-3031.
- Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds." Glycobiology **12**(4): 43R-56R.
- Steinfeld, S., S. Rommes, et al. (2000). "Big prolactin 60 kDa is overexpressed in salivary glandular epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome." Lab Invest **80**(2): 239-247.
- Sun, J., R. D. Ramnath, et al. (2007). "Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils." Am J Physiol Cell Physiol **293**(2): C696-704.
- Tan, D. and A. M. Walker (2010). "Short form 1b human prolactin receptor down-regulates expression of the long form." J Mol Endocrinol **44**(3): 187-194.
- Tanaka, T., R. P. Shiu, et al. (1980). "A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum." J Clin Endocrinol Metab **51**(5): 1058-1063.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol **19**: 623-655.
- Tripathi, A. and A. Sodhi (2007). "Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with prolactin and growth hormone: involvement of protein tyrosine kinases, Ca⁽⁺⁺⁾, and MAP kinase signal transduction pathways." Mol Immunol **44**(12): 3185-3194.
- Tripathi, A. and A. Sodhi (2008). "Prolactin-induced production of cytokines in macrophages in vitro involves JAK/STAT and JNK MAPK pathways." Int Immunol **20**(3): 327-336.
- Trott, J. F., R. C. Hovey, et al. (2003). "Alternative splicing to exon 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein." J Mol Endocrinol **30**(1): 31-47.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, et al. (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer **26**(2): 171-176.
- van Genderen, H., S. J. Wielders, et al. (2006). "Rolling and adhesion of apoptotic monocytes is impaired by loss of functional cell surface-expressed P-selectin glycoprotein ligand-1." J Thromb Haemost **4**(7): 1611-1617.

- Vankayalapati, R., A. Garg, et al. (2005). "Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium." J Immunol **175**(7): 4611-4617.
- Vera-Lastra, O., C. Mendez, et al. (2003). "Correlation of prolactin serum concentrations with clinical activity and remission in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of conventional treatment." J Rheumatol **30**(10): 2140-2146.
- Vordermeier, H. M., M. A. Chambers, et al. (2002). "Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following Mycobacterium bovis BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis." Infect Immun **70**(6): 3026-3032.
- Walker, A. M. (1994). "Phosphorylated and nonphosphorylated Prolactin isoforms." Trends Endocrinol Metab **5**(5): 195-200.
- Wei, D. and W. Wei (2010). "Multiple human prolactin receptors and signaling." African Journal of Biotechnology **9** (7): 940-949.
- WHO (2004). "Tuberculosis " World Health Organization: 104.
- WHO (2011). "THE GLOBAL PLAN TO STOP TB 2011–2015." World health organization: 24-90.
- Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**(1): 75-85.
- Wu, H., R. Devi, et al. (1996). "Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system." Endocrinology **137**(1): 349-353.
- Yang, S., R. Tamai, et al. (2001). "Synergistic effect of muramyldipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture." Infect Immun **69**(4): 2045-2053.
- Yu, R., T. Satoh, et al. (2012). "Disseminated BCG infection in severe combined immunodeficiency." Acta Derm Venereol **92**(2): 158-159.