



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

.....
—————
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

**EL PAPEL DE LA PROLACTINA EN EL PROCESO
DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

M. EN C. ADRIANA KARINA CHAVEZ RUEDA

Tutores: Dr.Edgar Zenteno Galindo

Dr. Francisco Blanco Favela

MÉXICO D.F

NOVIEMBRE, 2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Autoinmunes de la Unidad de Investigación en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN Siglo “XXI”, IMSS, y en el Departamento de Investigación en Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SSA. Bajo la dirección del Dr. Francisco Blanco Favele y el Dr. Edgar Zenteno Galindo. Esta investigación fue financiada por CONACYT (FOFOI:34454-N). Durante el desarrollo de esta tesis la sustentante fue becaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP).

Agradezco a los H. Miembros del jurado por sus valiosos comentarios y críticas al presente trabajo.

Agradezco especialmente:

Al Dr. Francisco Blanco Favela por todos sus consejos, su apoyo durante mi formación académica y personal, sobre todo por ser mi mejor amigo.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo por haberme apoyado en la realización de este trabajo, por brindarme su amistad y su confianza.

A mis padres por su apoyo incondicional, paciencia, amor y confianza sin lo cual no hubiera logrado llegar a esta meta.

A mis hermanos, sobrinos y cuñados por su comprensión, cariño y apoyo incondicional.

A Angel por el amor que me brinda, por estar junto a mí en el momento más difícil de mi vida.

A todos mis amigos por su amistad desinteresada.

A todo el personal de la UIM en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN Siglo "XXI" y del Departamento de Bioquímica del INER Ssa, por el apoyo recibido para la realización del presente trabajo.

Dedico esta tesis a mi hermano JOSE MANUEL, por todo el apoyo y cariño que me brindo, siempre te tengo en mi mente y corazón, te extraño.

CONTENIDO.

Resumen	1
Abstract	2
Introducción.	3
Justificación.	14
Planteamiento del problema.	14
Hipótesis.	15
Objetivos.	16
Material y Métodos.	17
Resultados.	
Estandarización.	24
Resultados.	27
Discusión.	41
Conclusiones.	47
Anexos.	
Anexo 1. Hoja de consentimiento.	48
Anexo 2. Hoja de recolección de datos.	49
Glosario	51
Bibliografía.	52

RESUMEN.

Las células del sistema inmune son capaces de producir y secretar prolactina así como de expresar su receptor. Se ha demostrado que la PRL es necesaria para, la maduración de células LAK, la expresión de receptor de IL2 en ratas ovariectomizadas, y para la proliferación de linfocitos T. Las interleucinas 1 y 6 son capaces de modular la secreción de esta hormona a nivel de hipófisis, sugiriendo fuertemente que la prolactina participa en la modulación de la respuesta inmune. Sin embargo, no se tienen suficiente información sobre el mecanismo de acción de la prolactina en el **proceso de activación de los linfocitos T y B**. Por lo que nuestro objetivo fue investigar la contribución de la prolactina en el proceso de activación de linfocitos T y B, a través de la expresión de moléculas coestimuladoras, producción de interleucinas y anticuerpos. Se utilizaron células mononucleadas, linfocitos T CD4⁺ y B provenientes de personas sanas y pacientes con hiperprolactinemia, los cuales se estimularon con mitógeno en presencia o ausencia de PRL y mitógeno más anticuerpo anti-PRL para bloquear la PRL autócrina. También se determinó por citometría de flujo la expresión de CD69, CD154, CD86, CD40 y producción de IL2 e IFN γ . Los resultados muestran que la prolactina autócrina participa en las dos primeras horas de la activación. Además encontramos la prolactina producida por los linfocitos T contribuye en el proceso de activación de estas células ya que la expresión de CD154, CD69 así como producción de IL2 e IFN γ disminuyó al bloquear la prolactina autócrina con anticuerpo anti-PRL. Así mismo, la PRL no participa en el proceso de activación de los linfocitos B, ya que al bloquearla con el anticuerpo la expresión de CD86 y CD40 no se afectó.

ABSTRACT

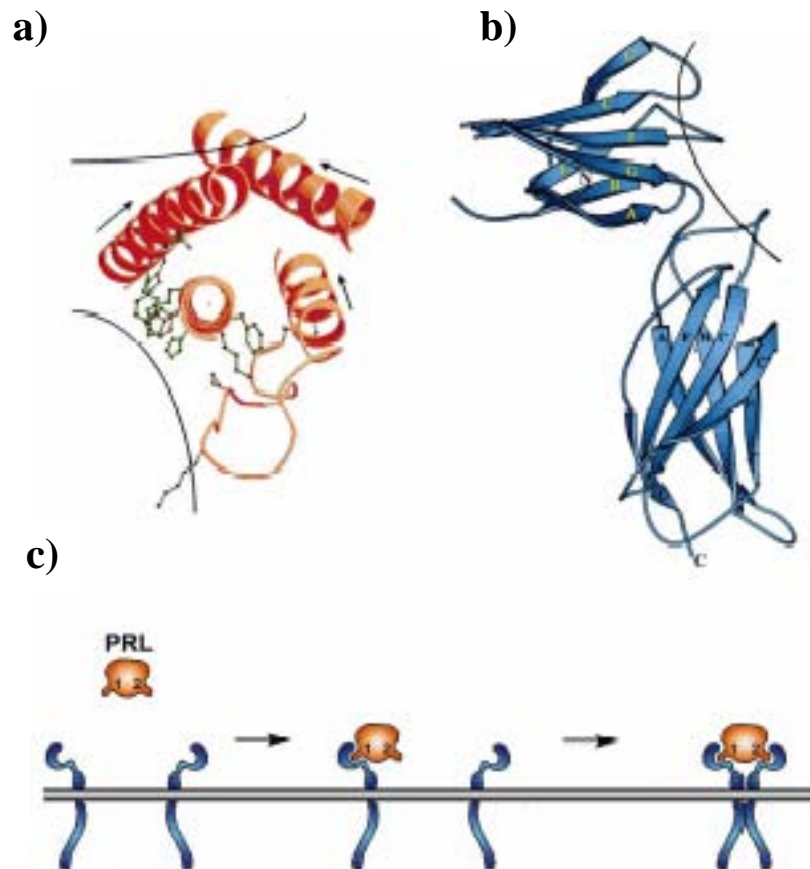
The evidences about the participation of prolactin in the immune response are indirect such as the additive effect in the proliferation, an effective immune response in animal model. Therefore. There is not information related to the trigger signal for lymphocytes activation. The aim of this research was to explore PRL function in the process of CD4⁺ and B cell activation measured through co stimulatory molecules expression and interleukins secretion. Human peripheral blood mononuclear cells, purified CD4⁺ or B cell from healthy human and idiopathic hyperprolactinemic patients were cultured emulating different conditions: Cells with different concentration of human PRL only; cells with unspecific mitogen plus PRL; cells stimulate with unspecific mitogen, were used as a positive testigo, cells without stimulus in synthetic medium without bovine fetal serum were used as a negative testigo. The CD69, CD154 expression and IL2, IFN γ secretion by lymphocyte CD4⁺, and CD40, CD86 expression and antibodies production by B cells were measure en each of the above-mentioned conditions. The results revealed that the PRL is produced by lymphocytes until it is activated. After that, PRL has predominant autocrine ability. The expression of CD69, CD154 molecules and interleukins secretions depend partly on the autocrine PRL. This is based on the secretion of IL2, IFN γ and co stimulatory molecule expression both of which were strikingly reduced when the PRL was blocked with anti-PRL antibody. Moreover, the PRL activity is during the first two hours after the activation. In contrast, the PRL appears not to play any role on B cells activation. because CD40 and CD86 expression do not show any alteration with the addition or blocking of PRL.

INTRODUCCIÓN.

La prolactina (PRL) es una hormona lactogénica sintetizada y secretada por células de la hipófisis anterior (mamotrofos), su liberación a este nivel es estimulada por serotonina, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo y es inhibida por dopamina y opiáceos. Se han descrito alrededor de 300 diferentes funciones biológicas, las cuales pueden agruparse en cinco categorías 1) reproducción, 2) osmoregulación, 3) desarrollo y crecimiento 4) inmunoregulación y 5) metabolismo de carbohidratos y lípidos [Bole-Feysot y col., 1998]. En base a sus características genéticas, estructurales y funcionales la prolactina pertenece a la misma familia de la hormona de crecimiento y del lactógeno placentario; las cuales provienen de un mismo gen ancestral. El gen que codifica para prolactina se localiza en el cromosoma 6 y está compuesto por cinco exones y cuatro intrones con un tamaño aproximado de 10 Kb [Truong y col., 1984; Bole-Feysot y col., 1998]. La expresión de este gen se ha confirmado en células epiteliales mamarias, en células del sistema inmune (linfocitos T y B), cerebro, miometrio, endometrio, timo, bazo, médula ósea, fibroblastos, en algunas líneas de células tumorales y glándulas sudoríparas [Maslar y Riddick, 1979; McMurray y col., 1979; Rosen y col., 1980; Montgomery y col., 1987; DiMattia y col., 1988; Bole-Feysot y col., 1998; Montgomery, 2001], sugiriendo claramente que la síntesis y secreción de esta hormona no se restringe a la hipófisis [Freeman y col., 2000; Matera, 1996].

La prolactina, es una proteína globular de una sola cadena con 199 aminoácidos (aa) y tres puentes disulfuro intramoleculares (Cys⁴-Cys¹¹, Cys⁵⁸-Cys¹⁷⁴ y Cys¹⁹¹-Cys¹⁹⁹), el 50 % de los aminoácidos en la cadena conforman una estructura secundaria de α -hélice. Aunque la principal forma de prolactina reportada en hipófisis y suero tiene un peso molecular de 23 kDa se han descrito otras formas como la glicosiladas (25 kDa) que presenta menor actividad biológica [Nicoll y col., 1986; Matera 1997; Bole-Feysot y col., 1998], la macroprolactina que puede estar constituida por dímeros y/o polímeros de la misma hormona o por la unión con otras proteínas como los anticuerpos (150 kDa) [Leaños y col.,

1998] y una pequeña de 16 kDa implicada en el proceso de angiogénesis [Freeman y col., 2000].



1. **Figura 1. Estructura de la prolactina y su receptor.** a) Estructura terciaria de la prolactina, presenta cuatro alfa hélices y dos sitios de unión, b) Estructura terciaria del receptor de prolactina, presenta un sitio de unión y estructura de beta plegada en antiparalelo c) Dimerización del receptor de prolactina. Bole-Feysto *Endocrinol. Rev.* 1998. 19:225-268.

El receptor de prolactina (PRL-R) es una proteína transmembranal, su gen se encuentra en el cromosoma 5 y codifica para tres diferentes isoformas, las cuales difieren en longitud y

composición de la porción intracitoplásmica, denominándolas como receptor: corto (42 kDa), mediano (65 kDa) y largo (85-90 kDa). Las tres isoformas exhiben un dominio extracelular idéntico, con aproximadamente 200 aa que posee analogía con la fibronectina tipo III. Este dominio se divide en dos subdominios (cada uno de ~100 aa) con características conservadas a los receptores de citocinas. El primer subdominio presenta dos puentes disulfuro (Cys¹²- Cys²², Cys⁵¹- Cys⁶²) y el segundo un motivo penta péptido denominado WS (Trp-X-Trp-Ser). El dominio transmembranal posee 24 aa, mientras el intracelular presenta diferente tamaño y composición dependiendo de la isoforma del receptor, en esta porción, existen dos regiones conservadas denominadas caja 1 y caja 2. La región próxima a la membrana se denomina caja 1, presenta una zona rica en prolina (Ile-Phe-Pro-Pro-Val-Pro-X-Pro) y es importante en la interacción con JAK2. La región denominada caja 2 es menos conservada y se pierde en la isoforma corta. La estructura terciaria del receptor determinada por cristalografía muestra que los dominios extracelulares contienen siete cadenas β plegadas en antiparalelo [Bole-Feysot y col., 1998; Freeman y col., 2000; Yu-Lee 2002].

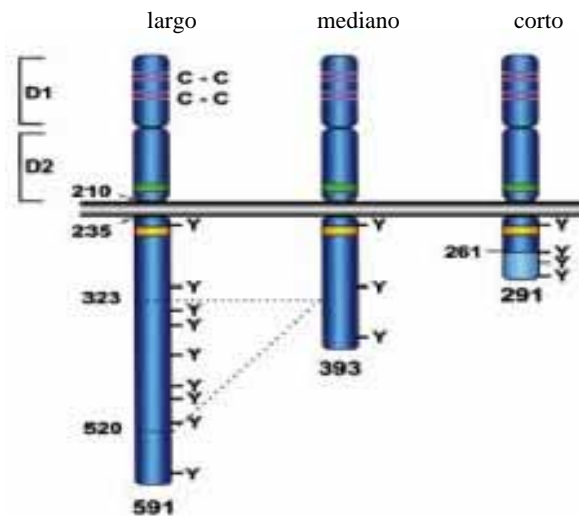


Figura 2. Representación esquemática de las tres isoformas del receptor de prolactina. El dominio extracelular idéntico dividido en dos sub-dominios, la porción intracitoplasmática difiere en tamaño y composición. Bole-Feysto *Endocrinol. Rev.* 1998. 19:225-268.

La interacción PRL –PRL-R activa principalmente la vía de señalización Jak-Stat, la cual es usada por diferentes receptores de citocinas. Jak es una familia de proteína tirosina cinasas que incluye Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2, los receptores de citocinas I y II trabajan en combinación con Jak cinasas transmitiendo señales celulares. La región intracelular próxima a la membrana del PRL-R en su forma inactiva (monómero) se encuentra constitutivamente asociada a Jak2, la unión de la PRL a su receptor induce la homodimerización del mismo activando a Jak2, posteriormente Jak2 fosforila a Stat (Stat1, Stat3 y Stat5) que presenta cinco diferentes dominios: a) el de unión al DNA, b) el parecido a SH2, c) el similar a SH3, d) amino terminal y e) carboxilo terminal. Las tirosinas fosforiladas de Jak2 se unen con el dominio SH2 de Stat el cual es fosforilado por la asociación PRL-R - Jak2. Al encontrarse fosforilado, Stat se disocia del receptor formando un homo o heterodímero que es translocado al núcleo activando el dominio de unión a DNA; la secuencia que reconoce el homo o heterodímero de Stat (Stat1/Stat1, Stat3/Stat3, Stat5/Stat5 o Stat1/Stat3) en el núcleo es GAS (secuencia que activa interferón γ), que consiste en una secuencia palindrómica (TTCXXXGAA) presente en diferentes promotores [Too, 1997; Clevenger y col., 1998; Bole-Feysot y col., 1998; Freeman y col., 2000; Sporri B y col., 2001; Yu-Lee, 2002; Pauku y Silvennoinen 2004.].

Se ha demostrado que la expresión del receptor se encuentra distribuido en células del sistema reproductivo, cerebro, retina, cartílago, piel, pulmón, corazón, páncreas, hígado, bazo, timo, riñón, linfocitos (T,B), macrófagos etc. [Dardenne y col., 1994; Bole-Feysot y col., 1998; Clevenger y col., 1998]. El receptor de PRL junto con el de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-15, GM-CSF, G-CSF, hormona del crecimiento, pertenecen a la superfamilia de receptores de citocinas hematopoyéticas [Matera, 1997; Yu-Lee, 1997; Yu-Lee, 2002, Janeway y col 2005].

PRL-R largo

PRL-R corto

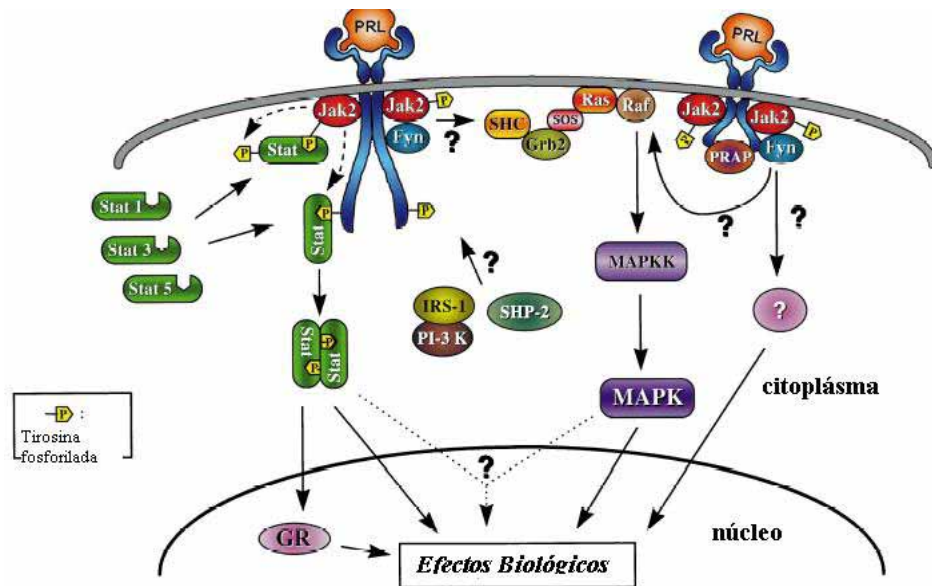


Figura 3. Representación esquemática del camino de señalización del receptor de prolactina de rata (largo y corto). Bole-Feysto *Endocrinol. Rev.* 1998. 19:225-268.

La relación entre prolactina y el sistema inmune fue evidente en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia [Smith, 1930]. Tiempo después Nagy y Berci, publicaron su trabajo clásico acerca de la inmunodeficiencia en ratas hipofisectomizadas, la administración de prolactina, hormona de crecimiento y lactógeno placentario reestableció la actividad inmunológica [Nagy y Berci, 1978]. En 1983 se repitieron estos experimentos, utilizaron bromocriptina (agonista dopaminérgico) para inhibir selectivamente la secreción de prolactina los resultados fueron similares al trabajo anterior, disminución en las respuesta inmune tanto celular como humoral, recuperándose al suspender la bromocriptina [Nagy y col., 1983].

El sistema inmune es capaz de regular la secreción de prolactina [Matera, 1997]. Las citocinas IL-1, IL-6, TNF- α pueden actuar como reguladores parácrinos o endocrinos en la liberación de PRL hipofisiaria [Spangelo y Leod, 1990; Theas y col., 1998]. Los timocitos y células mononucleadas sintetizan prolactina de 23 kDa [Matera, 1997, Horiguchi, 2004] o 60 kDa [Larrea y col., 1997] estas proteínas tienen actividad biológica medida por bioensayo con células Nb2 (linfocitos T de rata dependientes de prolactina). Los linfocitos

T y B expresan 360 receptores de PRL/cél, las células NK 660 receptores/cél [Matera, 1997]. Otros resultados que apoyan la participación de la prolactina en la respuesta inmune es la inducción de la transcripción del factor regulador de interferón 1 (IRF-1), el cual se encuentra relacionado con la diferenciación de linfocito B y resistencia a virus [Yu-Lee, 1997; Yu-Lee 2002], el incremento en la secreción de anticuerpos IgG e IgM en hibridomas estimulados con prolactina [Bole-Feysot y col., 1998], el incremento en la proliferación celular de esplenocitos, timocitos y células mononucleadas al incubarse con prolactina más ConA [Yu-Lee 1997; Matera 1997], así como el incremento en la producción de superóxido en macrófagos estimulados [Bole-Feysot y col., 1998]. Estudios experimentales realizados en modelos animales muestran que la PRL induce la expresión del receptor de IL-2 en linfocitos de ratas ovariectomizadas [Mukherjee y col., 1990], incrementa la síntesis de DNA de células NK así como su efecto citotóxico [Matera 1996; Matera 1997; Bole-Feysot y col., 1998]. Los anticuerpos anti-PRL son capaces de inhibir la proliferación de células mononucleadas estimuladas con ConA [Hartmann y col., 1989]. En timocitos tratados con dexametasona se ha demostrado la propiedad anti-apoptótica de la prolactina [Krishnan, 2003]. La prolactina se ha asociado con enfermedades autoinmunes, en el estudio realizado por Buskila (1995) el 75.7% de mujeres con hiperprolactinemia (HPRL) presentaron uno o más autoanticuerpos dirigidos contra componentes nucleares y/o citoplásmicos (anti-ss-DNA, anti-dsDNA, anti-Sm o anti-SS-A/Ro) característicos de enfermedades reumáticas autoinmunes, mientras las mujeres con normoprolactinemia no presentaron ningún autoanticuerpo. En pacientes con lupus también se han descrito concentraciones séricas más altas de prolactina que en personas sanas sin enfermedad autoinmune [McMurray y col., 1991; Buskila y col. 1995; Neidhart 1998], la frecuencia de hiperprolactinemia reportada en pacientes con lupus, oscila entre 15.3 y 31 % [Blanco-Favela y col., 1999]. En un estudio realizado en nuestro laboratorio el 15.8% de 259 pacientes con lupus presentaron hiperprolactinemia correlacionando con la actividad de la enfermedad, el 31.7% de los pacientes con lupus e hiperprolactinemia tuvieron anticuerpos anti-prolactina. Los pacientes con anticuerpos anti-PRL presentaron menor actividad de la enfermedad medida por SLEDAI comparado con los que no presentaron estos autoanticuerpos, sugiriendo que la actividad biológica de la prolactina es atenuada por los anticuerpos [Leaños y col., 1998].

El evento central en la generación de la respuesta inmune, es la activación y expansión clonal de las células T. La activación *in vivo* de los linfocitos inicia por la interacción célula-célula que se da entre el complejo TCR-CD3 con el péptido del antígeno procesado y presentado en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) [Bluestone y col., 1998; Janeway 2005]. Esta interacción es la primera señal necesaria pero insuficiente en el proceso de activación, lo que inicia una cascada de distintos eventos como la expresión, principalmente en linfocitos T CD4, de la molécula coestimuladora CD154, esta molécula se une a su ligando CD40 presente en las CPA, lo que activa a las CPA e incrementa la expresión de CD80/CD86 ambas moléculas coestimuladoras se unen a su ligando CD28 expresado en los linfocitos T. La interacción entre las moléculas coestimuladoras es la segunda señal en el proceso de activación que previene un estado de anergia en los linfocitos y genera señales intracelulares que inducen la expresión de genes para interleucinas (IL-2, IL-12, IL-5, IL-6, TNF α etc) y quimiocinas (RANTES), así como la estabilización de los mRNA de las citocinas [Moreno, 1996; Denfeld y col., 1997; Skov y col., 2000; Janeway 2005].

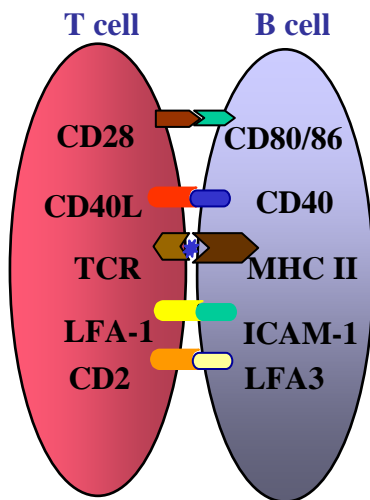


Figura 4. Representación esquemática de interacción entre linfocito T y linfocito B.

La unión del TCR con su ligando induce la fosforilación de los ITAM en la cadena ζ del CD3. La proteína citoplásmica ZAP-70 se fosforila y activa al unirse a los sitios ITAM fosforilados, la proteína ZAP-70 puede fosforilar varias proteínas entre ellas la fosfolipasa $C\gamma 1$ (PLCL $\gamma 1$) que al activarse hidroliza el fosfatidil inositol bi-fosfato (PIP $_2$) generando

inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicero (DAG). El IP₃ induce un rápido incremento de Ca²⁺ libre en el citosol. El DAG activa la enzima proteína cinasa C (PKC). El Ca²⁺ y la PKC incrementan la proliferación y secreción de citocinas en los linfocitos T. La activación *in vitro* de los linfocitos se puede realizar con mitógenos (concanavalina A, fitohemaglutinina, lipopolisacárido, PMA etc.) que emulan la cascada de activación de los linfocitos, lo que termina en síntesis de DNA y división celular pero de forma inespecífica. La combinación de PMA y ionomicina imitan la vía del la PLCγ1 debido a que el PMA activa a PKC mientras la ionomicina incrementa los niveles de Ca²⁺ citoplásmicos [Abbas, 2000; Janeway, 2005], la lectina concanavalina A (proteína que une carbohidratos) interacciona con el complejo CD3, asociado al TCR, transmitiendo señales que inducen la activación de los linfocitos T [Licastro y col., 1993].

Una de las primeras características que aparecen en las células activadas es el cambio en el patrón de expresión de algunas moléculas de superficie. La subunidad α del receptor de IL-2 (CD25), el receptor de transferrina (CD71), CD154 y CD69 son algunos ejemplos. A estas moléculas se les han denominado marcadores de activación celular. CD69 es un homodímero de 28 kDa, su gen se encuentra localizado en el cromosoma 12 y es una proteína de membrana tipo II con un dominio C-tipo lectina, aparece a las pocas horas de activación de los linfocitos T, B, macrófagos, células NK,. Promueve el flujo de Ca²⁺, así como la inducción de proto-oncogenes como c-myc y c-fos. La rápida expresión de CD69 en linfocitos T ha sugerido que esta molécula podría incrementar la activación y/o la diferenciación como ocurre con otras moléculas (CD40L, CD25). [Testi y col., 1994, Sancho y col., 2005]. Esta molécula se encuentra aumentada en las células provenientes de pacientes con lupus y correlaciona con la actividad de la enfermedad [Su y col. 1997; Ishikawa y col., 1998].

CD40, es una proteína integral de membrana tipo I de 48 kDa, presenta cuatro dominios ricos en cisteína (con 45 aa cada uno), pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral-α (TNFα), se expresa en linfocitos B inmaduros y maduros, células dendríticas, endoteliales y macrófagos activados. Su región intracitoplásmica se encuentra asociada a moléculas de la familia de segundos mensajeros TRAF (Factores Asociados al

Receptor del TNF), específicamente a TRAF-2 y TRAF-3, que modulan la actividad de tirosina cinasa y tirosina fosfatasa en el ciclo celular y el aumento de los factores bcl-2 y bcl-x_L que protegen al linfocito B de entrar en apoptosis. La unión a su ligando en presencia de citocinas induce expansión clonal. El ligando de CD40 es la molécula CD154 (CD40L) que es un homotrímero de 39 kDa, pertenece a la familia de TNF. Se expresa en linfocitos T CD4⁺ activos, algunos CD8⁺ activos, células NK y basófilos, es inducible y su expresión máxima se presenta entre las 4 o 6 horas después de la activación disminuyendo con el tiempo. Es importante en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas en los linfocitos B, mientras que en los linfocitos T genera una señal coestimuladora que aumenta la regulación de IL4 y moléculas de adhesión (ICAM). [Abbas y col., 2000; Fernández-Gutierrez y col., 1998, Quezada, 2004]. En ratones NZB/W F1 (ratones con una enfermedad parecida a lupus) tratados con anticuerpos anti-CD154 se observa una disminución en: a) producción de anticuerpos anti-DNA, b) problemas renales y su tiempo de supervivencia es mayor en comparación con los ratones sin tratamiento [Early col., 1996]. La interacción CD40-CD154 es importante en la respuesta inmune, incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, moléculas de adhesión en células endoteliales, producción de citocinas y quimiocinas, activa las células presentadoras de antígeno (como linfocito B) y es importante en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. [Ding y col., 1995; Bluestone y col., 1998; Wesemann y col. 2002, Quezada, 2004]

CD86 es una glicoproteína homodimérica que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, presenta dos dominios extracelulares, uno transmembranal y una cola citoplásmica que contiene tres sitios potenciales para fosforilar PKC. Al igual que CD80 se expresa constitutivamente en células dendríticas; en macrófagos y linfocitos B su expresión es inducible. La densidad de moléculas CD86 en las CPA es mayor que la de CD80, su expresión se observa a las 18 h mientras que la de CD80 es a las 48 h; es el ligando principal de CD28 y presenta una menor afinidad por CTLA-4 en comparación con CD80. La interacción CD86-CD28 produce un aumento en la secreción de inmunoglobulinas del linfocito B así como en la producción de citocina, induciendo una respuesta de tipo Th2. CD86 se ha involucrado en enfermedades autoinmunes, el tratamiento con anticuerpos anti-CD86 disminuye la actividad de la enfermedad. [Damle y col., 1991; Lenschow y col.,

1996; Thompson 1995; Perrin y col., 1997; Bluestone y col., 1998; Abe 1999; Greenwald, 2005, Keir, 2005].

Durante el proceso de activación los linfocitos T secretan citocinas que modulan la intensidad y duración de la respuesta inmune, amplificando o inhibiendo: proliferación, activación, diferenciación celular y/o secreción de anticuerpos u otras citocinas. Algunas de estas citocinas actúan de forma autócrina, regulando la respuesta de la propia célula productora y de una forma parácrina en células que se encuentran cerca de ella.

La interleucina 2 (IL-2) es sintetizada y secretada por los linfocitos CD4⁺ y en menor cantidad por los CD8⁺ activados. Es una proteína glicosilada globular y estructura de α -hélice. El reconocimiento del antígeno por el receptor del linfocito T induce la transcripción de diferentes factores, uno de estos es el NF-AT (factor nuclear de activación en células T), que se une a la región promotora del gen de IL2, comenzando el proceso de transcripción. Es necesaria la señal coestimuladora CD28/CD86, que incrementa la transcripción del mRNA aproximadamente 3 veces y permite la estabilización del mismo (el mRNA de las citocinas es muy inestable), incrementa la síntesis de IL-2 de 20 a 30 veces, estos dos efectos incrementan la producción de IL-2 100 veces [Abbas y col, 2000; Janeway y col., 2005]. La producción de IL-2 es transitoria, con una secreción máxima alrededor de 8-12 horas después de la activación. La secreción de IL-2 y la unión a su receptor de alta afinidad (IL2-R), que pertenece a la familia de receptores hematopoyéticos y consta de tres proteínas (alfa, beta, gamma) asociadas de forma no covalente, fosforila a Jak1 y Jak3. Jak1 se encuentra asociada a la cadena beta y Jak3 a la cadena gamma, la activación de Jak1 y Jak3 da como resultado la fosforilación de Satat5a, Stat5b y Stat3 que forman homo o heterodímeros los cuales se translocan al núcleo donde se unen a secuencias promotoras e inducen la transcripción de genes, la activación, proliferación y diferenciación de células T, incrementan y mantienen la expresión de la molécula coestimuladora CD154; además, estimulan el crecimiento de células NK aumentando su función citolítica produciendo las células LAK (Zhu y col. 1999; Abbas y col. 2000; Skov y col. 2000, Sporri, 2001].

Interferón γ (IFN- γ) ó interferón tipo II, es una glicoproteína con dos subunidades (21 y 24 kDa), es producida por linfocitos CD4⁺, CD8⁺ activados y células NK. Tiene cierta actividad anti-vírica y actúa como una citosina efectora de la respuesta inmune. El reconocimiento del antígeno por el TCR inicia el proceso de transcripción del IFN- γ el cual es aumentado por IL-2 e IL-12. El receptor de IFN- γ pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas tipo II. La interacción receptor - IFN- γ induce la fosforilación de Stat1, Stat2 y Stat5. El IFN- γ activa a macrófagos incrementando su actividad microbicida, incrementa la expresión de moléculas del MHC clase I y clase II, regula la expresión de la molécula coestimuladora CD40, promueve la diferenciación de los linfocitos T_{H0} a T_{H1} e inhibe T_{H2}, activa a los neutrófilos regulando el estallido respiratorio y estimula la actividad citolítica de células NK [Abbas y col., 2000; Wesemann y col., 2002; Paukku, 2004].

En base a lo anterior nuestro objetivo fue investigar el papel de la prolactina en el proceso de activación de las células del sistema inmune a través de la expresión de moléculas como marcadores de activación (CD69) y coestimuladoras (CD154, CD40, CD80). Además de la secreción de interleucinas (IL-2 e IFN γ).

JUSTIFICACIÓN.

La activación de linfocitos depende de una serie de señales intracelulares. La primera es aquella establecida por el complejo TCR/CD3 en linfocitos T al reconocer a péptidos del antígeno procesado y presentado en el contexto de moléculas del MHC clase II expresado en CPA. La segunda señal es la interacción entre moléculas coestimuladoras, las cuales participan induciendo la transcripción de genes. La ausencia de cualquiera de estas señales ocasiona un estado de anergia. Actualmente se cuenta con información en la cual se atribuye a la prolactina una función de inmunoregulación. Sin embargo, no se tienen suficientes datos para establecer el mecanismo de acción de esta hormona en el proceso de **activación** de los linfocitos T y B. Por lo que nos pareció importante investigar si la prolactina participa en la expresión de algunas moléculas coestimuladoras y en la producción de interleucinas que intervienen en el proceso de activación de los linfocitos T y B.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que la prolactina participa en la modulación de la respuesta inmune. Las células de este sistema expresan receptores para la prolactina, incluso son capaces de producirla. Es bien conocido que la PRL es necesaria para la maduración de células LAK, la expresión de receptor de IL-2 en ratas ovariectomizadas y que las interleucinas 1 y 6 son capaces de modular la secreción de esta hormona a nivel de hipófisis. Sin embargo, no hay reportes que mencionen cual es el mecanismo de acción de la prolactina en el proceso de activación de los linfocitos T y B. La activación de los linfocitos (puede ser medida a través de la expresión de CD69), requiere del contacto celular entre el antígeno expresado en el contexto de MHC en las CPA y el complejo TCR-CD3 en los linfocitos T, que induce la expresión de CD154 principalmente en los linfocitos T CD4⁺, su ligando CD40 se encuentra expresado en la CPA. Esta interacción activa a las CPA y regula la expresión de CD80 y CD86 su ligando CD28 se encuentra expresado en linfocitos T (CD86 tiene mayor afinidad

por CD28 y se expresa más rápido que CD80). Las interacciones entre las moléculas coestimuladoras son importantes para activar los linfocitos y evitar un estado de anergia. Así, el propósito del presente trabajo es determinar el papel de esta hormona en la expresión de moléculas de activación y coestimuladoras así como en la producción de interleucinas por linfocitos provenientes de personas sanas.

HIPÓTESIS.

1. La prolactina participa en el proceso de activación celular incrementando:
 - a. la expresión de las moléculas: CD69, CD154, CD40 y CD86.
 - b. la producción de IFN γ e IL-2 en linfocitos T CD4.
2. La prolactina participa en la producción de anticuerpos.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la contribución de la prolactina en el proceso de activación de linfocitos T y B, a través de la expresión de moléculas coestimuladoras, producción de interleucinas y anticuerpos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Identificar la expresión de las moléculas de superficie CD86, CD40, CD154, CD69 en cultivos de linfocitos (con y sin PRL).
2. Identificar la producción de interleucinas IL2, e IFN γ por linfocitos T en cultivos (con y sin PRL).
3. Determinar si la prolactina tiene la capacidad o no de inducir la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Sujetos:

Se incluyeron 10 personas sanas de sexo femenino con un promedio de edad de 34 ± 10 años, eumenorreicas, sin galactorrea y con niveles séricos de prolactina dentro de los límites normales (menos de 20 ng/ml). Además cinco pacientes con hiperprolactinemia de sexo femenino con edad de 35 ± 7 años sin adenomas hipofisarios ni manifestaciones clínicas de autoinmunidad utilizando los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Tamaño de muestra:

Para la determinación del tamaño de muestra utilizamos una diferencia de 17,000 de MESF (número de moléculas de equivalentes del fluorocromo) determinada por citometría de flujo [Matera y col. 2000a], un valor de poder de prueba de 90% y un valor de $1-\alpha$ de 0.95, con lo cual el tamaño de muestra es de 5 paciente. No contando con mayor información se decidió realizar una prueba piloto con un tamaño de muestra de 10 personas sanas y 5 pacientes.

Criterios de inclusión:

a) Personas sanas :

Edad entre 18 y 45 años

Niveles séricos normales de prolactina entre 1 ng/ml y 20 ng/ml

Sin galactorrea

Eumenorreicas

Que acepten participar en el estudio donando sangre

b) Pacientes con hiperprolactinemia:

Diagnóstico clínico de hiperprolactinemia

Edad entre 18 y 45 años

Niveles séricos de prolactina mayores de 20 ng/ml y menores de 100 ng/ml

Sin adenomas hipofisarios

Sin enfermedad autoinmune

Que acepten participar en el estudio donando sangre.

Criterios de exclusión.

Todas aquellas personas que estén tomando medicamentos como bromocriptina o inmunosupresores.

Hormona:

Se utilizó prolactina hipofisiaria humana (NIDDK-hPRL-SIAFP-B3), donada por el National Hormone & Pituitary Program (USA).

Determinación de PRL en suero.

Se utilizó la técnica de IRMA utilizando un kit comercial (RIA-gnost Prolactin [CIS bio international, Francia]), con especificidad alta y capaz de detectar 0.1 ng/ml de prolactina. En tubos sensibilizados con anticuerpo monoclonal anti-PRL se agregó 50 µl de suero o estándar de prolactina, posteriormente se incubaron 30 min a temperatura ambiente con agitación. Los tubos se lavaron con 2 ml de regulador de lavado. Se colocaron 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-PRL marcado con ¹²⁵I, se incubaron 30 min a temperatura ambiente en agitación y lavaron con regulador de lavado. Las muestras se leyeron en un contador gamma, la concentración de prolactina se reportó en ng/ml.

Separación de células:

La sangre proveniente de personas y pacientes se diluyó en PBS (regulador de fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.4) en una relación de 1:3, se adicionó 4 ml de Lymphoprep (Nycomed, Norway) por cada 7 ml de sangre diluida, se centrifugó a 2000 rpm por 30 min. Las células mononucleadas (CMN) se colectaron de la interfase, se lavaron dos veces con PBS y una con medio AIMV [Gibco BRL, USA] (2mM L-glutamina 50 IU/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina [Gibco BRL, USA]). La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripan (Bio Whittaker, USA), utilizando las células con viabilidad mayor del 90%.

Ensayos de proliferación:

Los ensayos de proliferación se realizaron por triplicado en placas de microcultivo de 96 pozos (Nunc, Denmark). A cada pozo se adicionaron 100 μ l de células mononucleadas (2.0×10^5 células /100 μ l) se utilizó medio como testigo negativo y como testigo positivo concanavalina A (ConA 2 μ g/ml) [Sigma, USA] y diferentes condiciones: a) concentraciones crecientes de PRL, b) distintas concentraciones de ConA más PRL y c) ConA más anticuerpo (Ac) anti-PRL diluido 1:50 (el anticuerpo anti-PRL no presentó reacción cruzada con hormona de crecimiento ni lactógeno placentario). Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C/72 h con 5% de CO₂. Dieciocho horas antes de cosechar se marcaron con 1 μ Ci/pozo de timidina tritiada con actividad específica de 63.4 mCi/mg (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Las células se cosecharon con un cosechador múltiple (Cell Harvester, Brandel M-24R, USA) en papel filtro (Whatman, England). El papel filtro se colocó en viales con 3 ml de líquido de centelleo (EcoLume, ICN, USA) y se leyeron en un contador de radiación beta (Packard, 1900 TR). Los resultados se expresaron como índice de estimulación (la media en cpm de los cultivos estimulados / la media en cpm de los cultivos sin estimular [incubados con medio]).

Purificación de linfocitos B:

Los linfocitos B se purificaron utilizando “B cell isolation kit” (Miltenyi Biotec, Germany). Las células mononucleadas se lavaron con regulador (PBS 0.01 M, BSA 0.5%, EDTA 2mM, 10% suero autólogo); 40 μ l de bloqueador del receptor Fc (Ig humana) más 40 μ l de cocktail de anticuerpos (anti- IgE, CD2, CD4, CD11b, CD16, CD36) se adicionaron a 2×10^7 células resuspendidas en 120 μ g/ml de regulador. Se incubaron a 8°C durante 10 min., se lavaron dos veces con regulador, 60 μ l de perlas magnéticas conjugadas a Ac anti- Inmunoglobulina (Ig) de ratón se incubaron con las células resuspendidas en 140 μ l de regulador 15 min a 8°C. Las células lavadas y resuspendidas en 500 μ l de regulador se pasaron por una columna de separación MACS MS+ (Miltenyi Biotec, Germany), la pureza se verificó por inmunofluorescencia directa.

Purificación de linfocitos T:

Los linfocitos CD4⁺ se purificaron utilizando “CD4⁺ T cell isolation kit” (Miltenyi Biotec, Germany). Las células mononucleadas se lavaron con regulador (PBS 0.01 M, BSA 0.5%,

EDTA 2mM), 1×10^7 células en un volumen de 80 $\mu\text{g/ml}$ de regulador más 20 μl del cocktail de anticuerpos (anti- CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, CD56) se incubaron a 8°C por 10 min. Se lavaron dos veces con regulador; 20 μl de perlas magnéticas conjugadas con Ac anti-Ig de ratón se incubaron con las células resuspendidas en 80 μl de regulador 15 min a 8°C . Las células lavadas y resuspendidas en 500 μl de regulador se pasaron por una columna de separación MACS MS+ (Miltenyi Biotec, Germany) la pureza se verificó por inmunofluorescencia directa.

Ensayo de activación:

Las células mononucleadas y linfocitos B (pureza $>90\%$) se incubaron en placas de cultivo (Nunc, Denmark) de 24 y 96 pozos respectivamente. A cada pozo se agregó 500 μl de la suspensión de células mononucleadas (5×10^5 células/pozo) o 100 μl de linfocitos B (70×10^5 células/pozo) se incubaron a 37°C durante 4 h para CD154, 18 h para CD69, 24 h para CD86 y CD40, en las siguientes condiciones: a) medio (testigo negativo), b) PRL (50 ng/ml), c) mitógeno como testigo positivo (ConA 2 $\mu\text{g/ml}$ para CD69, PMA 5 ng/ml – ionomicina 0.2 $\mu\text{g/ml}$ para CD154, CD86, CD40], d) mitógeno más PRL (50 ng/ml) y e) mitógeno más Ac anti-PRL (1:50). Posteriormente se cosecharon y lavaron con PBS-BSA-Az (PBS pH 7.2, BSA 0.2 %, Na_3N 0.2 %). Se incubaron con distintos anticuerpos (anti-CD69-FITC, CD4-PE, CD19-PE, CD86-FITC, CD154-PE, CD40-FITC [BD, PharMingen, USA]). Todas las incubaciones se realizaron a 6°C durante 20 min, entre cada incubación las células se lavaron dos veces con PBS-BSA-Az. Las células se leyeron por citometría de Flujo (FACSCalibur, Becton&Dickinson, USA.) y analizaron con el programa Cell Quest.

Identificación de citocinas intracelulares:

Linfocitos CD4^+ (pureza $>90\%$) provenientes de personas sanas se cultivaron en placas de 96 pozos en una concentración de 1×10^5 linfocitos/pozo, se incubaron con PMA (5 ng/ml [Sigma, USA]) ionomicina (400 ng/ml [Sigma, USA]) y brefeldina A (BD, PharMingen, USA) por 4h a 37°C . Se cosecharon y lavaron con Perm/wash buffer (BD, PharMingen, USA), las células se permeabilizaron con cytofix/cytoperm solution (BD, PharMingen, USA) 20 min a 4°C , se lavaron e incubaron con los distintos anticuerpos (anti $\text{IFN}\gamma$ -FITC,

IL-2-FITC [BD, PharMingen, USA]) 20 min a 4°C. Se fijaron y leyeron por citometría de flujo.

Pruebas de inhibición:

En las pruebas de inhibición se mantuvo una concentración constante de anticuerpo anti prolactina y se pre-incubó con concentraciones crecientes de prolactina (10, 25, 50 y 100 ng/ml) por 1 h a 37°C. El anticuerpo anti-prolactina pre-incubado se centrifugó y agregó a las células mononucleadas estimuladas con mitógeno (ConA para CD69 y PMA-ionomicina para CD154), las células se cosecharon marcaron y leyeron por citometría de flujo; la expresión de CD69 y CD154 se comparó con las células incubadas con mitógeno más anticuerpo anti-prolactina sin pre-incubar con prolactina. El anticuerpo anti-prolactina se agregó a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 h) en las células activadas con mitógeno, las células se cosecharon marcaron y leyeron por citometría de flujo; la expresión de CD69 y CD154 se comparó con las células incubadas con mitógeno.

Determinación de PRL con células Nb2:

Las células Nb2 (linfocitos T inmaduros de rata y dependientes de prolactina) se crecieron a 37°C en medio de mantenimiento (medio Fischer [Sigma, USA], 10% suero de caballo, 10% suero fetal de bovino, 10^{-4} M 2-β-mercaptoetanol, 2mM L-glutamina 50 IU/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomycin [Gibco BRL, USA]), las células en confluencia se incubaron 24 h en medio estacionario (medio Fischer, 10 % SC, 1 % SFB), se centrifugaron (1200 rpm/10 min) y colocaron en medio de bioensayo (medio Fischer, 10% SC). En placas de 96 pozos se colocaron 100 µl de las células ajustadas a una conc. de 2×10^5 cél/ml, para la realización de la curva se colocaron concentraciones crecientes de PRL (de 0 a 8 ng/ml), para la determinación de prolactina en las muestras se colocaron 50 µl de sobrenadantes provenientes de la incubación de células mononucleadas con el mitógeno a distintos tiempos (30 min, 1, 2, 3, 4 y 18 h) o 50 µl de los sobrenadantes anteriores más anticuerpo anti prolactina. Las células Nb2 se incubaron 72 h a 37°C, 6 h antes se marcaron con 1 µCi de timidina tritiada, se cosecharon y contaron en un contador beta. Se realizaron los cálculos necesarios para expresar la concentración de PRL en un ml de sobrenadante.

Extracción de RNA:

Células mononucleadas (6×10^6) se incubaron con PMA 5 ng/ml – ionomicina 200 ng/ml, se cosecharon a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h, se adicionó 1 ml de TriPure (Roche, USA). Las células se homogeneizaron e incubaron 5 min a temperatura ambiente, se adicionó 200 μ l de cloroformo, se mezcló vigorosamente e incubó 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó (12,000 rpm durante 15 min) y separó la fase incolora, de la cual se precipitó el RNA al agregar 500 μ l de isopropanol, se incubó por 15 min a temperatura ambiente y centrifugó (12,000 rpm durante 10 min). El sobrenadante se decantó y colocó 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó, decantó y resuspendió el RNA en H₂O tratada con DEPC.

RT-PCR:

Cuatro μ g de RNA más 0.5 μ g de Oligo dT en un volumen de 12 μ l, se incubaron durante 10 min a 70°C, se adicionó 8 μ l de la siguiente mezcla: 4 μ l buffer 5X, 1 μ l dNTP (10 mM), 2 μ l DTT (0.1 M) y 1 μ l de Superscript II transcriptasa (200 U/ μ l) (Gibco BRL, USA). Se incubó 50 min a 42°C y 15 min a 70°C, obteniéndose así el cDNA. Para la identificación de PRL el cDNA se incubó 5 min a 94°C, se adicionaron 80 μ l de la siguiente mezcla: 66.7 μ l agua, 8 μ l Buffer 10X, 1.8 μ l MgCl₂ (50mM), 1 μ l dNTP (10 mM), 1 μ l primer (50 pM) 3'GCA GTT GTT GTT GTG GAT GAT TCG GCA, 1 μ l primer (50 pM) 5'CAA GAA GAA TCG GAA CAT ACA GGC TTT, 0.5 μ l Taq polimerasa (2.5 U/ μ l), se incubó con el siguiente protocolo: 94° 1 min, 65° 2 min, 72° 2 min, 30 ciclos, 72° 10 min.

Para el PRL-R el cDNA se incubó a 94°C/5 min, se adicionaron 80 μ l de la siguiente mezcla: 66.7 μ l agua, 8 μ l Buffer 10X, 2.8 μ l MgCl₂ (50 mM), 1 μ l dNTP (10mM), 0.5 μ l (25 pM) primer 3'CAC TTG CTT GAT GTT GCA GTG AAG TTG, 0.5 μ l (25 pM) primer 5'GTC TGG GCA GTG GCT TTG AAG GGC, 0.5 μ l Taq polimerasa (2.5 U/ μ l), se incubó con el siguiente protocolo:

94° 2min.	94° 30s	} 30 ciclos	94° 30s.
65° 1min	65° 1min		65° 1min.

72° 1.5min.

72° 1.5min

72° 10min.

Dot Blotting:

En membranas de nylon cargadas positivamente (Roche, USA) se colocaron 4 µl del amplificado de prolactina, se secó a temperatura ambiente y se lavó con 0.5 M NaOH/1.5 M Na Cl por 5 min, el DNA se fijó a la membrana al exponerla por 3 min a luz U.V., la membrana se prehibridizó 1 h a 42°C en regulador de hibridización (SSC 6x, regulador de bloqueo 1 %, SDS 0.5 %; se hibridizó 1 h a 42°C con la sonda marcada con digoxigenina (1 pmol/ ml de regulador) las membranas se lavaron dos veces por 15 min con 5xSSC y 20 min a 53°C con TMAC (TMC 3 M, Tris pH 8 50 mM, EDTA 2 mM, SDS 0.1 %), se incubaron 30 min con regulador de bloqueo y 30 min con el conjugado anti-digoxigenina (1:5000 [Roche, USA]), se lavaron e incubaron con el sustrato (CSPD 1:100 [Roche, USA]). Las membranas se lavaron y se expusieron a películas de rayos X durante 3 h.

Tinción intracitoplásmica de PRL:

Un millón de células mononucleadas/tubo se permeabilizaron con 100 µl de cytofix/cytoperm (BD, PharMingen, USA) por 20 min a 4°C, se lavaron con 1 ml. de perm/wash (BD, PharMingen, USA) e incubaron con el anticuerpo anti-PRL o no relacionado (Zymed, USA) durante 30 min a 4°C, se lavaron e incubaron con el anticuerpo anti-IgG-FITC (Zymed, USA) 30 min a 4°C, se lavaron y centrifugaron en citocentrífuga a 1,300 rpm durante 5 min, se prepararon en el porta objeto y observaron por microscopio confocal.

Análisis estadístico:

Los datos de nuestro modelo de trabajo presentaron una distribución normal de acuerdo con la prueba de normalidad realizada (Shapiro Wilk), por lo que la medida empleada fue la media. Los datos fueron analizados utilizando la prueba paramétrica ANOVA y t de student. El nivel de significancia en todos los casos fue una $p < 0.05$. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS 10.0 para WINDOWS.

RESULTADOS

a) Estandarización

Previo a los experimento para determinar la participación de la prolactina en el proceso de activación se confirmó la presencia de mRNA de prolactina y su receptor en células mononucleadas a través de RT-PCR y Dot Blotting. La figura 5a muestra la expresión del mRNA de prolactina con sondas (Dot blotting) que se encontró tanto en las células en estado basal como en las estimuladas con PMA-ionomicina. El testigo positivo fue mRNA de células Jurkat y testigo negativo el amplificado de β actina. La figura 5b muestra el amplificado del mRNA correspondiente al receptor de prolactina con un peso de 1094 pares de bases (pb), el cual también se encontró en las células inactivas como en las activas.

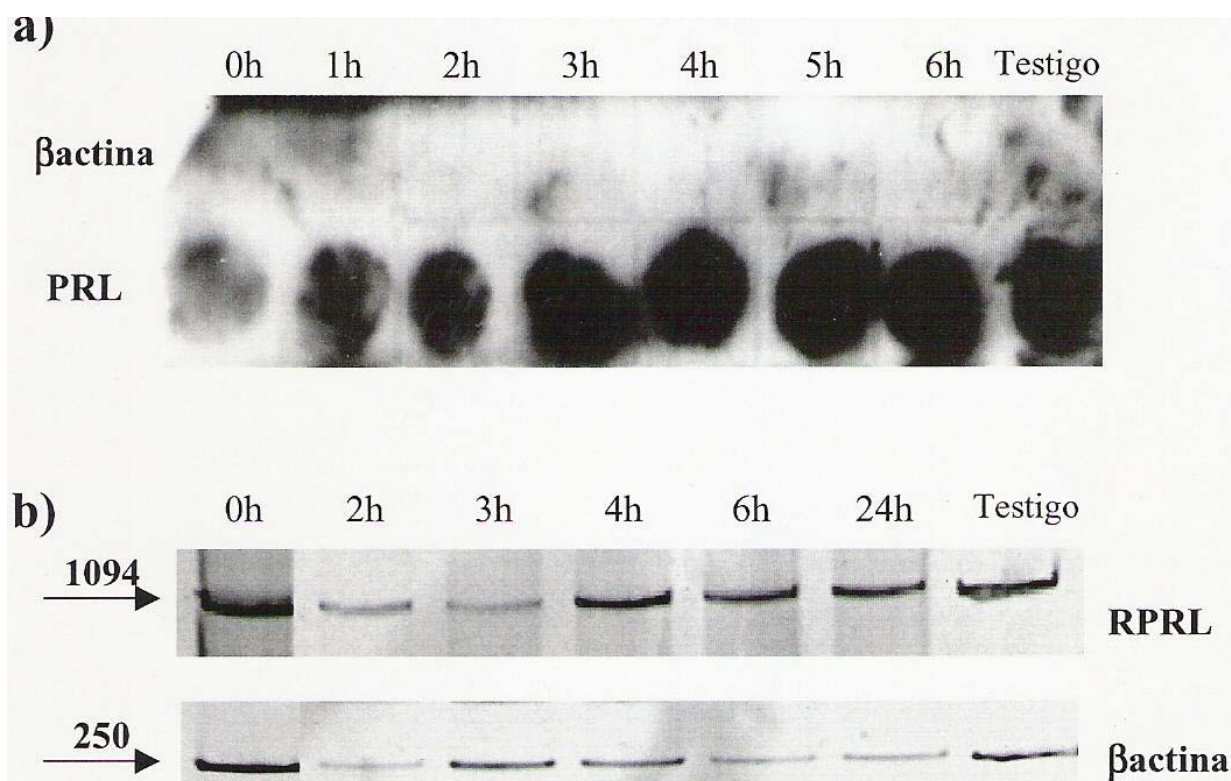


Figura 5. Presencia del mRNA de prolactina y su receptor en células mononucleares. Las células se incubaron con PMA-ionomicina a distintos tiempos (0 a 6 h) se realizó RT-PCR para PRL y β actina, los amplificados se hibridizaron con sonda marcada para prolactina, el tiempo de revelado fue de 3 h (a). El amplificado del receptor de prolactina por RT-PCR se realizó en células que se incubaron con PMA-ionomicina a distintos tiempo (0 a 24 h) (b). En ambos experimentos se utilizó como testigo positivo mRNA de células Jurkat.

Confirmada la presencia del mRNA de prolactina fue necesario determinarla en el citoplasma de células sin activar (en reposo), para lo cual se permeabilizaron e incubaron con anticuerpo anti-prolactina encontrando fluorescencia por microscopia confocal (figura 6c). En contraste, el testigo negativo; células incubadas con un anticuerpo no relacionado (figura 6a) no mostró fluorescencia.

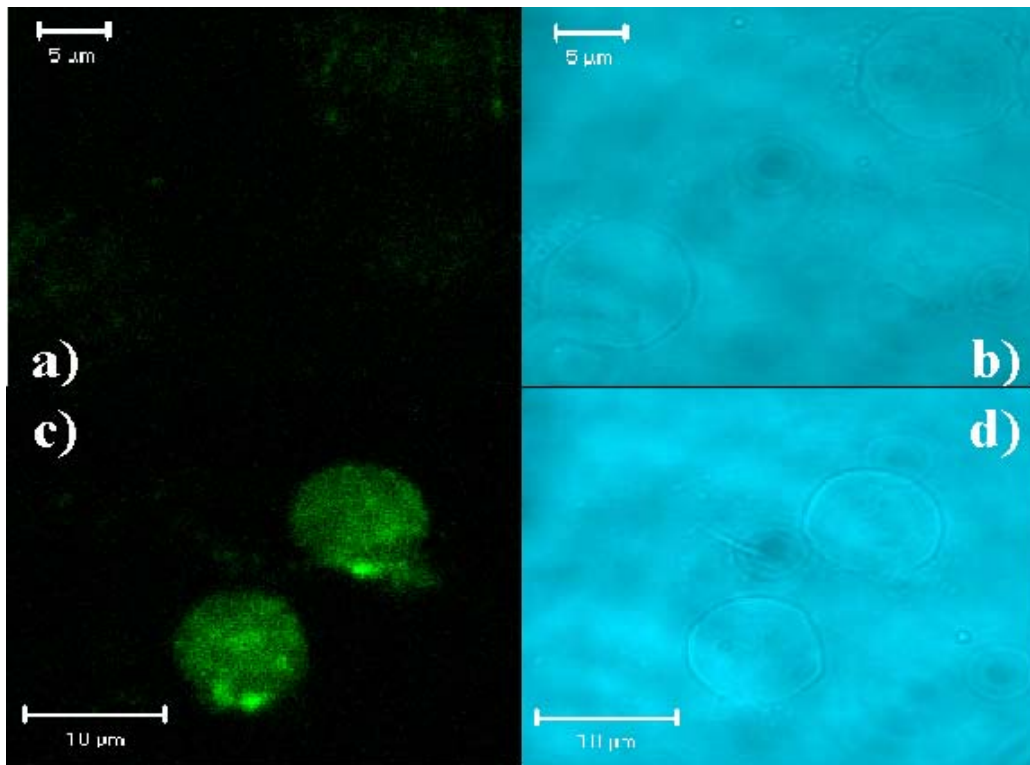


Figura 6. Presencia de prolactina en células mononucleares. Las células en reposo se permeabilizaron, se incubaron con un anticuerpo no relacionado (ac de conejo) (a,b) o con anticuerpo anti-PRL (c,d), se lavaron e incubaron con anticuerpo anti IgG de conejo unido a FITC, las células se observaron por microscopia confocal

En el modelo *in vitro* utilizado para determinar la participación de la prolactina en la activación celular, se utilizaron linfocitos T CD4⁺ y B puros. Los linfocitos B al igual que los T utilizados mostraron una pureza de más del 90 %. La pureza de los linfocitos B se comprobó por la expresión de CD19⁺ (marcador de linfocitos B) y CD4⁺ para los linfocitos T. La figura 7 muestra el porcentaje de células CD19⁺ en dos experimentos diferentes.

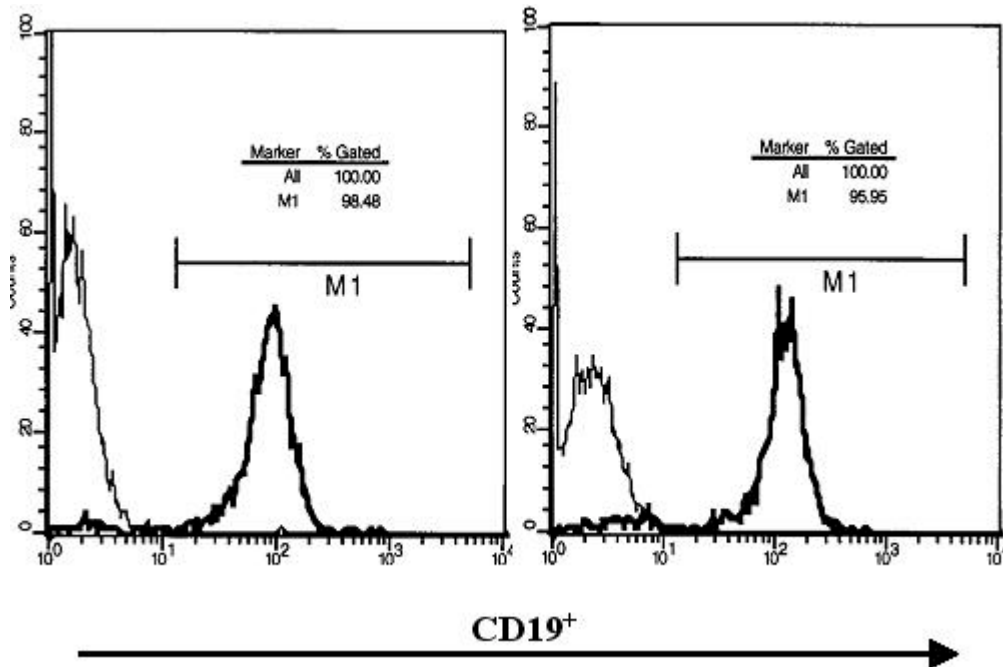


Figura 7. Caracterización fenotípica de los linfocitos B purificados. Las células B se purificaron utilizando perlas magnéticas. La pureza de más del 90 %, se verificó al marcar las células con anticuerpo anti-CD19-PE y determinaron por citometría de flujo.

b) Resultados

Las células mononucleadas presentan prolactina intracitoplásmica, la cinética de secreción de prolactina por las células activadas con ConA o PMA-ionomicina se muestra en la figura 8. El sobrenadante de células estimuladas con mitógeno se cosechó a distintos tiempos y agregó a cultivos de la línea celular Nb2 para determinar la concentración de prolactina en los sobrenadantes. La concentración de prolactina fue de 185 pg/ml (PMA-ionomicina) y 99 pg/ml (ConA) a los 30 min. La curva de concentración de prolactina presentó una meseta en la secreción de prolactina durante las cuatro primeras horas de incubación. La secreción de prolactina incrementó a 356.9 pg/ml (PMA-ionomicina), 335.4 pg/ml (ConA) a las 18 h. Las células Nb2 no presentaron proliferación al incubarlas con los sobrenadantes más anticuerpo anti-PRL (Figura 8). El medio de cultivo (AIMV) no indujo proliferación (datos no mostrados).

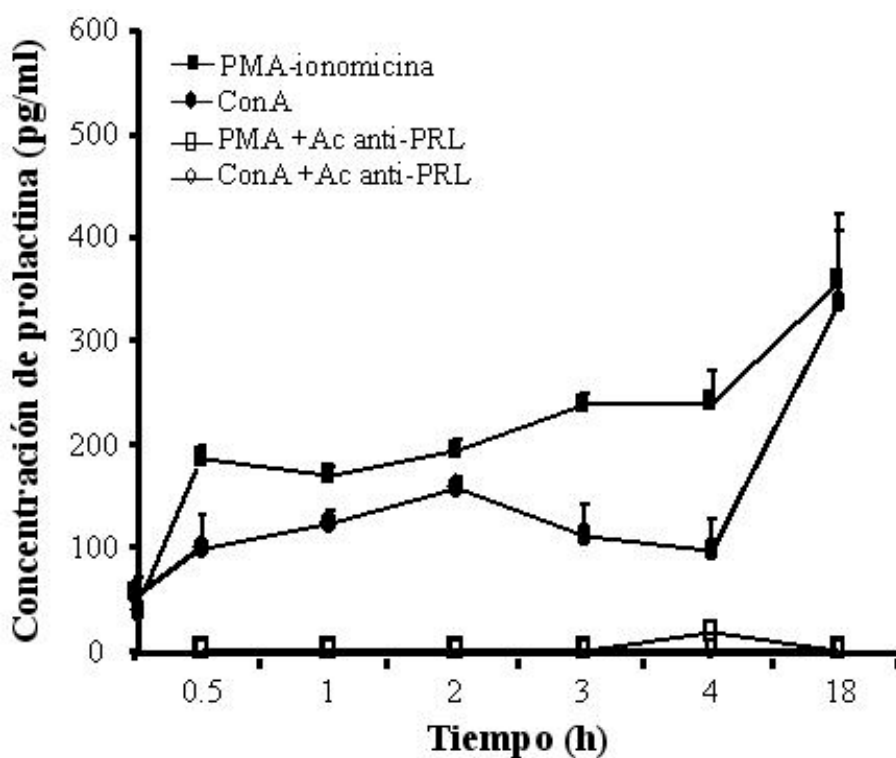


Figura 8. Cinética de secreción de prolactina por células mononucleares. Los sobrenadantes de células mononucleadas activadas con PMA-ionomicina o ConA a diferentes tiempos se incubaron con células Nb2 (dependientes de prolactina), en presencia o ausencia de anticuerpo anti-PRL. El ensayo se realizó con tres muestras cada una por triplicado. El gráfico representa la media más una desviación estándar.

Para comprobar si la prolactina tenía la capacidad de inducir proliferación celular, las células mononucleadas se estimularon con distintas concentraciones de prolactina hipofisiaria (0 a 1000 ng/ml) [Viselli y col., 1991] como se muestra en el cuadro 1. Los resultados están presentados por índice de estimulación. El testigo positivo (incubadas con mitógeno) mostró una respuesta adecuada con un índice de proliferación de 80, sugiriendo células viables y con capacidad de proliferar ante un estímulo, mientras que la PRL a distintas concentraciones no fue capaz de inducir una respuesta.

Estímulo	Concentración	Índice de estimulación
Medio(testigo negativo)	0	1
PRL	10 ng/ml	1
PRL	50 ng/ml	1.5
PRL	100 ng/ ml	1.5
PRL	250 ng/ml	1.5
PRL	500 ng/ml	1.5
PRL	1000 ng/ml	1.7
ConA (testigo positivo)	2 µg/ml	80

Cuadro 1. Ensayo de proliferación. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de prolactina, como testigo positivo se incubaron con ConA (2 µg/ml) a 37°C/72 h, la proliferación celular se midió por incorporación de timidina y reportó como índice de estimulación [CPM del problemas / CPM del testigo negativo (medio)]. Los ensayos se realizaron por triplicado en diez muestras diferentes.

Con el fin de comprobar si la prolactina era capaz de actuar como co-mitógeno en el proceso de proliferación de las células mononucleadas, estas se co-incubaron en presencia de distintas concentraciones de un mitógeno inespecífico (ConA) más concentraciones crecientes de prolactina. La figura 9a muestra un incremento en la proliferación celular al estimular con 2 $\mu\text{g/ml}$ de ConA más 50 ng/ml de prolactina. El proceso de proliferación celular disminuyó al co-incubar con anticuerpo anti-prolactina mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La figura 9b muestra un efecto sinérgico de la prolactina en el proceso de proliferación celular, mostrando diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

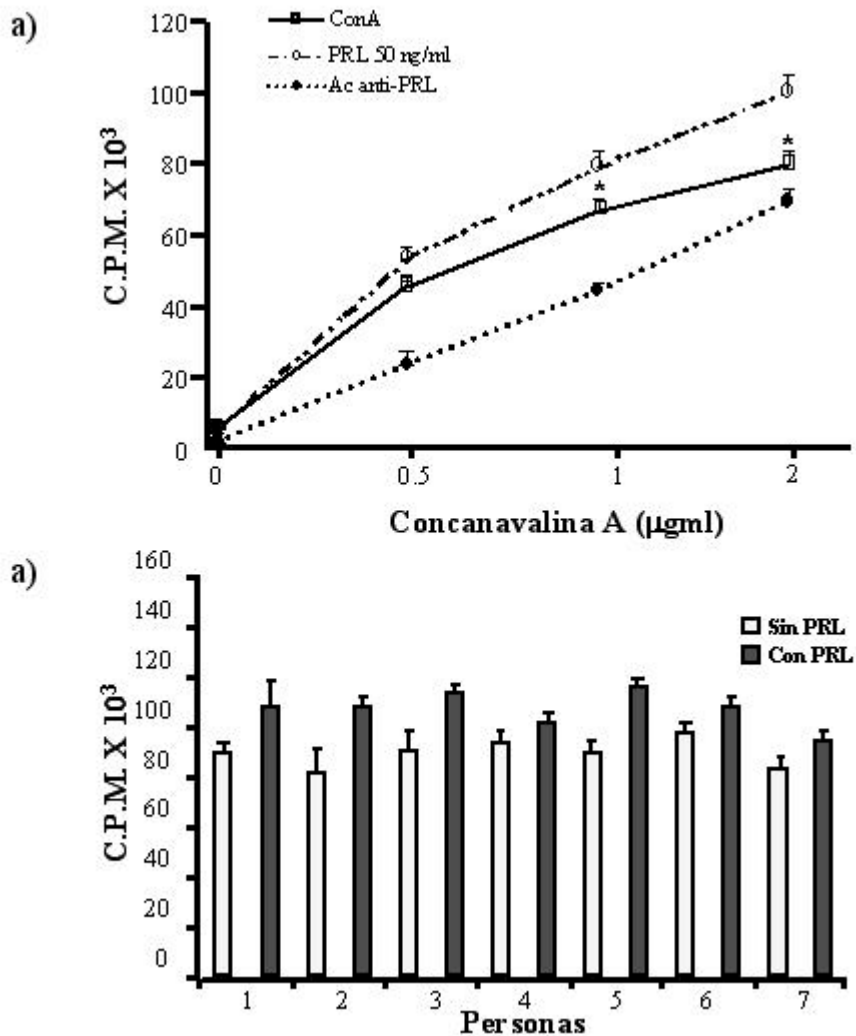


Figura 9. Proliferación de células mononucleadas. a) Las células se incubaron (37°C/72 h) con diferentes concentraciones de ConA más 50 ng/ml de prolactina o anticuerpo anti-PRL (1:50). La proliferación celular se reporto en C.P.M. b) proliferación de células provenientes de 7 personas sanas incubadas cada experimento se realizó por triplicado con ConA o ConA más prolactina. Las graficas muestran la media más una desviación estándar.

A fin de determinar la participación de la prolactina en la expresión de moléculas coestimuladoras. Se utilizaron: a) células mononucleadas para medir CD154 y CD69 (en CD4⁺) y b) linfocitos B para CD86 y CD40 provenientes de personas sanas. En nuestro modelo *in vitro* las células se incubaron en las siguientes condiciones: a) con medio como testigo negativo, b) con PRL (para observar si era capaz de inducir activación), c) con mitógeno como testigo positivo, d) mitógeno más PRL (para observar efecto sinérgico en la activación celular) y e) mitógeno más anticuerpo anti-PRL. No encontramos diferencia en la expresión de moléculas de superficie de los linfocitos estimulados solo con PRL al compararlo con nuestro testigo negativo (CD69 en 0.3 %, CD154 en 0.4 %, CD86 un 18 % y CD40 en un 91 %, semejante al testigo negativo: CD69 en 0.3 %, CD154 en 0.3 %, CD86 en 22 % y CD40 en 86 %). En contraste, las células estimuladas con mitógeno inespecífico (testigo positivo) presentaron un aumento en la expresión de CD69 (34 %), CD154 (56 %), CD86 (43 %), la molécula CD40 se mantuvo constante (92 %). Estos porcentajes no se modificaron al co-incubar con PRL: CD69 (32 %), CD154 (57 %), CD86 (40 %) y CD40 (91 %). Sin embargo, al comparar las células incubadas con mitógeno más anticuerpo anti-prolactina con el testigo positivo se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la expresión de CD69 (15 %) y CD154 (34 %). La expresión de CD86 (39 %) y CD40 (91 %) en los linfocitos B no se modificó al incubarse con el mitógeno más el anticuerpo (Cuadro 2. Figura 10).

Molécula	Medio (testigo negativo) %	PRL %	Mitógeno (testigo positivo) %	Mitógeno más PRL %	Mitógeno más anticuerpo anti-PRL %
CD69 ⁺ CD4 ⁺	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	34 ^a ± 10	32 ± 9	15 ^a ± 5
CD154 ⁺	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.3	56 ^b ± 7	57 ± 6	34 ^b ± 14
Linfocitos B CD86 ⁺	22 ± 6	18 ± 5	43 ± 10	40 ± 9	39 ± 8
Linfocitos B CD40	86 ± 9	91 ± 4	92 ± 5	91 ± 6	91 ± 5

a y b presentaron una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$

Cuadro 2. Porcentaje de expresión de moléculas de superficie en células provenientes de personas sanas. Células mononucleadas (CD69, CD154) o linfocitos B (CD40, CD86) provenientes de 10 personas sanas se incubaron en distintas condiciones: a) medio, b) PRL (50 ng/ml), c) mitógeno, d) mitógeno más PRL y e) mitógeno más Ac anti-PRL. Las células se incubaron, se cosecharon, lavaron y marcaron con los respectivos anticuerpos, las muestras se determinaron por inmunofluorescencia (FACS). El cuadro muestra la media más desviación estándar de cada grupo.

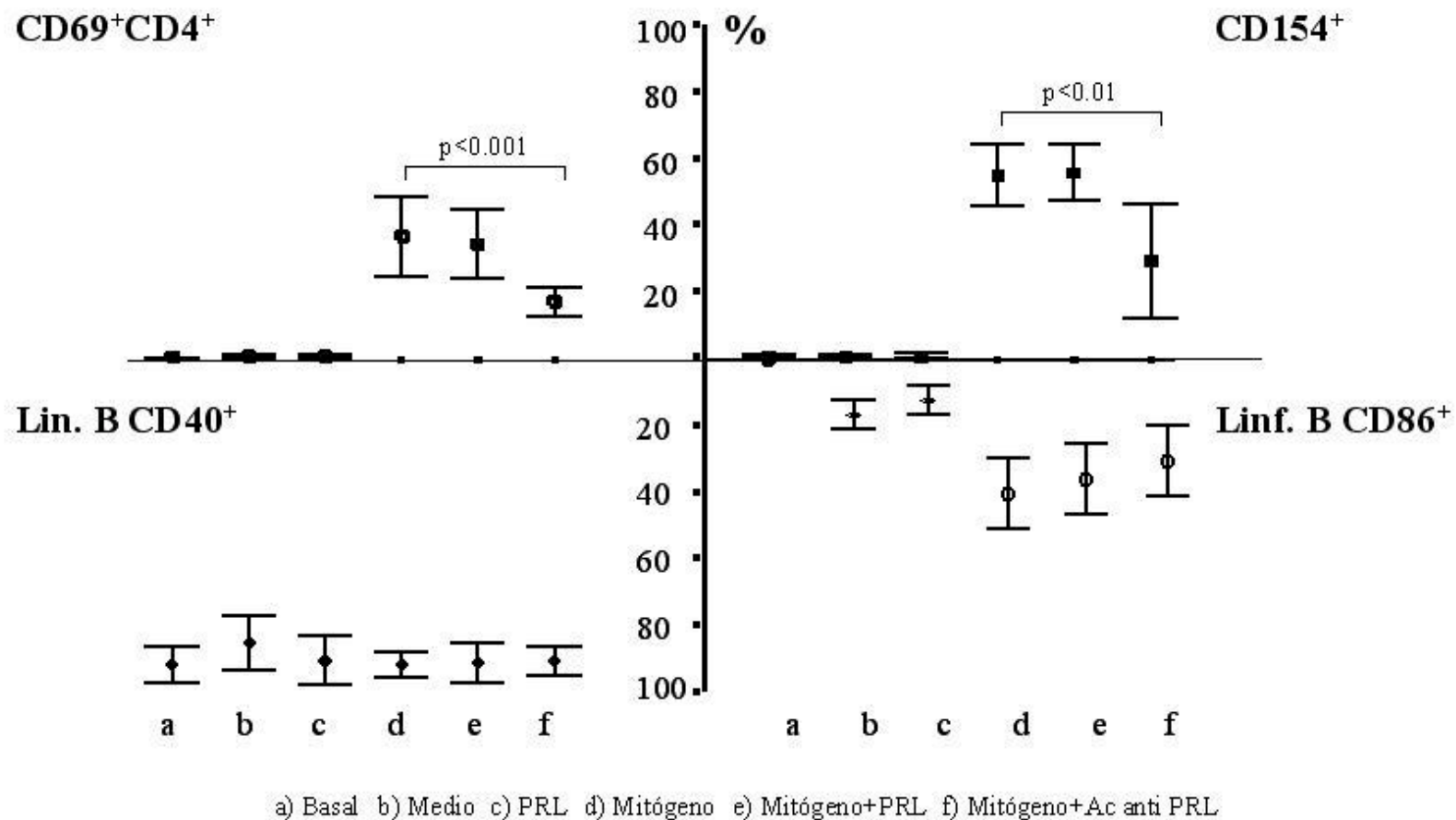


Figura 10. Porcentaje de células provenientes de personas sanas que expresan moléculas de superficie. Para CD69, CD154 se utilizaron mononucleares y para CD40, CD86 linfocitos B. En las siguientes condiciones: a) estado basal, b) medio, c) PRL (50 ng/ml), d) mitógeno (ConA 2 µg/ml [CD69] o PMA 5 ng/ml - ionomicina 0.2 µg/ml [CD154, CD40, CD86], e) mitógeno más PRL y f) mitógeno más Ac anti-PRL (1.50), posteriormente se incubaron a 37°C por 4 h (CD154), 18 h (CD69) o 24 h (CD40, CD86), se cosecharon, se lavaron e incubaron con los respectivos anticuerpos y se determinaron por inmunofluorescencia (FACS). El experimento se realizó con 10 personas sanas y se graficó la media más desviación estándar

Utilizando otro marco de referencia para determinar la intervención de la prolactina en el proceso de activación, se utilizaron células provenientes de pacientes hiperprolactinémicos (sin enfermedad autoinmune). La expresión de las moléculas CD154, CD69 CD86 y CD40 mostró: en el testigo negativo (medio): 0.1 % (CD69), 0.2 % (CD154), 24 % (CD86), 88 % (CD40), similar a aquellos estimulados solo con PRL: 0.1 % (CD69), 0.2 % (CD154), 20 % (CD86), 88 % (CD40), el testigo positivo mostró: 29 % (CD69), 56 % (CD154), 50 % (CD86), 89 % (CD40), el estímulo de mitógeno más PRL no mostró efecto sinérgico 29 % (CD69), 57 % (CD154), 49 % (CD86), 90 % (CD40) y finalmente el mitógeno más anticuerpo anti-PRL: 18 % (CD69), 24 % (CD154), 46 % (CD86), 89 % (CD40). El comportamiento fue semejante al encontrado en las células provenientes de personas sanas, no hubo aumento en la expresión de las moléculas al co-incubarlas con mitógeno más prolactina. Sin embargo, existió una disminución de CD69 y CD154 al co-incubar con anticuerpo anti-prolactina. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar la expresión de las moléculas en los dos grupos (sanos contra hiperprolactinémicos) en las distintas condiciones. Aunque la expresión de CD86 en linfocitos B aumentó en los pacientes hiperprolactinémicos sin diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 3, Figura 11).

Molécula	Medio (testigo negativo) %		PRL %		Mitógeno (testigo positivo) %		Mitógeno más PRL %		Mitógeno más anticuerpo anti-PRL %	
	Sano	HPRL	Sano	HPRL	Sano	HPRL	Sano	HPRL	Sano	HPRL
CD69 ⁺ CD4 ⁺	0.3±0.1	0.1±0.04	0.3±0.1	0.2±0.07	34±10	29±6	32±9	29±9	15±5	18±4
CD154 ⁺	0.3±0.1	0.2±0.2	0.4±0.3	0.2±0.1	56±7	56±6	57±6	57±5	34±14	24±7
Linf. B CD86 ⁺	22±6	24±4	18±5	21±3	43±10	51±6	40±9	49±8	39±8	46±6
Linf. B CD40 ⁺	86±9	88±8	91±4	88±10	92±5	89±9	91±6	90±11	91±5	89±9

Cuadro 3. Comparación de porcentajes de expresión de moléculas de superficie entre células provenientes de 10 personas sanas y 5 pacientes con hiperprolactinemia (HPRL). Células mononucleadas (CD69, CD154) o linfocitos B (CD40, CD86) se incubaron en distintas condiciones: a) medio, b) PRL (50 ng/ml), c) mitógeno, d) mitógeno más PRL y e) mitógeno más Ac anti-PRL. Las células se incubaron, se cosecharon lavaron y marcaron con los respectivos anticuerpo, las muestras se determinaron por inmunofluorescencia (FACS). El cuadro muestra la media más desviación estandar de cada grupo.

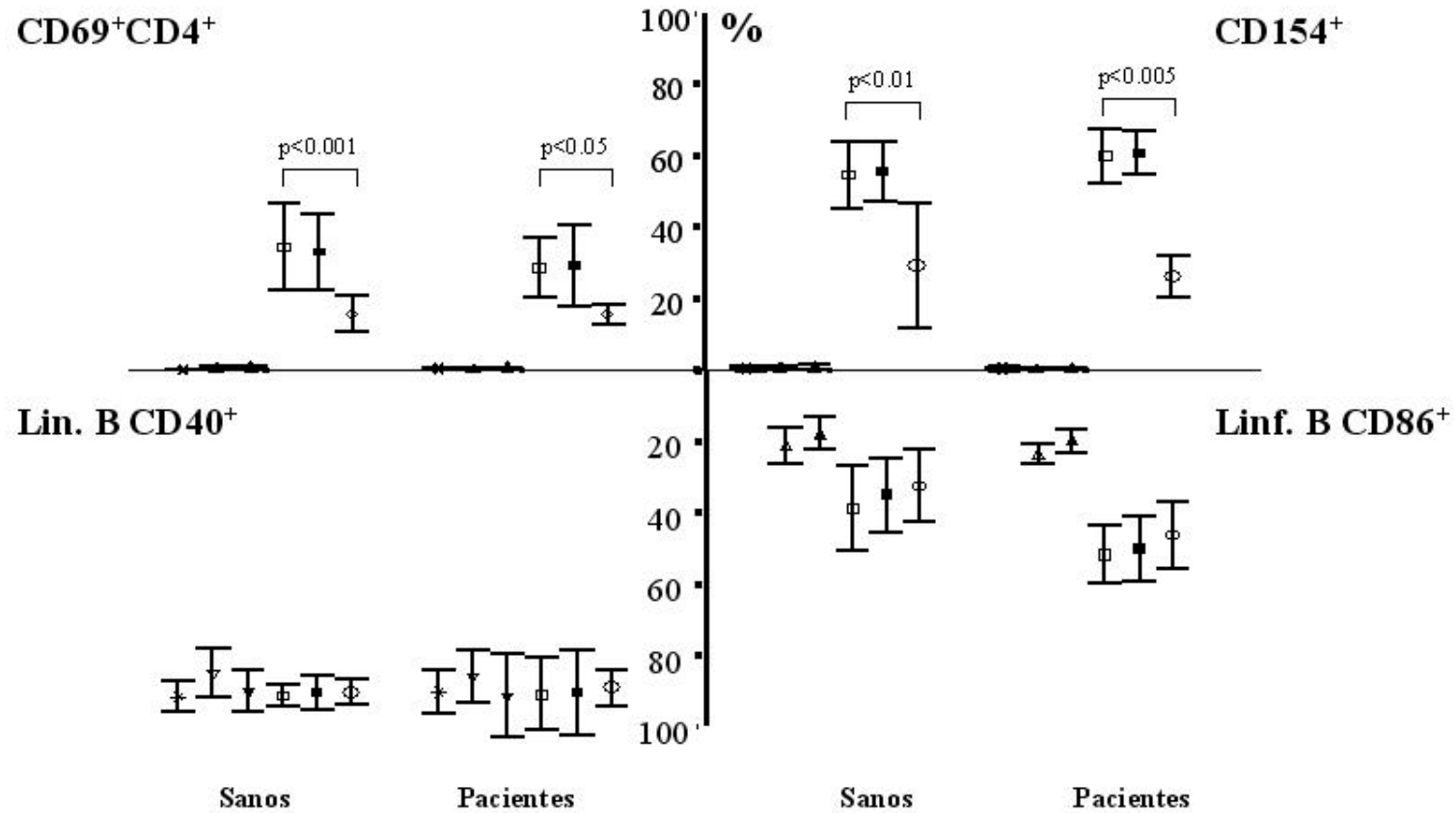


Figura 11. Comparación de porcentajes de expresión de moléculas de superficie entre células provenientes de personas sanas y pacientes con hiperprolactinemia (HPRL). Células mononucleares (CD69, CD154) o linfocitos B (CD40, CD86), se incubaron en distintas condiciones: a) estado basal \square , b) medio \square , c) PRL (50 ng/ml) \blacktriangle d) Mitógeno (ConA 2 μ g/ml [CD69] o PMA 5 ng/ml - ionomicina 0.2 μ g/ml [CD154, CD40, CD86]) \square , e) Mitógeno más PRL \bullet y f) Mitógeno más Ac anti-PRL (1.50) \circ . Las células se incubaron a 37°C por 4 h (CD154), 18 h (CD69) o 24 h (CD40, CD86). Se cosecharon, lavaron e incubaron con los respectivos anticuerpo, las muestras se determinaron por inmunofluorescencia (FACS). El experimento se realizó con 10 personas sanas, 5 pacientes y se graficó la media más desviación estándar

La figura 12 muestra los experimentos con células mononucleadas co-incubadas con ConA más un anticuerpo no relacionado (suero de conejo), mostrando un porcentaje en el número de células positivas a CD69 semejante al testigo positivo. En contraste, al co-incubar las células con ConA más anticuerpo anti prolactina (en suero de conejo) se encontró una disminución en la expresión de CD69. Los mismos resultados se observaron en la expresión de CD154.

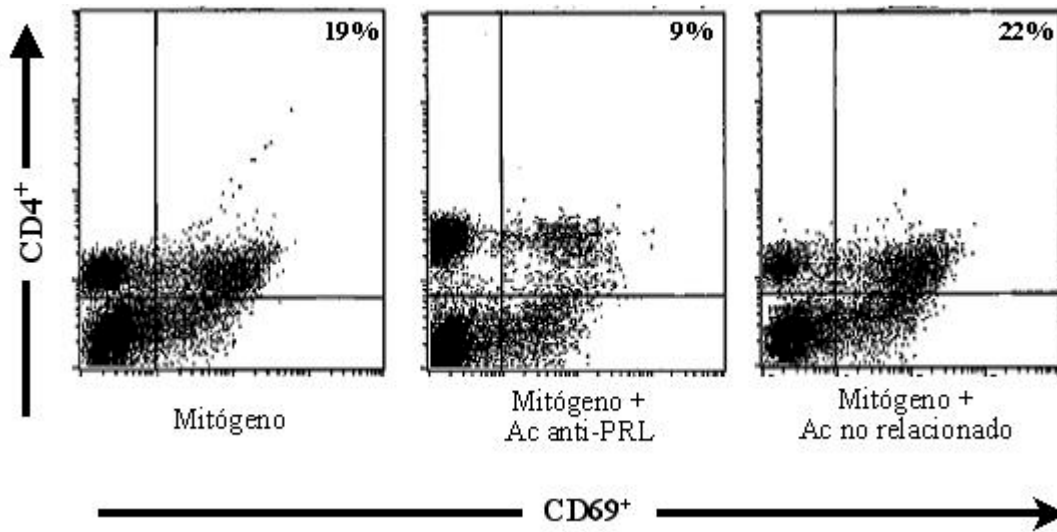


Figura 12. Expresión de CD69 en células incubadas con distintos anticuerpos. Células mononucleares se incubaron con ConA (2 μ g/ml) más anticuerpo anti-PRL o anticuerpo no relacionado (suero de conejo) a 37°C/ 18 h, las células se cosecharon, marcaron y determinaron por inmunofluorescencia (citometría de flujo).

La figura 13 muestra los resultados del experimento donde previamente se bloqueó el sitio activo del anticuerpo anti-prolactina con concentraciones crecientes de prolactina. La expresión de CD69 en células incubadas con mitógeno más anticuerpo anti-prolactina disminuyó con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo positivo (ConA), diferencia que dejó de ser significativa cuando se agregó el anticuerpo previamente bloqueado con distintas concentraciones de prolactina. Los mismos resultados se observaron en la expresión de CD154.

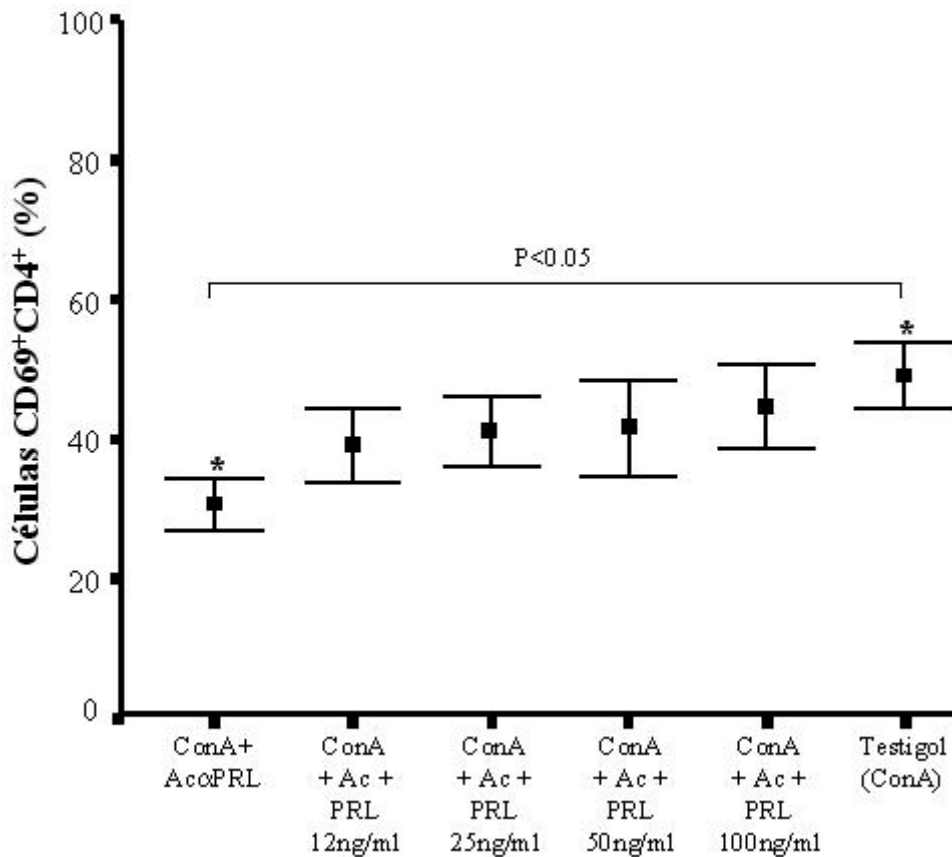


Figura 13. Bloqueo del anticuerpo anti-PRL con prolactina. Células mononucleares se incubaron en presencia ConA (2 mg/ml) más anticuerpo anti-PRL previamente bloqueado (sitio activo) con concentraciones creciente de PRL (0, 12, 25, 50 y 100 ng/ml 1 h a 37°C, las células se cosecharon marcaron y determinaron por inmunofluorescencia (citometría de flujo). La grafica muestra la media más desviación estandar de 6 muestras provenientes de personas sanas.

A fin de determinar el momento en que la prolactina actúa en el fenómeno de activación las células mononucleadas se incubaron con mitógeno agregando anticuerpo anti-prolactina a diferentes tiempos posterior al estímulo con el mitógeno. La expresión de CD154 en células incubadas con mitógeno más anticuerpo anti-prolactina adicionado al tiempo cero y a la hora de incubación disminuyó con respecto al testigo positivo (incubadas solo con mitógeno) mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En contraste, la expresión de CD154 a la 2^a y 3^{er} hora dejó de ser estadísticamente significativa. Los mismos resultados se encontraron en la expresión de CD69. Sugiriendo que la prolactina secretada (figura 8) durante las dos primeras horas después del estímulo participa en la activación de los linfocitos T medida por la expresión de CD69 y CD154 (Figura 14).

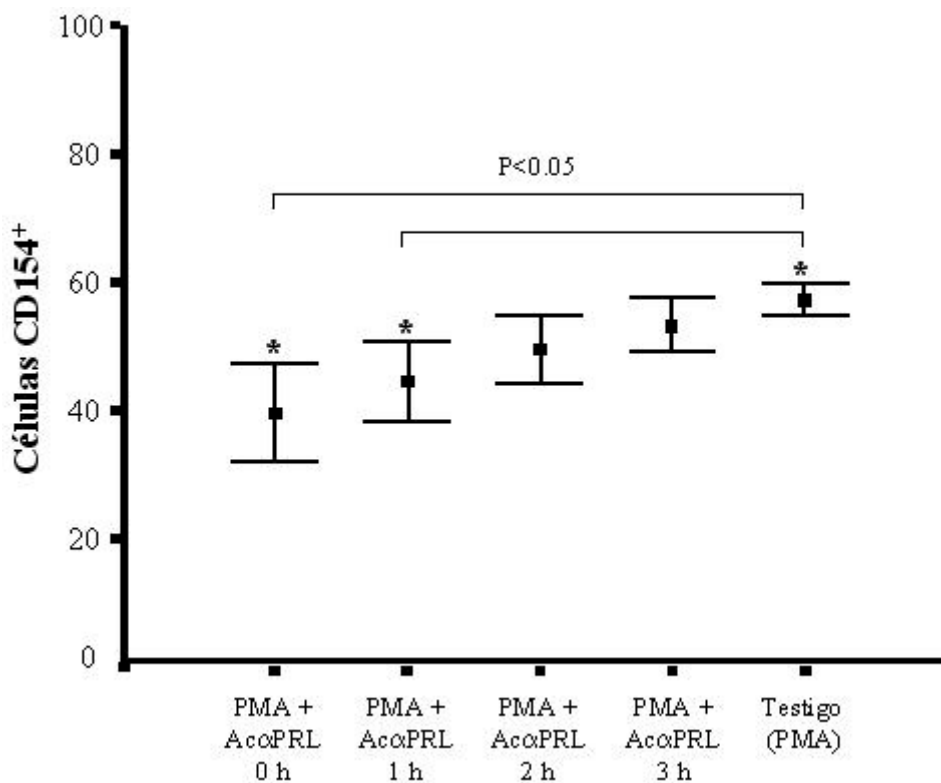


Figura 14. Expresión de CD154 en células incubadas con mitógeno más anticuerpo anti-PRL agregado a diferentes tiempo. Células mononucleadas se incubaron en presencia de mitógeno (PMA-ionomicina) más anticuerpo anti-PRL el cual se colocó en el cultivo a diferentes tiempos 0, 1, 2 y 3 h, las células se cosecharon marcaron y determinaron por inmunofluorescencia (citometría de flujo) la expresión de CD154 se comparó con el de las células incubadas solamente con mitógeno. La grafica muestra la media más desviación estandar de 6 muestras provenientes de personas sanas.

La participación de la prolactina en la producción de IL-2 e IFN γ se realizó en linfocitos T CD4⁺. La producción de interleucinas no se afectó al incubar las células en presencia de prolactina, mostrando un comportamiento semejante al testigo negativo (células incubadas con medio). La prolactina co-incubada con el mitógeno no mostró un efecto sinérgico en la secreción de IL-2 (47 %) e IFN γ (17 %) al comparar los resultados con nuestro testigo positivo (IL-2 [47 %] e IFN γ [14 %]). En contraste, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la producción de IL-2 (12.3 %) e IFN γ (6.3 %) al co-incubar las células con prolactina y anticuerpo anti-prolactina (Figura 15), similar al de la expresión de CD69 y CD154.

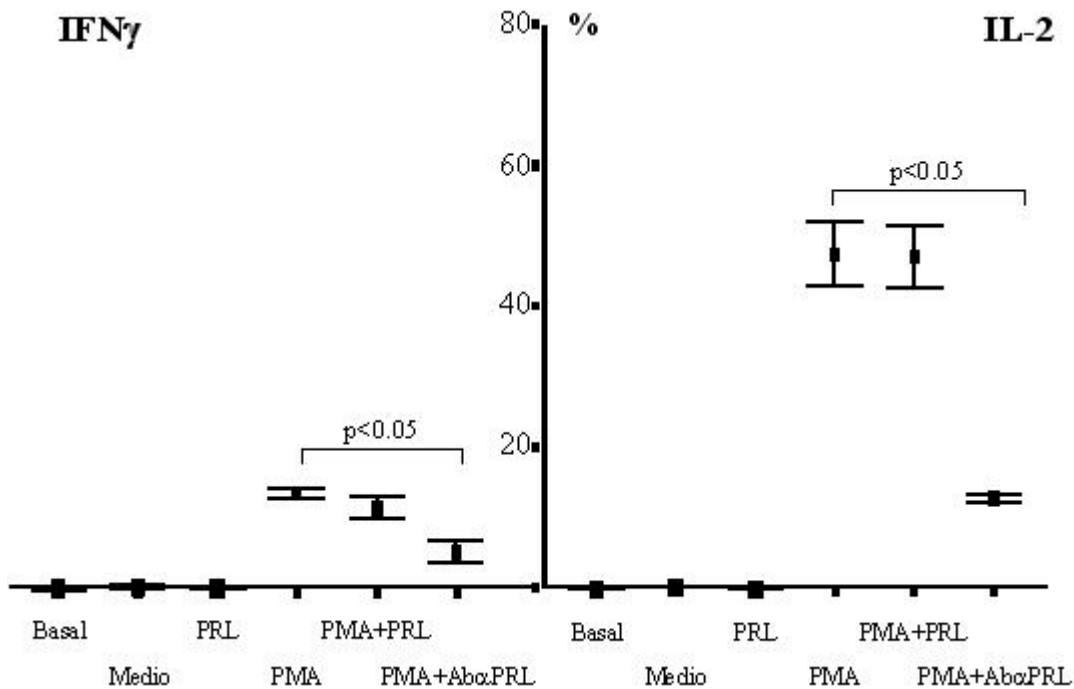


Figura 15. Secreción de interleucinas en linfocitos provenientes de 10 personas sanas. Linfocitos T CD4⁺ se incubaron en distintas condiciones: a) tiempo basal, b) medio, c) PRL (50 ng/ml), d) PMA-ionomicina (5 ng/ml - 0.4 mg/ml), e) PMA-ionomicina más PRL, f) PMN-ionomicina más anticuerpo anti-PR, durante 4 h a 37°. Las células se cosecharon, permeabilizaron, marcaron y determinaron por inmunofluorescencia. La grafica muestra la media más desviación estandar.

A fin de determinar si la disminución en la producción de interleucinas se debió al bloqueo de la PRL y no a la adición de un anticuerpo, este fue previamente bloqueado con concentraciones crecientes de prolactina y posteriormente agregado a los linfocitos CD4⁺ estimulados con mitógeno. La secreción de IFN γ en los linfocitos incubados con mitógeno más anticuerpo anti-prolactina sin bloquear y bloqueado con 10 ng/ml disminuyó con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al comparar con el testigo (estimuladas con mitógeno) la diferencia dejó de ser significativa al bloquear el anticuerpo con 25 ng/ml o más de prolactina. Estos mismos resultados se observaron en la secreción de IL-2 (Figura 16).

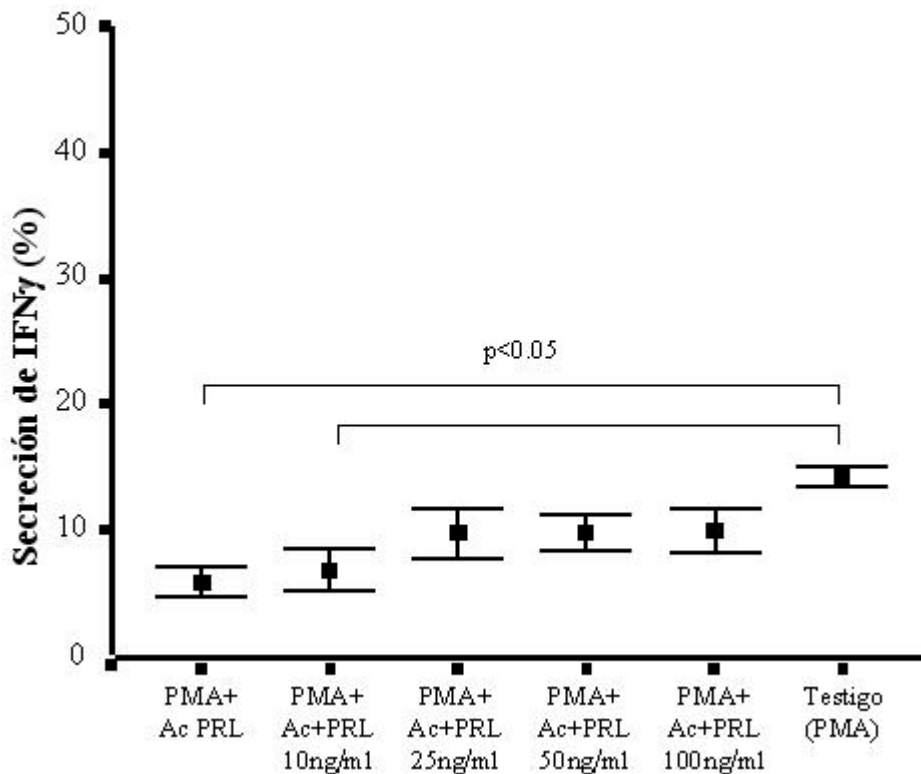


Figura 16. Secreción de IFN γ en linfocitos incubados con mitógeno más anticuerpo anti-prolactina bloqueado. Linfocitos T CD4⁺ se incubaron en presencia de anticuerpo anti-PRL, previamente bloqueado con concentraciones creciente de PRL 1h a 37°C más PMA-ionomicina, las células se cosecharon, permeabilizaron, marcaron y determinaron por inmunofluorescencia. La grafica muestra la media más desviación estandar de 6 muestras provenientes de personas sanas.

La cinética de tiempo mostró que la producción de interleucinas por linfocitos incubados con mitógeno más anticuerpo anti-prolactina adicionado al inicio (0 h) y a la hora de incubación disminuyó con respecto al testigo positivo (incubadas con PMA) con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En contraste, la diferencia entre la secreción del testigo y las células con mitógeno más anticuerpo adicionado durante la 2^a y 3^{er} hora de incubación dejó de ser estadísticamente significativa (Figura 17).

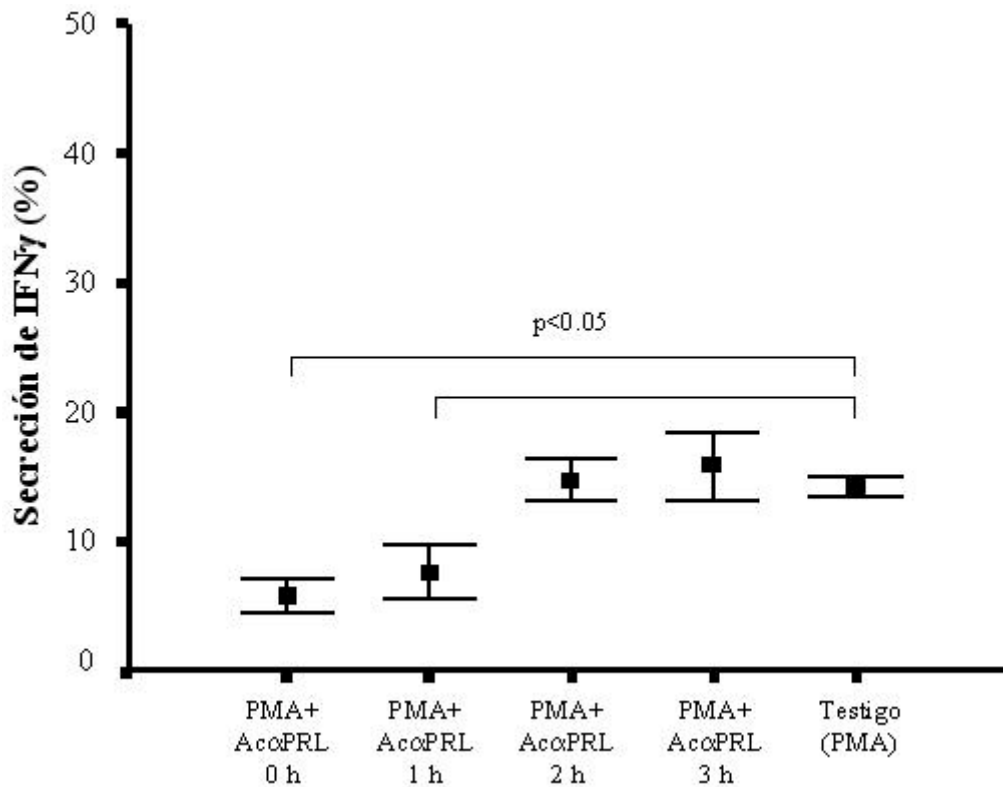


Figura 17. Cinética de secreción de IFN γ . Linfocitos T CD4⁺ se incubaron en presencia de PMA-ionomicina más anticuerpo anti-PRL el cual se colocó en el cultivo al tiempo 0h, 1h, 2h y 3h, las células se cosecharon, permeabilizaron, marcaron y determinaron por inmunofluorescencia (citometría de flujo). La grafica muestra la media más desviación estandar de 6 muestras provenientes de personas sanas.

En la figura 18 se muestra la presencia de inmunoglobulinas en sobrenadantes de células mononucleadas. La producción de inmunoglobulinas al incubar con mitógeno más prolactina no presentó diferencia estadísticamente significativa con respecto a las incubadas con mitógeno (testigo). Sin embargo, se puede apreciar una tendencia a aumentar la producción de inmunoglobulinas al co-incubar con prolactina (Figura 18).

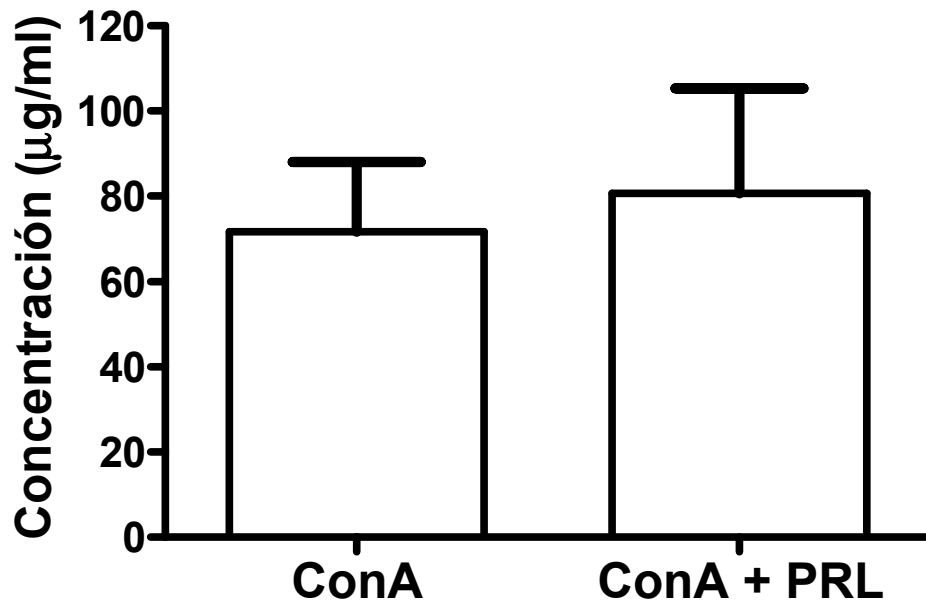


Figura 18. Presencia de anticuerpos en sobrenadantes de células mononucleares Células mononucleares se incubaron durante 7 días con ConA o ConA más prolactina, la determinación de anticuerpos se realizó en los sobrenadantes por la técnica de ELISA. La grafica muestra la media más desviación estándar

DISCUSIÓN.

La respuesta inmune presenta diferentes mecanismos de regulación entre los que se encuentran los propios a través de factores de comunicación celular como las interleucinas o bien el externo como el sistema nervioso y endocrino (neuroendocrino). El sistema endocrino puede ser regulado a través de interleucinas, por ejemplo; se ha demostrado que las células de la hipófisis expresan receptores para citocinas que directa o indirectamente testigoan la secreción de varias hormonas, en particular; prolactina, hormona del crecimiento, ACTH, a su vez las células del sistema inmune expresan receptores para hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos. La expresión varía entre los distintos tipos celulares presentando pleiotropismo, estableciéndose así una comunicación directa entre el sistema inmune y el neuroendocrino [Roitt y col., 1996; Berczi 1997] que se manifiesta en los trabajos realizados por Berczi y Nagy (1978; 1983) que proporcionaron las primeras evidencias de la intervención de la prolactina en la respuesta inmune de roedores. Actualmente se sabe que los linfocitos expresan el receptor de prolactina el cual pertenece a la familia de receptores hematopoyéticos y la producción de prolactina que originalmente fue identificada en la hipófisis, también es sintetizada y secretada por otros órganos como la glándula mamaria, próstata, células epiteliales y del sistema inmune entre otras.

Basados en reportes previos donde el mRNA de prolactina y su receptor se expresa en líneas celulares derivadas de células T como Jurkat, Molt 4 y Hut [Sabharwal y col., 1992; Wu y col., 1996; Montgomery 2001], nosotros confirmamos la presencia de la prolactina en células mononucleadas de forma constitutiva, ya que células en estado basal (sin activar) presentan prolactina intracitoplásmica, al igual que la expresión del mRNA. El presente trabajo demostró que la prolactina intracitoplásmica (prolactina constitutiva) es secretada por las células mononucleadas al ser estimuladas con un estímulo inespecífico (mitógeno). Apoyado con nuestros resultados que muestran la presencia de prolactina en los sobrenadantes de las células mononucleadas estimuladas a diferentes tiempos.

Nuestros resultados muestran que distintas concentraciones de prolactina sola no estimulan a las células mononucleadas a proliferar o activarse, lo cual concuerda con resultados obtenidos por otros autores como Jurcovicova (1997) quien no encontró proliferación en linfocitos humanos con

prolactina no glicosilada (23 kDa) y/o glicosilada (25 kD) o Viselli (1991) quien tampoco fue capaz de inducir proliferación en esplenocitos de ratas sanas y ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol. A pesar de que en líneas celulares de linfocitos T inmaduros como las células Nb2 y timocitos se ha reportado que la prolactina induce proliferación [Lin y col., 1997; Horiguchi 2004]. Lo anterior sugiere que la prolactina no tiene la capacidad de inducir proliferación en linfocitos maduros o bien que la diferencia entre inducir proliferación celular o no en líneas celulares, timocitos y células mononucleadas se puede deber al grado de madurez celular. Sin embargo, nuestros resultados muestran que existe un efecto sinérgico en los ensayos de proliferación al estimular las células mononucleadas con ConA más PRL con respecto al grupo testigo (solo estimuladas con mitógeno), este incremento fue estadísticamente significativo lo que también concuerda con lo reportado previamente [Mater 1996]. Este fenómeno pudiera explicarse por los hallazgos de Montgomery (1998) quien encontró una rápida fosforilación del complejo TCR/CD3 al incubar las células con ConA más PRL y Alfonso (2001) quien descubrió un incremento en la entrada de calcio al estimular con DMS a linfocitos T pre-incubados con prolactina incrementando la proliferación celular. Estas dos evidencias: a) el incremento en la entrada de calcio y b) fosforilación de complejo TCR/CD3 pudiera ser la causa del efecto sinérgico de la prolactina en la proliferación celular. Lo cierto es que al bloquear la prolactina autócrina con un anticuerpo anti-PRL se encontró una disminución de la proliferación celular similar a lo reportado por Hartmann (1989).

Además de tener un efecto sinérgico en el proceso de proliferación la prolactina puede incrementar la secreción de anticuerpos, Richards (1998) reportó un aumento en la secreción de anticuerpos y proliferación en hibridomas estimulados con prolactina, nuestros resultados demuestran que existe una tendencia al incremento de la producción de anticuerpo por células estimuladas con ConA más prolactina. Sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. Estas evidencias demuestran que en líneas celulares la prolactina induce proliferación celular y secreción de anticuerpos. En contraste, en las células mononucleadas humanas la prolactina no tiene la capacidad de inducir proliferación celular pero si de potencializar este efecto, además de intervenir en el proceso de proliferación celular.

El proceso de activación tanto de linfocitos T como B es diferente al de proliferación . A pesar que

ambos inician de manera similar, la primer señal, es la unión TCR–MHC, la segunda es la interacción entre moléculas coestimuladoras como CD40-CD154 y CD28-CD80/CD86 lo que se manifiesta con cambios en las moléculas de superficie, incrementándose la expresión de CD69, CD25, CD154, FAS-L y CD44 que son necesarios para iniciar el ciclo celular [Moreno, 1996; Janeway, 2005].

Se sabe que la prolactina interviene en el proceso de proliferación, sin embargo, no existe suficiente evidencia de la participación de la prolactina en el proceso de activación, por lo que decidimos investigar si la prolactina participa en este proceso mediante la expresión de marcadores de activación y moléculas coestimuladoras. La expresión de CD69 se considera un marcador de activación temprana, su expresión comienza a las 4 h y su expresión máxima es a las 18 h [Testi y col. 1994, Sancho, 2005]. Nuestros resultados prueban que la prolactina no tiene la capacidad de inducir o actuar como co-mitógeno en el proceso de activación celular (expresión CD69), ya que al estimular los linfocitos T CD4⁺ con prolactina o ConA más prolactina no se afectó la expresión de CD69. Sin embargo, la prolactina autócrina interviene en el proceso de activación celular ya que al bloquear la prolactina (linfocitos con ConA más anticuerpo anti-prolactina) la expresión de CD69 disminuyó. Para comprobar que esta disminución es debida a la falta de prolactina en el proceso de activación (PRL capturada por el anticuerpo), se bloqueó el sitio activo del anticuerpo lo que restableció la expresión de CD69 (la activación celular), además de que la expresión de esta molécula no se modificó al incubar con un anticuerpo no relacionado.

CD154 es una molécula coestimuladora que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) se expresa principalmente en linfocitos T CD4⁺ y es inducida por la interacción TCR-MHC, su regulación depende de las señales dadas por IL-2. La interacción CD154-CD40 regulan la expresión de CD80/CD86 en las células presentadoras de antígeno, estas interacciones inician la activación celular para posteriormente montar una respuesta inmune [Jaiswal y col., 1997; Skov y col., 2000; Quezada, 2004; Greenwald, 2005]. En este trabajo exploramos la expresión de CD154 en linfocitos estimulados con PMA-ionomicina con o sin prolactina. Aunque la expresión de esta molécula no se vio afectada al estimular con el mitógeno más prolactina con respecto a las estimuladas con el mitógeno, el bloqueo de la prolactina secretada por los linfocitos con un anticuerpo anti-prolactina disminuyó la expresión de CD154, similar a los resultados encontrados

con CD69. Nuestros resultados prueban que la prolactina por si sola no induce ni actúa como co-mitógeno en el proceso de activación celular de las células T CD4⁺. Sin embargo la prolactina autócrina es importante para que se lleve a cabo un adecuado proceso de activación celular.

La prolactina autócrina secretada por las células actúa dentro de las primeras horas en el proceso de activación, ya que la disminución en la expresión de CD69 y CD154 se encontró al colocar el anticuerpo al principio de la estimulación o una hora después, mientras que cuando es agregado dos o tres horas posteriores a la activación la expresión de las moléculas no se afectó.

La expresión de CD40 o CD86 en los linfocitos B no se modificó al incubar con prolactina o al bloquear la prolactina autócrina (por el anticuerpo) concordando con lo obtenido por Gala (1997), quien no encontró aumento en la expresión de CD86 con PRL hipofisiaria pero si con la recombinante, probablemente debido a la contaminación con endotoxina la cual induce activación celular. Estos resultados aunados a los nuestros indican que la prolactina autócrina no interviene en la activación de los linfocitos B. Aunque existen reportes donde la prolactina es importante en los linfocitos B murinos durante el proceso de maduración [Morales y col. 1999].

La estimulación de las células con mitógeno más prolactina mostró un efecto sinérgico en la proliferación celular. Efecto que no se reprodujo en el proceso de activación medido a través de la expresión de CD69, CD154, CD86 y CD40. Sin embargo, la expresión de CD69 y CD154 depende de la prolactina secretada por los propios linfocitos, lo que es sustentado por el hecho de que se encontró prolactina en los sobrenadantes de las células estimuladas, sugiriendo que la prolactina secretada por las células actúa de forma autócrina y que la prolactina proveniente de otras fuentes (hipofisiaria) no es necesaria en este proceso de activación. Desde el punto de vista clínico es sustentado por el hecho que los linfocitos provenientes de pacientes hiperprolactinémicos (niveles séricos de PRL de más de 20 ng/ml) en estado basal no mostraron aumento en la expresión de CD69, CD154, CD40, CD86 y su activación celular fue similar a la de los linfocitos provenientes de personas sanas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Leite-de-Moraes (1995) y Koller (1997) quienes no encontraron cambios en la población de linfocitos T CD4⁺, B y macrófagos, así como en el proceso de fagocitosis al comparar estos pacientes con personas sanas. Los eventos tempranos detectados en el linfocito después de la presentación del antígeno y unión de moléculas coestimuladoras es la secreción de citocinas, las cuales modulan las funciones

subsecuentes de los linfocitos, a través de la transcripción de nuevos genes y síntesis de proteínas. La principal citocina producida por los linfocitos T es la IL-2 que funciona como factor de crecimiento y diferenciación [Abbas y col., 2000; Janeway, 2005]. En la literatura existen reportes de que la prolactina tiene la capacidad de aumentar la actividad de la IL-2 [Jurcovicova y col., 1997], la producción de interferón en linfocitos humanos incubados en presencia de PHA [Cesario y col., 1994] y la secreción de IFN γ por células NK [Matera y col., 1999, Matera y col., 2000]. Estos datos no concuerdan con nuestros resultados, en los cuales al igual que con las moléculas coestimuladoras la producción de IL-2 e IFN γ , no aumentó en los linfocitos T CD4⁺ incubados con prolactina o mitógeno más prolactina, esta diferencia podría posiblemente deberse a que no trabajamos con células NK y/o a la utilización de prolactina recombinante (contaminada con endotoxinas) por estos investigadores [Gala 1997]. Al igual que la expresión de CD69 y CD154, la secreción de IL-2 e IFN γ disminuye cuando la prolactina endógena es bloqueada por el anticuerpo anti-prolactina, confirmando que la prolactina autócrina es importante para que se lleve a cabo un buen proceso de activación celular el cual se observa por la expresión de CD69 CD154 y producción de IL-2 e IFN γ . IFN γ induce la activación de STAT1, iniciando la transcripción del gen IRF-1 (factor regulador de interferón 1) el cual regula distintos genes que modulan la proliferación, diferenciación y activación celular en linfocitos [Zhu col., 1999; Yu-Lee 2001], la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 requiere la presencia de STAT5a [Nakajima y col., 1997; Moriggl y col., 1999; Zhu y col., 1999], se sabe que la prolactina activa a STAT1 y STAT5a [Clevenger y col., 2001; Yu-Lee, 2002], lo que se pudiera explicar porque es importante la presencia de la prolactina secretada por las células en el proceso de activación y secreción de interleucinas.

Por lo que sugerimos que el mecanismo de acción de la prolactina en el proceso de activación de los linfocitos es el siguiente. La prolactina se encuentra en forma constitutiva en las células mononucleadas, al ser estimuladas secretan prolactina que se une a su receptor de forma autócrina. La unión PRL – R-PRL fosforila a JAK2, el cual a su vez fosforila STAT5. En forma simultánea la fosforilación de JAK1 por la unión de IL2 con su receptor termina fosforilando STAT5. La unión de ambas vías de fosforilación a STAT5, dan como resultado una óptima activación que se manifiesta por la expresión de CD69 y CD154 y en la secreción de IL2 e IFN γ por los linfocitos T (figura 19).

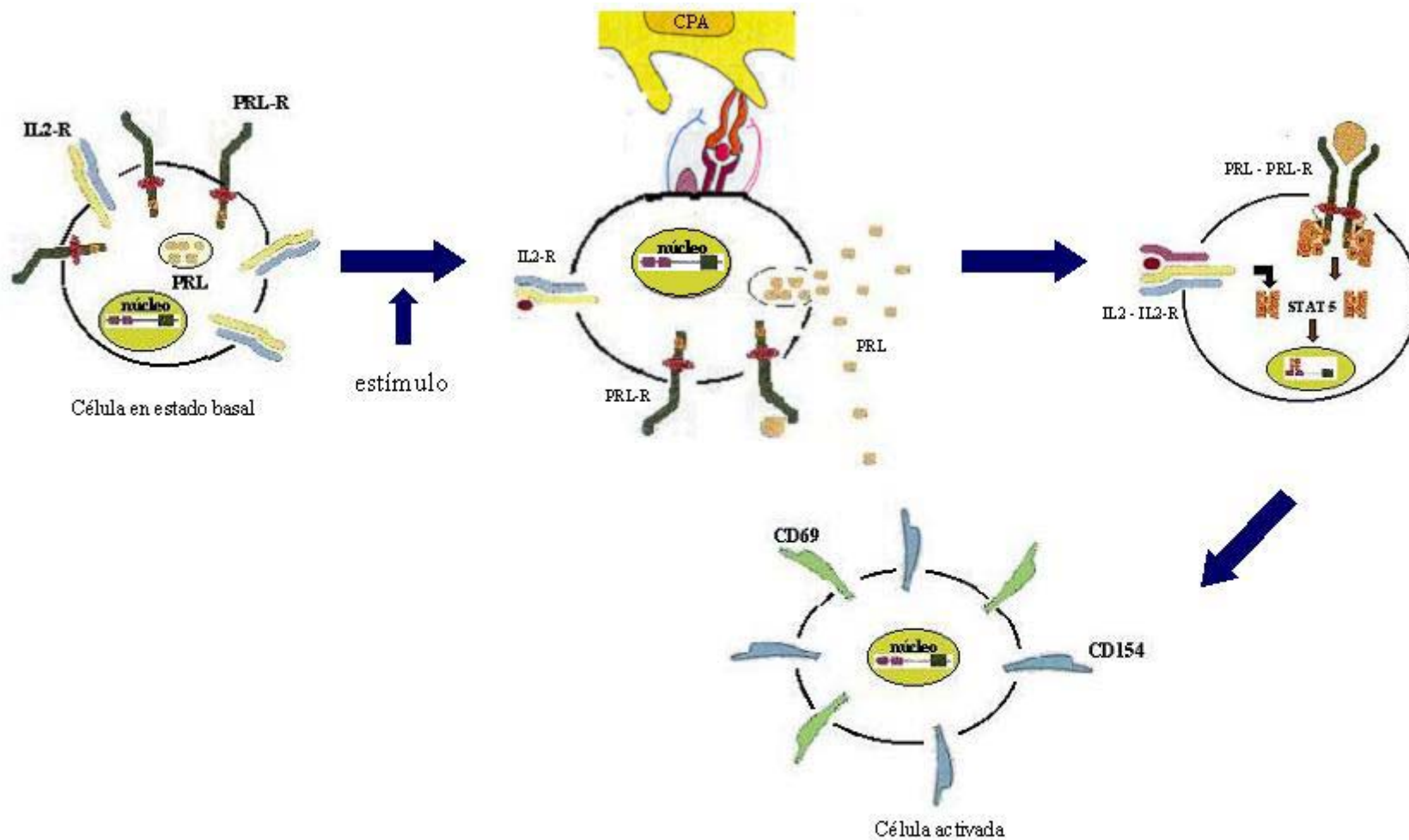


Figura 19. Esquema que representa la propuesta del papel de la prolactina en el proceso de activación celular. La prolactina constitutiva que se encuentra en citoplasma es secretada por las células mononucleadas posterior a la estimulación, la prolactina se une a su receptor iniciando la fosforilación de JAK2, que a su vez fosforila STAT5 el cual se dimeriza, penetra al núcleo y se une a promotores comenzando la expresión de distintos genes. La unión de IL2 a su receptor también inicia la cascada de fosforilación de STAT5: La unión de de las dos vías de fosforilación de STAT5 (IL2 y PRL) dan como resultado un óptimo proceso de activación.

CONCLUSIONES.

La prolactina participa en el proceso de proliferación celular con un efecto sinérgico, efecto que se ve disminuido al bloquear la prolactina secretada por los linfocitos, lo que sugiere que la función de la prolactina linfocitaria es predominantemente autócrina y como un factor mas de crecimiento.

La prolactina producida y secretada por las células mononucleadas participa en el proceso de activación de los linfocitos T CD4⁺ ya que al bloquearla disminuye la expresión del marcado de activación CD69 y molécula coestimuladora CD154. Sin embargo, no participa en la activación de los linfocitos B.

La prolactina solo actúa una vez que se ha establecido el estímulo que dispara el proceso de activación por lo que la prolactina proveniente de diferentes fuentes (origen hipofisiario) a la del sistema inmune no es necesaria en la activación celular o bien tendría una función redundante, es por lo anterior que los linfocitos provenientes de pacientes hiperprolactinéMICOS presentan una activación de la respuesta inmune similar a la de los linfocitos provenientes de personas sanas.

ANEXO

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION.

Titulo del estudio: Papel de la prolactina en el proceso de activación de linfocitos T y B.

OBJETIVO.

Determinar el papel de la prolactina en proceso de activación de linfocitos T y B, a través de la expresión de moléculas coestimuladoras, secreción de interleucinas y producción de anticuerpos

PROCEDIMIENTO.

Si consiento en participar sucederá lo siguiente:

1. Responderé a preguntas sobre mi historia clínica, que durarán aproximadamente 15 minutos.
2. Revisaran mi expediente clínico.
3. Me extraerán sangre (18 ml aproximadamente) del brazo con una aguja, para hacer análisis de prolactina y otros.

BENEFICIOS Y RIESGOS

Es posible que se produzca beneficio relativo, los resultados de la investigación se anexaran a su expediente para uso del médico tratante. La toma de muestra es la habitual para determinar hormonas en sangre (la aguja a veces produce una molestia que dura menos de un minuto, en ocasiones se produce un hematoma, pero esto ocurre con muy poca frecuencia), no se harán otros procedimientos más que la toma de sangre, por lo que no presenta mayor riesgo.

CONFIDENCIALIDAD.

Los resultados de las pruebas de laboratorio se enviaran a mi médico tratante (a menos que yo manifieste lo contrario). Con excepción de esta revelación, toda la información obtenida en este estudio será considerada confidencial y será usada solo a efectos de la investigación.

DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR.

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o abandonarlo en cualquier momento, sin afectar ni poner en peligro mi atención médica futura.

CONSENTIMIENTO.

Consiento en participar en este estudio, he recibido una copia de este impreso y he tenido la oportunidad de leerlo.

NOMBRE (firma) _____

TESTIGO (firma) _____

TESTIGO

(firma) _____ FECHA _____

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

NOMBRE:	_____	FECHA	_____
MATRICULA	_____	CLINICA DE ADSCRIPCION	_____
EDAD	_____ AÑOS	SEXO: FEMENINO ()	MASCULINO ()
DOMICILIO	_____		
TELEFONO	_____	N° PROGRESIVO	_____

MENARCA	_____ AÑOS	FUM	_____ AÑOS	RITMO	_____ X _____	DIAS	
GESTA	_____	PARA	_____	ABORTOS	_____	CESAREAS	_____
PLANIFICACION FAMILIAR: NO () SI () ESPECIFIQUE _____							
EMBARAZO ACTUAL: NO () SI () SEMANAS DE EMBARAZO _____							
LACTACION: NO () SI () TIEMPO _____							

MEDICAMENTOS TOMADOS EN LOS ULTIMOS 15 DIAS:		
1.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
2.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
3.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
4.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
5.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
6.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
7.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
8.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____
9.	_____	DOSIS _____ MOTIVO _____

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

NOMBRE:	_____	FECHA	_____
MATRICULA	_____	CLINICA DE ADSCRIPCION	_____
EDAD	_____ AÑOS	SEXO: FEMENINO ()	MASCULINO ()
DOMICILIO	_____		
TELEFONO	_____	N° PROGRESIVO	_____

MENARCA	_____ AÑOS	FUM	_____ AÑOS	RITMO	_____ X _____	DIAS	
GESTA	_____	PARA	_____	ABORTOS	_____	CESAREAS	_____
PLANIFICACION FAMILIAR: NO () SI () ESPECIFIQUE _____							
EMBARAZO ACTUAL: NO () SI () SEMANAS DE EMBARAZO _____							
LACTACION: NO () SI () TIEMPO _____							

MANIFESTACIONES CLINICAS

1. DESARROLLO SEXUAL SECUNDARIO COMPLETO	SI () NO ()
2. GALACTORREA	NO () SI () TIEMPO DE EVOLUCION _____
3. AMENORREA	NO () SI () TIEMPO DE EVOLUCION _____
4. OTRAS ALTERACIONES GINECOLOGIAS	() MIOMAS
	() OVARIOS POLIQUISTICOS
	() CACU
	() OTROS

MEDICAMENTOS TOMADOS EN LOS ULTIMOS 15 DIAS:

1. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
2. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
3. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
4. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
5. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
6. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
7. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
8. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____
9. _____	DOSIS _____	MOTIVO _____

COMENTARIOS

GLOSARIO.

PRL	Prolactina.
PRL-R	Receptor de prolactina.
aa	Aminoácidos.
IL	Interleucinas.
CMN	Células mononucleares.
Ac	Anticuerpo.
HPRL	Hiperprolactinemia.
HLA	Antígeno leucocitario humano.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
IFNγ	Interferon gamma.
kDa	Kilodantones
mRNA	Mensajero de RNA.
IRMA	Ensayo inmunoradiométrico.
ConA	Concanavalina A.
SLEDAI	Índice de actividad de lupus eritematoso sistémico.

BIBLIOGRAFIA.

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober J. Cellular and Molecular Immunology. W.B: Saunders company. 4th ed. United States of America. 2000. pp. 163,164,171-175,239-241,255-260.
2. Abe K, Takasaki Y, Ushiyama C, Asakawa J, Fukazawa T, Hirashima M, Ogaki M, Hashimoto H. Expression of CD80 and CD86 on peripheral blood T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Immunol.* 1999. 19:58-66.
3. Alfonso A, Botana MA, Vieytes MR, Botana LM. Prolactin induces calcium influx and release from intracellular pools in human T lymphocytes by activation of tyrosine kinases. *Cell Signal.* 2001. 13:819-826.
4. Berczi I. Pituitary hormones and immune function. *Acta paediatr. Suppl.* 1997. 423:70-75.
5. Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, Leños-Miranda A. Association Between Prolactin and Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. Influence of Statical Power. *J. Rheumatol.* 1999. 26: 55-59.
6. Bluestone JA, Khattri R, van Seventer GA. Accesory Molecules. IN: Paul William. *Fundamenta immunology.* Lippincott-Raven publishers, Philadelphial Pa. USA. 1998. pp.449-459
7. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrinol. Rev.* 1998. 19:225-268.
8. Buskila D, Berezin M, Gur H, Lin HC, Alosachie I., Terryberry JW., Barka N., Shen B., Peter JB Shoenfeld Y. Autoantibody profile in the sere of women with hyperprolactinemia. *J. Autoimmun.* 1995. 8: 415-425.
9. Cesario T, Yousefi S, Carandag G, Sadati N, Le J, Vaziri N. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. *P.S.E.B.M.* 1994. 205:89-95.
10. Clevenger CV, Freier DO, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction in cell of the immune system. *J. Endocrinol.* 1998. 157: 187-197.
11. Clevenger CV, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus.* 2001. 10:706-718.

12. Damle NK, Linsley PS, Ledbetter JA. Direct helper T cell-induced B cell differentiation involves interaction between T cell antigen CD28 and B cell activation antigen B7. *Eur. J. Immunol.* 1991 21:1277-1282
13. Dardenne M, Leite de Moraes MC, Kelly PA, Gagnerault MC. Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytofluorometry. *Endocrinol.* 1994. 134:2108-2114.
14. Denfeld RW, Kind P, Sontheimer RD, Schöpf E, Simon J. In situ expression of B7 and CD28 receptor families in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism.* 1997. 40: 814-821.
15. DiMattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology.* 1988. 122:2508-2517.
16. Ding L, Green JM, Thompson CB, Shevach E. B7/CD28 dependent and independent induction of CD40 ligand expression. *J. Immunol.* 1995. 155:5124-5132.
17. Early GS, Zhao W, Burns CM. Anti-CD40 ligand antibody treatment the development of lupus like nephritis in a subset of New Zealand black x New Zealand white mice. Response correlates with the absence of anti anti-antibody response. *J Immunol.* 1996. 157: 3159-3164.
18. Fernández-Gutiérrez B, de Miguel S, Morado C, Hernández-García C, Bañares A, Jover JA. Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1998. 7: 314-322.
19. Freeman M, Kanycska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 2000. 80:1523—1587.
20. Gala RR, Shevach EM. The immunomodulatory effects of a recombinant bovine Prolactin (rbPRL) are secondary to endotoxin contamination. *FASEB. J.* 1997 11:A99 (abstract #581).
21. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005. 23:515-48
22. Hartmann DP, Holaday JW, Bernton EW. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB. J.* 1989. 3: 2194-2202.
23. Horiguchi K, Yagi S, Ono K, Nishiura Y, Tanaka M, Ishida M, Harigaya T. Prolactin gene expression in mouse spleen helper T cells. *J Endocrinol.* 2004. 183:639-46.

24. Ishikawa S, Akakura S, Abe M, Terashima K, Chijiwa K, Nishimura H, Hirose S, Shirai T. A subset of CD4⁺ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance. *J. Immunol.* 1998. 161: 1267-1273.
25. Jaiswal A, Croft M: CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cell. *J. Immunol.* 1997. 159:2282-2291.
26. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology*. Garland Science. 6th ed. New York, NY. USA and London UK. 2005. pp 321-342, 367-387, 747
27. Jurcovicova J, Krueger KS, Rokyta R. Effect of glycosylated and non-glycosylated prolactin on the proliferation of normal lymphocytes. *Physiol. Res.* 1997. 46:199-201.
28. Keir ME, Sharpe AH. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005.204:128-43
29. Koller M, Kotzmann H, Clodi M, Riedl M, Luge A. Effect of elevated serum prolactin concentrations on the immunophenotype of human lymphocytes, mitogen-induced proliferation and polymorphonuclear cells. *Eur. J. Clin. Invest.* 1997. 27:662-666
30. Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley AR. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology.* 2003. 144:2102-10.
31. Larrea F, Martínez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Queipo G, Cariño C, and Alarcón-Segovia D. 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. *JCE & M* 1997. 82: 3664-3668.
32. Leños A, Pascoe D, Fraga A, Blanco-Favela F. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. *Lupus.* 1998. 7:398-403.
33. Leite-de-Morales MC, Touraine P, Kelly PA, Kuttann F, Dardenne M. Prolactin receptor expression in lymphocytes from patients with hyperprolactinemia or acromegaly. *J. Endocrinol.* 1995. 147:353-359.
34. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Ann. Rev. Immunol.* 1996. 14: 233-258.
35. Licastro F, Davis L, Morini M. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *Int. J. Biochem.* 1993;25:845-852.

36. Lin B, Kinoshita Y, Hato F, Tsuji Y. Enhancement of thymic lymphocyte proliferation by the culture supernatant of thymus epithelial cells stimulated by prolactin. *Cell. Mol. Biol.* 1997. 43:361-367.
37. Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1979;135:751-755.
38. Matera L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of Prolactin on immune cells. *Life Sci.* 1996. 59:599-614.
39. Matera L. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *NeuroImmunol. Modulation* 1997. 4:171-180.
40. Matera L, Contarini M, Bellone G, Forno B, Biglino A. Up-modulation of interferon- γ mediates the enhancement of spontaneous cytotoxicity in Prolactin-activated natural killer cells. *Immunol.* 1999.98:386-392.
41. Matera L, Galetto A, Geuna M, Vekemans K, Ricotti, Contari M, Moro F, Basso G. Individual and combined effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prolactin on maturation of dendritic cells from blood monocytes under serum-free conditions. *Immunol.* 2000a. 100:29-36
42. Matera L, Mori M. Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann. N Y Acad Sci.* 2000. 917:505-513.
43. McMurray R, Keisler D, Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1979;135:751.
44. McMurray R, Keisler D, Kanuekel K, Izui S, Walker SE. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J. Immunol.* 1991;147:780-787.
45. Montgomery DW, Zukoski CF, Shah GN, Buckley AR, Pacholczyk T, Russell DH. Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987;145:692-698.
46. Montgomery DW, Krumenacker Joshua S, Buckley Arthur R. Prolactin stimulates phosphorylation of the human T-cell antigen receptor complex and ZAP-70 tyrosine kinase: A potential mechanism for its immunomodulation. *Endocrinology.* 1998. 139:811-814.
47. Montgomery DW. Prolactin production by immune cells. *Lupus.* 2001. 10:665-675.

48. Morales P, Carretero MV, Jerónimo H, Copin SG, Gaspar ML, Marcos MA, Martín-Perez J. Influence of Prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell Growth Differentiation*. 1999. 10:583-590.
49. Moreno Rodríguez J. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. Grupo Noriega eds, México. 1996. pp.48, 58, 64
50. Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, McKay C, Wang D, van Deursen J, Bunting KD, Grosveld GC, Jhle JN. Stat 5 is required for IL2 induced cell cycle progression of peripheral T cell. *Immunity*. 1999 10:249-259.
51. Mukherjee P, Mastro M, Hymer WC. Prolactin induction of interleukin-2 receptors on rat splenic lymphocytes. *Endocrinology*. 1990; 126:88-94.
52. Nagy E, Berci I. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol*. 1978; 89:530-537
53. Nagy E, Berci I, Wren GE, Asa SL, Kovacs K. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 1983;6:231-243.
54. Nakajima H, Liu X, Wynshaw-Boris A, Rosenthal LA, Imada K, Finbloom DS, Hennighausen L, Leonard W. An indirect effect of stat5a in IL2-induced proliferation: a critical role for stat5a in IL2 mediated IL2 receptor α chain induction. *Immunity*. 1997. 7:691-701.
55. Neidhart M. Prolactin in autoimmune diseases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1998. 217: 408-419.
56. Nicoll CS, Maye GL, Russell SM. Structural features of prolactin and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrinol. Rev*. 1986; 7:169-2039.
57. Paukku K, Silvennoinen O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine & Growth Factor Rev*. 2004. 15:435-455.
58. Perrin PJ, Davis TA, Smoot DS, Abe R, June CH, Lee P. Mitogenic stimulation of T cells reveals differing contributions for B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulation. *Immunol*. 1997. 90:534-542.
59. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2004. 22:307-28.
60. Richards SM, Garman RD, Keyes L, Kavanagh B, McPherson JM. Prolactin is an antagonist of TGF- β activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol*. 1998. 184:85-91.

61. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Mosby company. 4th ed. Londres UK. 1996. pp. 11.6-11.7
62. Rosen SW, Weintraub BD, Aaronson SA. Non-random ectopic protein production by malignant cells: Direct evidence in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980;50:834-841.
63. Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, Kooijman R, Kutz L, Kelley KW, Malarkey WB. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: An autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992. 89:7713-7716.
64. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005 26:136-40
65. Skov S, Bonyhadi M, Odum N, Ledbetter J. IL2 and IL15 regulate CD154 expression on activated CD4 T cells. *J. Immunol.* 2000. 164:3500-3505.
66. Smith PE. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anac. Rec.* 1930: 47:119-129.
67. Spangelo BL, Leod RM. The role immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol. Metab.* 1990; 1:408-412.
68. [Sporri B](#), [Kovanen PE](#), [Sasaki A](#), [Yoshimura A](#), [Leonard WJ](#). JAB/SOCS1/SSI-1 is an interleukin-2-induced inhibitor of IL-2 signaling. *Blood.* 2001. 97:221-6.
69. Su CC, Shau WY, Wang CR, Chuang CY, Chen CY. CD69 to CD3 ratio of peripheral blood mononuclear cells as a marker to monitor systemic lupus erythematosus disease activity. *Lupus.* 1997. 6: 449-454.
70. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today.* 1994. 15: 479-483
71. Theas MS, De Laurentis A, Lasaga M, Pisera D, Duvilanski BH, Seilcovich A. Effect of lipopolysaccharide on tumor necrosis factor and prolactin release from rat anterior pituitary cells. *Endocrine.* 1998. 8: 241-245.
72. Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B1- and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell.* 1995. 81:979-982.
73. Too C. Induction of Sp1 activity by Prolactin and interleukin-2 in Nb2 T cells: differential association of Sp1-DNA complexes with stats. *Mol. Cell Endocrinol.* 1997. 129:7-16

74. Troung AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO*. 1984. 3:429-437
75. Viselli S, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. Prolactin induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991. 129:983-990.
76. Wu H, Devi R, Malarkey W. Expression and localization of Prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology*. 1996. 137:349-353.
77. Wesemann D, Dong YD, O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN. Supreso of cytokine signaling 1 inhibits cytokine induction of CD40 expression in macrophages. *J. Immunol*. 2002. 169:2354-2360.
78. Yu-Lee LY. Molecular Actions of Prolactin in the Immune System. *P.S.E.B.M*. 1997. 215:35-52.
79. Yu-Lee LY. Stimulation of interferon regulatory factor-1 by Prolactin. *Lupus*. 2001. 10:691-99. *Recent Prog Horm Res*. 2002. 57:435-55.
80. Yu-Lee LY. Prolactin Modulation of Immune and Inflammatory Responses. *Recent Prog Horm Res*. 2002. 57:435-55.
81. Zhu M, John S, Berg M, Leonard WJ. Funtional Association of Nmi with stat5 and stat1 in IL2 and IFN γ mediated signaling. *Cell*. 1999. 96:121-30.

Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes

Karina Chavez-Rueda^a, Jesús Hernández^b, Edgar Zenteno^b, Alfredo Leños-Miranda^a,
Ma Victoria Legorreta-Haquet^a, Francisco Blanco-Favela^{a,*}

^aLaboratorio de Auto-inmunidad, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", IMSS. Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores PO Box: 73-032, CP: 03020 IMSS. México, D.F., México

^bDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F., México

Received 8 October 2004; accepted with revision 21 March 2005

Available online 28 April 2005

Abstract

We investigate the immunomodulator role of prolactin (PRL) on CD4⁺ and B cell activation from healthy subjects in comparison with hyperprolactinemic patients. Peripheral blood mononuclear cells, CD4⁺ or B cells, purified, were cultured under different conditions, as follows: with mitogen, without stimulus, with different concentrations of human PRL, with unspecific mitogen plus PRL, or with antibodies against PRL. The results revealed that PRL is produced by lymphocytes, the expression of CD69 and CD154 molecules, and interleukin secretions depend partially on the autocrine PRL, this is supported by the findings that secretions of IL-2, IFN γ , and co-stimulatory molecule expression were markedly reduced when autocrine PRL was blocked with anti-PRL antibodies. Furthermore, PRL activity was only observed during the first 2 h after activation. In contrast, B cell culture did not show any alteration by adding or blocking PRL in the expression of CD40 and CD86 in both groups: healthy subject and hyperprolactinemic patients.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Prolactin; CD69; CD154; CD40; CD86; Hyperprolactinemia; Immunomodulatory; Cell activation; IL-2; IFN γ

Introduction

Communication between cells is mediated by endocrine, nervous, and immune systems, which constitute an interlocking network. Several evidences have shown that the neuro-endocrine peptide hormone, prolactin (PRL), participates in the immune response. PRL is mainly synthesized by the anterior pituitary. However, the decidua, breast, and the lymphocytes [1–4] are also capable of synthesizing this hormone. Structural analysis of the PRL receptor has demonstrated that it is related to the cytokine/hematopoietin family, like the growth hormone (GH), erythropoietin,

granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), and some interleukins (IL), such as IL-2 to IL-7, IL-9, IL-13, and IL-15 [5]. The receptor for PRL is also present in T- and B-lymphocytes and macrophages [6–9]. Excess prolactin (hyperprolactinemia) can be caused by diverse conditions, which can be divided into three groups: physiological (pregnancy), drugs (metoclopramide), and disease (prolactinomas and chronic renal failure). Hyperprolactinemia in women can cause irregular menses, galactorrhea, hypogonadism, and infertility. In contrast, clinical manifestations in men are widely variable and include decreased libido, impotence, and infertility [10]. Recently, it has been described that some hyperprolactinemic patients develop autoimmune rheumatic diseases [11] and some women develop natural autoantibodies during

* Corresponding author.

E-mail address: fblanco1@terra.com.mx (F. Blanco-Favela).

pregnancy probably due to the hyperprolactinemic state [12], suggesting a strong PRL participation in immune system activation.

Other evidences about PRL's role in the immune system are: in vitro, PRL acts as a co-mitogen for T, B, and NK cells in both human [13–16] and mice [17,18], independently from stimulation with antigen and/or mitogen. In NZB/W mice, which display a disease similar to systemic lupus erythematosus (SLE), implants of syngenic pituitary glands induce a hyperprolactinemic state, resulting in accelerated autoimmunity and early mortality [19,20] that can be improved with bromocriptine treatment [20]. In humans, clinical trials have shown that a subset of SLE patients course with hyperprolactinemia during disease activity [21,22]. In contrast, hypophysectomized rats decreased responses to both red blood cells and *Escherichia coli* lipopolysaccharides, which can be restored by the administration of exogenous PRL, but not with other pituitary hormones [23], suggesting that PRL's low levels are associated with immunodeficiency.

The adaptive immune response is a complex process, in which activation of the immune cells is fundamental. The process is initiated by antigen presentation of antigenic peptides bound to class I or II MHC molecules by professional antigen-presenting cells (APC) [24]. Then the antigen is recognized by the T cell receptor (TCR) who dictates antigen specificity and plays a central role in initiating T cell activation [24]. However, this interaction, by itself, is not sufficient to fully activate naive T cells. Thus, for virgin T cell activation, subsequent non-antigen-specific co-stimulatory signals are necessary to trigger cytokine gene expression. The best-known co-stimulatory signal for T cells is provided by the interaction of CD28 on the T cell with the members of the B7 family (CD80 and CD86) on the APC. On the other hand, B cells and other antigen-presenting cells are also targets of co-stimulatory signals, mainly received through the CD40 receptor after engagement by its ligand CD154 (CD40L) on activated T cells. This signal promotes growth, differentiation, survival, and isotype switching on B cells. A third type of signal with a crucial role in T and B cell activation is mediated through binding of soluble cytokines to their respective receptors [25,26]. To further define the participation of prolactin in the mechanism of immune cell response activation, cells from two different sources were studied: (a) from hyperprolactinemic patients with high serum levels of prolactin at the moment the samples were taken and (b) from healthy humans with normal serum levels of PRL. Cells were in vitro cultivated under different stimuli to recreate different levels of PRL at the moment that cell activation is achieved. The markers for CD4⁺ T cell activation were the expression of co-stimulatory molecules, such as CD69, CD154, and cytokine secretions; CD86, CD40, and immunoglobulin production were used as markers of B cell activation.

Materials and methods

Patients

The criteria of five idiopathic hyperprolactinemia patients were high PRL serum level (>20 ng/ml) plus menstrual disorder and galactorrhea without any evidence of conditions otherwise associated with elevated PRL, such as pregnancy, PRL-secreting pituitary adenoma (prolactinoma), intracranial tumors compressing the pituitary stalk or hypothalamus, drugs, hypothyroidism, chest wall diseases, or hepatorenal disorders. The criteria of ten healthy subjects were to be disease-free, women without menstrual disorders, and normal PRL serum levels (<20 ng/ml). Venous blood samples were drawn between 8:00 AM and 10:00 AM.

Cells

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) were isolated by density gradient centrifugation (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway). PBMNCs were recovered from the interface, washed in PBS, and resuspended in serum-free culture medium (AIM-V medium, Life Technologies, Grand Island, NY), which is a synthetic medium without prolactin. Cell viability was determined by trypan blue exclusion, it was always above 95%.

The used human PRL (hPRL) and polyclonal antibodies against prolactin were kindly donated by Dr. A.F. Parlow from the National Hormone and Pituitary Program Harbor-UCLA Medical Center (batch # AFP3855A). The non-related antibody was obtained through serum precipitation from normal rabbits.

T and B cell isolation

Isolation of human CD4⁺ T cells from PBMC was achieved by depletion of non-CD4⁺ cells. PBMCs were reacted with a cocktail of hapten-conjugated monoclonal antibodies (mAb) against CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, and CD56. B cells (95% CD19⁺) were negatively selected after reacting PBMC with hapten-labeled mAb to non-B cells, including anti-CD2, CD4, CD11b, CD16, CD36, and anti-IgE. These cells were exposed to magnetic beads coupled to an anti-hapten monoclonal antibody (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The magnetically labeled cells were depleted on a MACS column (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) with the magnetic MidiMACS field (Miltenyi Biotec, Auburn, CA).

Cell proliferation assay

PBMNCs were plated at 2×10^6 cells/ml, 0.1 ml/well, in 96-well plates and cultured in synthetic serum-free medium with 0, 0.5, 1, and 2 μ g/ml of concanavalin A (conA, Sigma, St Louis, MO). For the rest of the experiment, we decided to

use 2 µg/ml of conA because it optimally enhanced cell proliferation. For the conA plus hPRL cultures (10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml), we chose 50 ng/ml of hPRL because it yielded the best additive effect. ³H-TdR (1.0 µCi) was added during the last 18 h of culture. The ³H-TdR incorporation was determined in a liquid scintillation analyzer (Packard 1900 TR).

Activation assay

Cells from hyperprolactinemic patients and from normal subjects were cultured in 24-well plates (5×10^5 PBMC/well) and 96-well plates (1×10^5 cells/well) at 37°C. Cells were stimulated under different experimental conditions, as follows: (a) medium alone as a negative control, (b) hPRL alone, (c) unspecific mitogen as a positive control (PMA-ionomycin for CD154, CD40, CD86, or conA for CD69), (d) mitogen plus hPRL, (e) mitogen plus antibody anti-hPRL (1:50), and (f) mitogen plus non-related antibody (1:50). IRMA and Nb2 bioassay were performed as quality control for AIMV medium.

Flow cytometry analysis

After the aforementioned different experimental conditions, cells were re-suspended in PBS-BSA-AZ (PBS, pH 7.4, 0.2% bovine serum albumin, 0.2% sodium azide) and stained with varying FITC-labeled mAb, including anti-CD4, anti-CD69, anti-CD154, anti-CD19, anti-CD40, and anti-CD86 (PharMingen, San Diego, CA) for 20 min at 4°C, after which cells were fixed in 1% paraformaldehyde for further analysis. Fluorescence analysis was performed in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). A minimum of 10,000 lymphocyte-gated events were acquired in list mode and analyzed with Cell Quest Software.

Intracellular cytokine analysis

Purified T cells were cultured in 96-well plates (1×10^5 cells/well) for 4 h at 37°C under one of the following conditions: (a) hPRL (50 ng/ml), (b) PMA (5 ng/ml) and ionomycin (0.4 µg/ml), (c) PMA-ionomycin and hPRL (50 ng/ml), and (d) PMA-ionomycin and antibody anti-hPRL (1:50). Brefeldin A (1 µg/ml) was added 4 h before the end of culture time. Cultured cells were washed in PBS-BSA-AZ, fixed, and permeabilized with cytofix/cytoperm solution according to manufacturer's instructions (PharMingen, San Diego, CA). Permeabilizations of cells were FITC-labeled with mAb specific for IL-2 or IFN-γ (PharMingen, San Diego, CA) and examined in a flow cytometer as described above.

Competitive test

In separate assay tubes, a constant concentration of anti-hPRL was pre-incubated (at 37°C for 1 h) with increasing

concentrations of hPRL in order to obstruct the binding site of the antibodies. The cells were then incubated with PMA-ionomycin and the complex (anti-PRL antibody with PRL in the binding site) was added to the culture. Then, the cells were washed, incubated, and fixed. Fluorescence analysis was performed using a FACScalibur cytometer to show that the inhibition observed in the experiment was due to PRL uptake by the antibodies, since the antibodies with the binding site engaged with prolactin did not display inhibition.

PRL assays using Nb2 lymphoma cells

PRL bioactivity was measured using Nb2 lymphoma cell assay as described by Tanaka et al. [27]. Briefly, cells were kept at 37°C in Fisher's medium containing 10% FBS as a source of lactogen, 10% horse serum, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 50 IU/ml penicillin. After that, cells were arrested in the early G₁ phase of the cell cycle by 24 h of pre-incubation in lactogen-free medium. In order to obtain the standard curve, we add increasing concentrations of purified human pituitary PRL (NIDDK hPRL) (from 0 to 8 ng/ml). PRL-like bioactivity was assayed in (a) aliquots of culture medium from PBMC stimulated with conA at different times (0, 1, 2, 3, and 4 h) and (b) supernatant plus antibody anti-hPRL at different dilutions to ascertain parallelism with the standard curve. To inhibit the lactogenic effect of human growth hormone (hGH), rabbit antiserum to hGH (NIDDK-anti-hGH-IC-3 A.S., CYTO [AFPC11981A]) was added to a final dilution of 1:4000. Cultures per triplicate were further maintained in an atmosphere of 95% air–5% CO₂ at 37°C for 72 h. The effects of hPRL on cell proliferation were analyzed by the incorporation of [³H] thymidine (1 µCi) into Nb2 cells. The sensitivity of this assay for PRL was 3 pg/ml.

Results

The population in study consisted of five hyperprolactinemic female patients (mean ± SD of age, 35 ± 7 years). All patients showed clinical manifestations, such as irregular menses and galactorrhea, only one with an infertility status. The mean of PRL serum levels was 44.4 ± 8.4 ng/ml. All hyperprolactinemia cases were classified as idiopathic because no one showed any of the associated conditions for elevated PRL. The ten healthy women studied had a mean age of 34 ± 10 years and displayed less than 20 ng/ml of serum PRL levels.

In proliferation assay of the PBMC from hyperprolactinemic patients and healthy subjects, the hPRL by itself was unable to induce proliferation at concentrations ranging from 10 to 1000 ng/ml. However, the hPRL displayed an additive effect on PBMC proliferation produced by unspecific mitogen (conA) stimulation, showing a statistically significant difference ($P < 0.005$) compared with those cultures without hPRL. In contrast, the addition of anti-

bodies against hPRL to PBMC cultures showed a 30% decrease in ^3H -TdR incorporation in response to conA with statistically significant difference ($P < 0.005$) (Fig. 1). The addition of not related antibodies does not induce inhibition, suggesting that PRL is produced locally during cell proliferation (data not shown).

In the activation assay, the PBMCs from five hyperprolactinemic patients and ten healthy subjects were tested for CD69 expression under different conditions. We found a similar pattern of cell activation in both groups studied as can be seen in Fig. 2a. The addition of hPRL alone to the cell culture did not induce changes in CD69 expression on CD4^+ cells from either patients or healthy subjects. ConA stimulation revealed that 34.8% of CD4^+ cells expressed CD69 in healthy subjects and 28.5% in hyperprolactinemic patients; these expressions were used as a positive control for each group. In cells from both groups, the addition of hPRL to conA-stimulated cells did not affect CD69 expression (33% and 29%, respectively). However, addition of antibodies against hPRL to the unspecific-stimulated culture resulted in a striking reduction (about 52%) of CD69 expression in cells from healthy subjects. Meanwhile, the cells from hyperprolactinemic patients display an inhibition with anti-hPRL antibodies around 38%. However, in both cases, statistically significant differences were found ($P < 0.05$). In contrast, the addition of not related antibodies to the culture did not induce changes in CD69 expression in both groups (Fig. 2b).

In order to determine whether the inhibition was due to anti-hPRL antibody activity, the binding site of the anti-hPRL antibodies was engaged with hPRL. In different assay tubes, a constant concentration of antibodies against hPRL

was pre-incubated with increased concentrations of hPRL, varying from 12 ng/ml to 100 ng/ml. Fig. 3a shows that the blocking of antibody binding site with hPRL reduces the inhibition of CD69 expression. As we engaged the antibody binding site with increased amount of hPRL, the CD69 expression returned to mitogen response levels, indicating that the reduction in CD69 expression was due to blockage or deletion of prolactin and not due to the Fc antibody portion, also indicating that addition of the antibody-hPRL complex to the culture did not play any role in the cell activation process.

In order to determine at what time hPRL exerted its activity during in vitro PBMC activation, the anti-hPRL antibodies were added at different moments after ConA activation. Fig. 3b shows that prolactin exerts its effect during the first hour after the immune response was triggered. In contrast, addition of antibodies against hPRL 2 h after stimulation did not exert an inhibitory effect on CD69 expression.

The autocrine PRL production was measured by Nb2 assay in the supernatant from stimulated cell cultures collected at 0, 1, 2, 3, and 4 h, the concentrations were 0, 121, 157, 110.7, and 96 pg/ml of PRL, respectively. In contrast, no PRL was detected in cultures from non-stimulated cells or in those cultures to which anti-hPRL antibodies had been added to the supernatant to block the lymphoid prolactin (data not shown), demonstrating that PBMCs are capable to produce and secrete PRL.

To examine whether hPRL had an effect on the expression of CD154, PBMCs from five hyperprolactinemic patients and ten healthy individuals were cultured in the presence of PMA-ionomycin (5 ng/ml and 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), which in preliminary experiments had been found optimal response, with 54% of PBMCs expressing CD154. Addition of hPRL alone or the addition to PMA-ionomycin-stimulated cells had no effect on CD154 expression. However, addition of anti-hPRL antibodies resulted in a reduction of CD154 expression in PBMC of around 47% in cells of either patients or healthy individuals (Fig. 2a). The inhibitory activity of anti-hPRL antibodies was also ablated by absorption with hPRL. Fig. 4a shows the results of adding anti-hPRL antibodies at different times during in vitro PBMC activation with PMA-ionomycin; their addition at time 0 and 1 h later reduced CD154 expression in 29%. In contrast, the addition of antibodies after 2 and 3 h had no effect on CD154 expression.

Another possibility to explore was whether hPRL could perpetuate CD154 expression after the initial stimulus, which could result in an enhanced B–T cell interaction. The cells were cultured with PMA-ionomycin and with PMA-ionomycin plus hPRL, harvested at 2, 4, 6, and 18 h, finding a similar pattern of CD154 expression in both conditions (Fig. 4b), suggesting that prolactin does not perpetuate CD54 expression. Likewise, addition of anti-hPRL antibody decreased CD154 expression throughout the 18 h of culture.

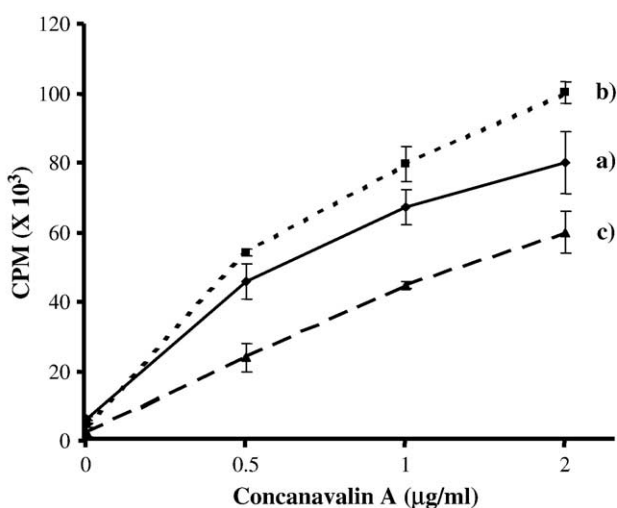


Fig. 1. PBMC proliferation measured by ^3H -TdR incorporation. Line a, cells stimulated with different concentrations of ConA (0, 0.5, 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$); line b, cells stimulated with ConA plus PRL; and line c, cells with ConA plus anti-PRL antibodies. The values represent the mean plus one standard deviation of healthy human subjects. Statistically significant differences were found ($P < 0.005$) among the three groups.

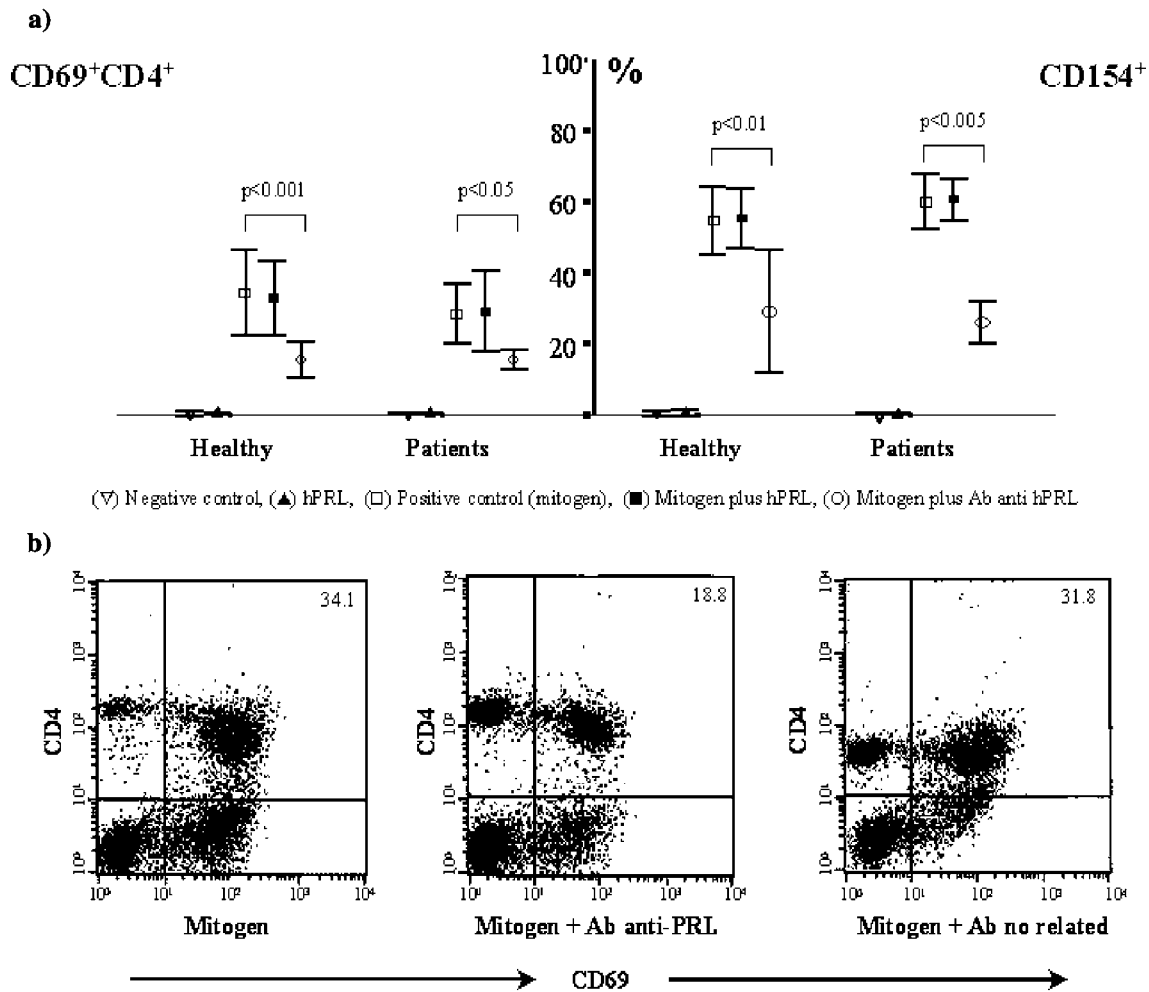


Fig. 2. Percentage of CD69 expression on lymphocytes CD4⁺ and CD154 on PBMNC from ten healthy subject and five hyperprolactinemic patients. Panel a compares cell behaviors from healthy subject with patients. Panel b displays a sample of the distribution of CD69 on CD4 under ConA stimulus, mitogen plus antibody against PRL, and mitogen plus one antibody not related.

Using the same model of activation, we explored CD40 and CD86 expression on purified B cells from five hyperprolactinemic patients and ten healthy individuals. Figs. 5a and b show that CD40 expression was not affected by any of the culture conditions (hPRL alone, unspecific mitogen [PMA-ionomycin], mitogen plus hPRL, mitogen plus anti-hPRL antibodies, and non-related antibodies). In contrast, PMA-ionomycin was able to induce CD86 expression in 38.6% of the B cells, but its expression was not affected by the addition of hPRL or anti-hPRL antibodies, suggesting that PRL does not participate in the expression pathway of these two molecules.

The effect of hPRL on IFN γ secretion by CD4⁺ lymphocytes was also examined in both groups. The hPRL alone did not induce IFN γ release. Also, hPRL plus PMA-ionomycin did not show additive effects (data not shown). However, when anti-hPRL antibodies were added to cultures, a 60% decrease in IFN γ ⁺-stained cells was found. This decrease was due to hPRL, since blocking the anti-hPRL antibody binding site with hPRL displayed a dose-

dependent inhibition (Fig. 6a). Similar results were obtained in those experiments designed for IL2 expression on lymphocyte CD4⁺ (data not shown). Kinetic studies showed that the inhibitory activity of anti-hPRL antibodies on the IL-2 expression decreased progressively with time, supporting our previous results. The inhibitory effect found with the addition of anti-PRL antibodies after 1 h of activation was 55%, and 40% after 2 h; it was no longer present after 4 h (Fig. 6b). The same results were found in the experiment designed for IFN γ , as can be seen in Fig. 6b, the addition of anti-hPRL antibodies at time zero showed almost 60% of inhibition in IFN γ expression. In contrast, addition of the antibodies after 1 or 2 h of activation induced less inhibition.

Finally, we examined in vitro antibody production by B-lymphocytes stimulated in the presence or absence of hPRL. As seen in Fig. 7, B cells from healthy subjects were stimulated with mitogen and with mitogen plus the addition of hPRL; the antibody productions were measured in the supernatant using ELISA method. We found that the

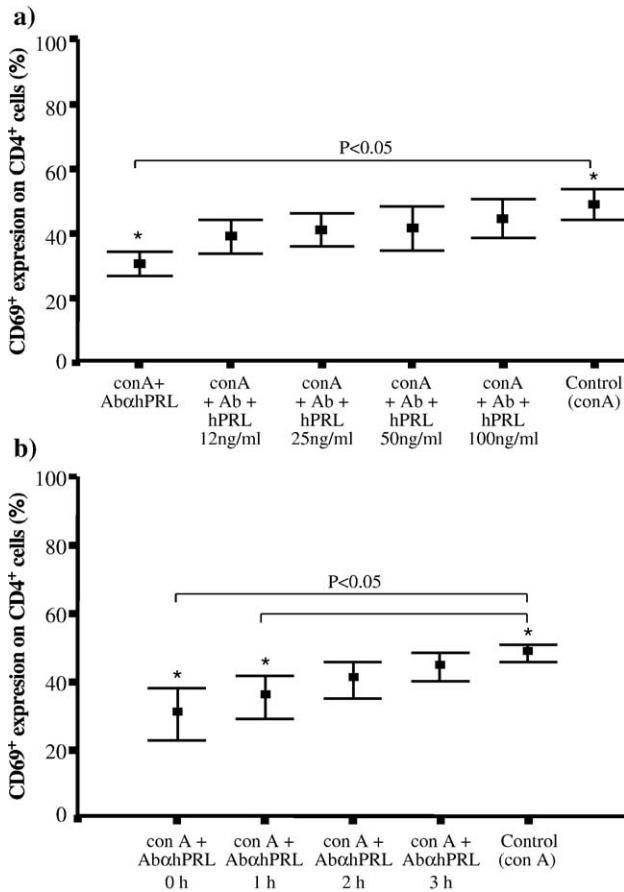


Fig. 3. CD69 inhibition on stimulated lymphocytes CD4⁺ with anti-PRL antibody; increased concentrations of PRL were added to a solution containing predetermined quantities of anti-PRL antibody, then added to the cells stimulated with conA (a). Panel b illustrates a kinetic of time: the anti-PRL antibodies added at different times after the cells were activated with conA.

cultures with PRL had an additive effect on antibody secretion that was not statistically significant.

Discussion

The clinical features (galactorrhea and hypogonadism) of patients with hyperprolactinemia are due to the effects of the hormone in the target organ. However, the immune system alterations reported in hyperprolactinemic patients, such as autoimmune rheumatic diseases [11], and the fact that some women have developed natural autoantibodies during pregnancy, probably due to the hyperprolactinemic state [12], are difficult to associate to PRL. We explored the immune response in cells from patients with hyperprolactinemia, because a large number of evidence suggest PRL contributes in immune responses activity like: (a) additive effect in lymphocyte proliferation [17,18], (b) immunodeficiency observed in animal models with hypoprolactinemia [14,23]; (c) association of hyperprolactinemia with autoimmune diseases both in animal models and humans [19–

21]; (d) regulatory feedback exerted by some cytokines on serum PRL levels [28]; and (e) the fact that lymphocytes and other immunocompetent cells express PRL receptor besides being able to release PRL [7–9]. All this evidence strongly suggests that prolactin could participate in triggering the immune response; this action could be exerted through the secondary signal, such as the expression of co-stimulatory molecules and/or interleukin secretion.

The current study was performed in vitro using cells from hyperprolactinemic patients and healthy individuals in order to determine differences in cell activation. Our model emulates different concentrations of PRL (low or high) in the medium, where the activation takes place, as it has been suggested that the hyperprolactinemic state elicits the immune response [19,20] and the hypoprolactinemia has been associated with a deficient immune response [23]. We found, however, that lymphocytes obtained from healthy subjects and from hyperprolactinemic patients had a similar pattern of response, suggesting that the amount of prolactin in the microenvironment does not affect the immune response. But when immune cells start the activation process (by mitogen or antigen), the levels of PRL affect the quality of lymphocyte activation through three probably mechanisms: the first by an additive effect on PBMC proliferation, as revealed our results and previous works

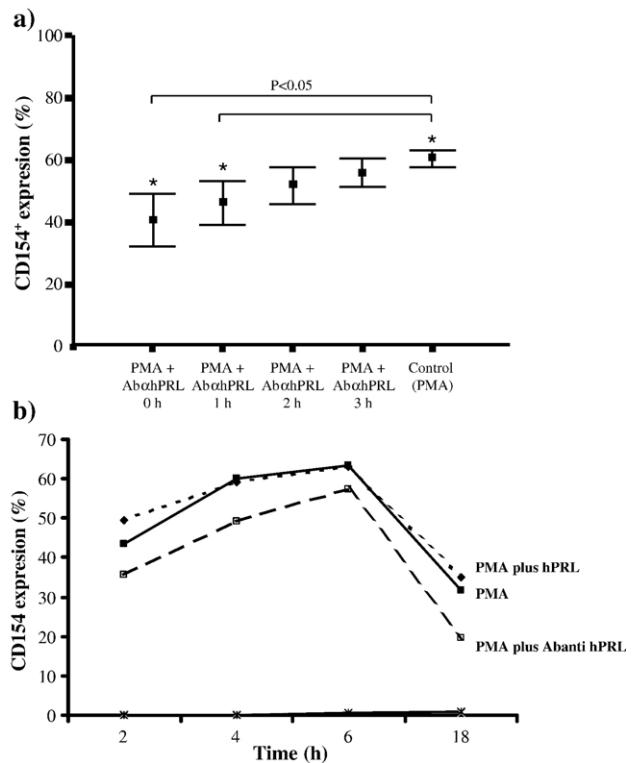


Fig. 4. Kinetic of time of CD154 on PBMNC. Anti-PRL antibodies were added at different times after the cells were activated (a). Statistically significant differences was found using ANOVA ($P < 0.05$) among the positive control compared with those culture with antibody at time zero and 1 h after the stimulus. Panel b displays the expression of CD154 on PBMNC along 18 h after the different stimulus.

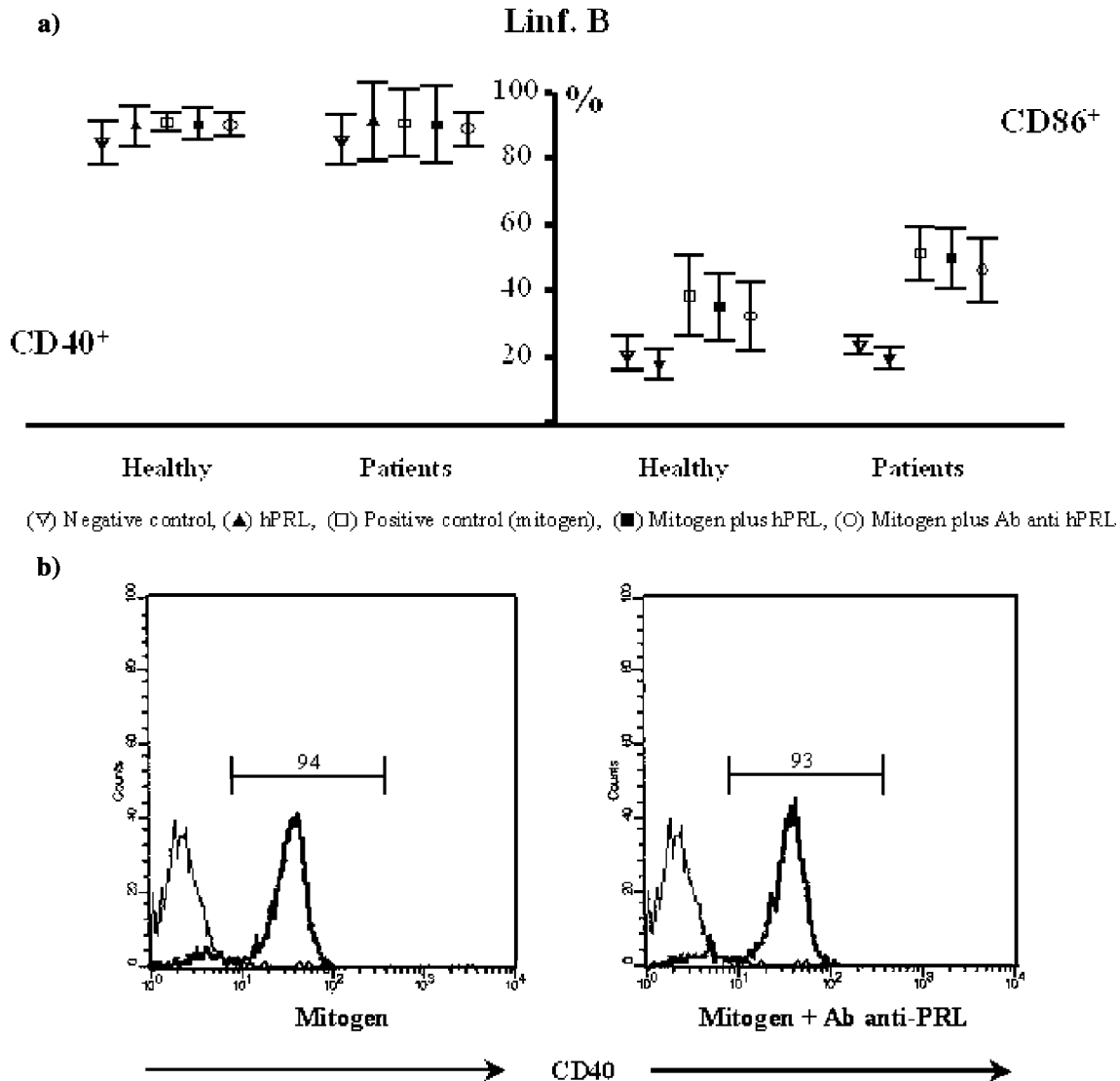


Fig. 5. Panel a displays CD40 and CD86 expression: a similar expression for CD40 was found in healthy patients under different conditions (cells without stimuli, with PRL alone, with mitogen, with mitogen plus PRL, and with mitogen plus anti-PRL antibodies). In contrast, the expression of CD86 on B cell does not suffer any changes with the addition of PRL or with antibodies against to PRL. Panel b is a sample of CD40 distribution on stimulated B cells with mitogen and the blocking with antibody against to PRL.

[17,18]. In contrast, depletion of PRL by the addition of anti-hPRL antibodies decreased the proliferation in about ~30%, indicating that PRL plays, at least, an accessory role in the proliferation. The second one, as shown by our results, could be through the expression of co-stimulatory molecules like CD69 and CD154 expression on CD4⁺ cells. Here we found that the depletion of PRL using anti-hPRL antibodies decreased the expression of activation marker molecules in about ~50% and the third one could be by affecting IL-2 and IFN γ secretion, our results showing a markedly reduced IL-2 and IFN γ when depleting PRL in the culture.

The presence of prolactin in the microenvironment could act as a growth factor in cell proliferation. However, the PRL that participates in the immune response activation process is secreted by the lymphocyte, as evidenced by the

finding that no additive effect was exerted when PRL was added to the culture, and a striking reduction in the key indicators of successful T cell activation was observed with the deletion of PRL. These results are in concordance with those obtained in a knockout mouse model for PRL, in which no evident abnormalities in the anatomy and development of B and T cells were found and the innate immunity was normal [29]; however, the adaptive immune response was not studied, where most of the effects of PRL have been demonstrated.

T cell activation is a fundamental step for the onset of adaptive immune response. This is characterized by alterations in cell surface expression molecules: increased CD69, CD25, CD154, FAS-L, and CD44 expression, and decreased CD62L and CD45R expression. Some of these changes are necessary for T cells to start and progress in the

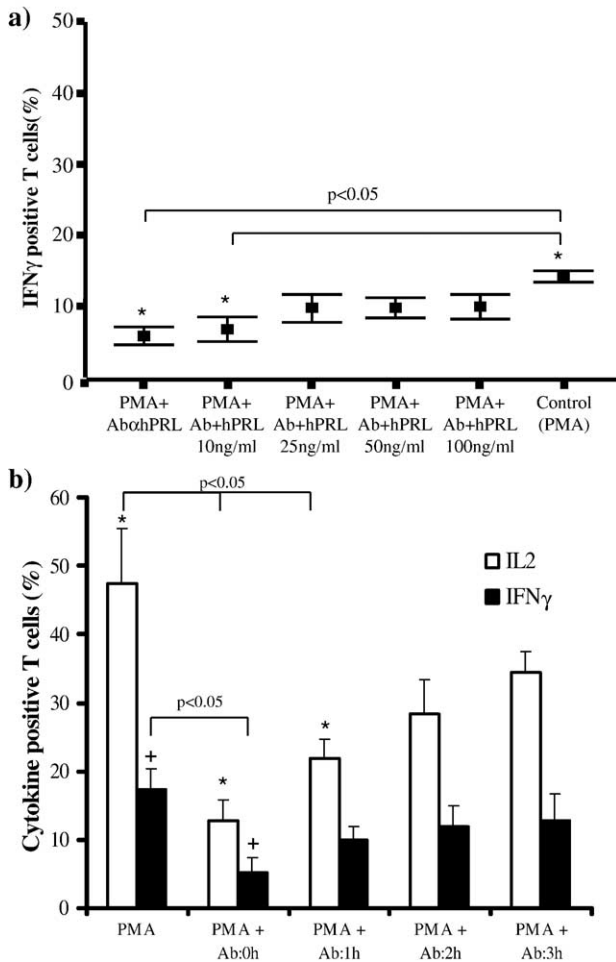


Fig. 6. IL2 and IFN γ secretion by CD4 $^{+}$ cell. Panel a shows the inhibition of IFN γ stained on lymphocyte CD4 $^{+}$ stimulated with PMA-ionomycin: increasing concentrations of PRL were added to a solution containing predetermined quantities of anti-PRL antibody, then added to stimulated culture. The IFN γ stain decreased in about 70%, it was statistically significant different using ANOVA ($P < 0.005$). Panel b illustrates a kinetic of IL2 and IFN γ production: here the anti-PRL antibodies were added at different times (0, 1, 2, and 3 h) after cell activation with PMA, statistically significant differences were found at time zero and 1 h after the stimulus using ANOVA ($P < 0.005$).

cell cycle [24]. Here, we explored the expression of CD69 on human CD4 $^{+}$ lymphocyte as an early activation indicator. Addition of hPRL to the culture did not affect CD69 expression. In contrast, the addition of anti-hPRL antibodies decreased CD69 expression, this was supported by the finding that engagement of the binding site of the antibody against hPRL by increasing concentrations of hPRL restored CD69 expression and the addition of non-related antibody did not affect its expression. Besides, PRL is necessary to initiate T cell activation, as revealed by the experiment in which anti-hPRL antibodies were added at different times after the stimulus.

CD154 is a member of the tumor necrosis factor (TNF) family with a number of essential functions in the immune response after binding to its receptor, CD40. Activated

CD4 $^{+}$ cells, also some CD8 $^{+}$ T cells, dendritic cells, NK cells, human mast cells, platelets, and basophiles express mainly CD154. An important function of CD154–CD40 interaction is its relationship with the CD28 co-stimulatory pathway. Thus, CD154–CD40 interaction signals APC to up-regulate CD80 (B7-1) and, to a lesser extent, CD86 (B7-2), which in turn enhances the co-stimulatory activity of antigen presenting cells, including B cells, dendritic cells, and macrophages. CD28–CD80/86 and CD40–CD154 interactions synergize to initiate and amplify T cell-dependent immune responses [25,26]. Here, we explored both CD154 and CD40 expression in cells activated with PMA-ionomycin in culture with or without prolactin. Although expression of CD154 in response to PMA-ionomycin did not change with the addition of hPRL, we found that blocking lymphoid prolactin with antibody exerted an inhibitory effect on CD154 expression by PBMC, indicating that, most likely, T cell-derived PRL acts as an autocrine mediator on T cell activation leading to CD154 expression. Results are similar to those observed for CD69.

The PRL did not alter the expression of CD40 or CD86 in purified B cells. However, it induced a slight increase in antibody production by these B cells, suggesting that the mechanism of action of PRL in B cells could be different. Our model worked properly since the positive control displayed an increased expression of CD86 on stimulated cells, suggesting that PRL does not play any role in the co-stimulatory function through the induction or up-regulation of CD40 and B7 (including CD86) molecules on the surface of B cells (functioning as APC) for an appropriate activation [26,30].

The PRL role as a growth factor is supported by the additive effect in the proliferation assay and reduction of the proliferation by blocking the prolactin in synthetic medium.

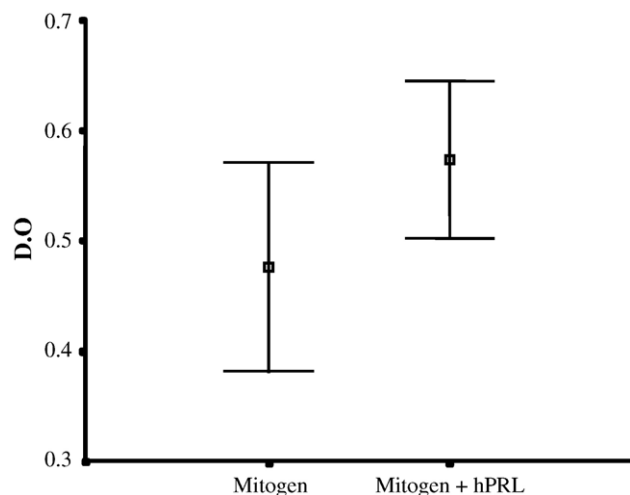


Fig. 7. B cell activation measured through antibody production by ELISA methods. B cells from healthy subject were stimulated with mitogen or mitogen plus PRL. Then the antibody production was measured in the supernatant. The PRL had an additive effect on antibody secretion, but that was not statistically significant.

In contrast, in the activation assay, addition of hPRL to the cell culture does not modify the activation process measured through CD69, CD154, CD40, and CD86 expression. However, the CD4⁺ activation measured through CD69 and CD154 expression depends mostly on the secretion of PRL by the lymphocyte, as supported by our results from the Nb2 assay in which PBMC from both hyperprolactinemic patients and healthy subjects produced and released PRL. Production of PRL correlated with both cell number and the degree of proliferation and the addition of anti-hPRL antibodies to the supernatants blocked the Nb2 proliferation, suggesting that the prolactin used by the PBMC is produced by themselves and that the Nb2 proliferation was not an effect of a nonspecific mitogen in the supernatants.

The secretion of IL-2 and IFN γ is strikingly reduced by blocking the prolactin. Besides, no additive effect was observed with the addition of hPRL to the culture. IL-2 is rapidly and potently induced after antigen presentation to resting T cells, the results of transcription and synthesis of IL-2 are often used as a key indicator of successful T cell activation [31]. In the same fashion, IFN γ could be an indicator of T cell activation [32,33]. Several questions remain to be answered, especially those related with the magnitude and type of immune response, because the antigen determines the specificity of the immune response, but the interaction of IL-2 with high-affinity IL-2 receptors regulates the magnitude and duration of the response. Cells from mouse and human in vitro models show that the presence of IFN γ in priming culture resulted in the outgrowth of Th1 but not Th2 clones [33]. We present evidence that in vitro blockage of PRL does not induce an appropriate T cell activation, as measured through the IL-2, IFN γ secretion, and CD69, CD154 expression.

In conclusion, it is evident that prolactin alone is unable to initiate an immune response in lymphocytes from patients and healthy subjects in spite of some clinical evidences [11,12]. In the same fashion, it is clear that PRL takes part in the trigger of T cell activation and that PRL is produced and secreted by the same cells acting predominantly in autocrine form collaborating in the expression of co-stimulatory molecules (CD69, CD154) and the IL-2, IFN γ secretion.

Further studies are needed in order to dissipate if the hyperprolactinemic condition in SLE patients is the result of cell activation of the immune system instead of the high levels of prolactin that trigger the immune response or the fact that some individuals develop autoimmune rheumatic disease after hyperprolactinemic state, it must address research about PRL participation just in auto-reactive clones.

Acknowledgments

This research was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia de Mexico (CONACYT): grant # 34454-N. We would like to thank Dr.

A.F. Parlow from the National Hormone and Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Center, for the donation of human PRL (hPRL) and polyclonal antibody against prolactin, and Prof. David A Isenberg for comments on the manuscript.

References

- [1] O. Riddle, R.W. Bates, S.W. Dykshon, The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of the anterior pituitary, *Am. J. Phys.* 105 (1993) 91–216.
- [2] G.E. DiMattia, B. Gellersen, H.G. Bohnet, H.G. Friesen, A human B lymphoblastoid cell line produces prolactin, *Endocrinology* 122 (1986) 2508–2517.
- [3] B. Gellersen, R. Kempf, R. Telgmann, G.E. Di Mattia, Non-pituitary human prolactin gene transcription is independent of pit-1 and differentially controlled in lymphocyte and in endometrial stroma, *Mol. Endocrinol.* 8 (1994) 356–373.
- [4] E. Ginburg, G.K. Vonderhaar, Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells, *Cancer Res.* 55 (1995) 2591–2595.
- [5] A.R. Bailey, K.R. Burchett, Effect of low dopamine doses on serum concentration of prolactin in critically ill patients, *Br. J. Anaesth.* 78 (1997) 97–99.
- [6] I. Pellegrini, J.J. Lebrun, S. Ali, P.A. Kelly, Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells, *Mol. Endocrinol.* 6 (1992) 1023–1031.
- [7] M. Dardenne, M.C.L. de Morales, P.A. Kelly, M.C. Gagnerault, Prolactin receptor expression in human haematopoietic tissue analysed by flow cytofluorimetry, *Endocrinology* 134 (1994) 2108–2114.
- [8] R.R. Gala, Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198 (1991) 513–527.
- [9] R. Rooijman, E.L. Hooghe-Peters, R. Hooghe, Prolactin growth hormone, and insulin-like growth factor-1 in the immune system, *Adv. Immunol.* 63 (1996) 377–454.
- [10] M.K. Beverly, Gilbert Biller, H. Daniels, Neuroendocrine regulation and disease of the anterior pituitary and hypothalamus, Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed., Mc Graw Hill Press, 1998, pp. 1972–1978.
- [11] R.W. McMurray, S.H. Allen, A.L. Braun, F. Rodriguez, S.E. Walker, Longstanding hyperprolactinemia associated with systemic lupus erythematosus: possible hormonal stimulation of an autoimmune disease, *J. Rheumatol.* 21 (1994) 843–850.
- [12] A. Leanos-Miranda, D. Pascoe-Lira, K.A. Chavez-Rueda, F. Blanco-Favela, Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin auto-antibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 2619–2624.
- [13] D.H. Russel, L. Matrisian, R. Kimbler, D.F. Larson, B. Poulos, B.E. Magun, Prolactin receptors on human lymphocytes and their modulation by cyclosporine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121 (1984) 899–906.
- [14] E.W. Bernton, M.S. Meltzer, J.W. Holaday, Suppression of macrophage activation and T lymphocyte function in hypoprolactinemic mice, *Science* 239 (1988) 401–404.
- [15] L. Matera, A. Cesano, G. Bellone, E. Oberholtzer, Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen induced activity of T, B and NK lymphocyte, *Brain Behav. Immun.* 6 (1992) 409–417.
- [16] C.V. Clevenger, D.O. Freier, J.B. Kline, Prolactin receptors signal transduction in cell of the immune system, *J. Endocrinol.* 157 (1998) 187–197.
- [17] C.V. Clevenger, D.H. Russel, P.M. Appasamy, M.B. Prytowsky, Regulation of IL-2 driven T lymphocyte proliferation by prolactin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 6460–6464.

- [18] D.P. Hartmann, J.W. Holoday, E.W. Bernton, Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin, *FASEB J.* 3 (1989) 2194–2202.
- [19] R. McMurray, D. Keisler, K. Kanuekel, S. Izui, S.E. Walker, Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse, *J. Immunol.* 147 (1991) 780–787.
- [20] R.W. McMurray, D. Keisler, S. Izui, S.E. Walker, Hyperprolactinemia in male NZB/NZW (B/W) F1 mice: accelerated autoimmune disease with normal circulating testosterone, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71 (1994) 338–343.
- [21] F. Blanco-Favela, G. Quintal-Alvarez, A. Leañós-Miranda, Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power, *J. Rheumatol.* 26 (1999) 55–59.
- [22] A. Leañós, D. Pascoe, A. Fraga, F. Blanco-Favela, Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia, *Lupus* 7 (1998) 398–403.
- [23] I. Berczi, E. Nagy, K. Kovacs, E. Horvath, Regulation of humoral immunity in rat by pituitary hormone, *Acta Endocrinol.* 98 (1981) 506–513.
- [24] G. Kelsoe, The germinal center. A crucible for lymphocytes selection, *Semin. Immunol.* 8 (1996) 179–184.
- [25] L. Ding, J.M. Green, C.B. Thompson, E.M. Shevach, B7/CD28 dependent and independent induction of CD40 ligand expression, *J. Immunol.* 155 (1995) 5124–5132.
- [26] I.S. Grewal, R.A. Flavell, The role of CD40 ligand in co-stimulation and T cell activation, *Immunol. Rev.* 153 (1996) 85–106.
- [27] T. Tanaka, R.P.C. Shiu, P.W. Gout, C.T. Beer, R.L. Noble, H.G. Friesen, A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormone measurement of prolactin and growth hormone in human serum, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51 (1980) 1058–1063.
- [28] G. Schettini, T. Lorio, O. Meucci, Interleukin-1- β modulation of prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: involvement of adenylate cyclase activity and calcium mobilization, *Endocrinology* 126 (1990) 1435–1441.
- [29] N.D. Horseman, W. Zhao, E. Montecinos Rodriguez, M. Tanaka, K. Nakashima, S.J. Engle, F. Smith, E. Markoff, K. Dorshkind, Defective mammopoiesis, but normal haematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene, *EMBO J.* 16 (1997) 6926–6935.
- [30] Y. Yang, J.M. Wilson, Ligand dependent T cell activation requirement of B7-CD28 signalling through CD40, *Science* 273 (1996) 1862–1864.
- [31] K.A. Smith, The interleukin 2 receptor, *Annu. Rev. Cell Biol.* 5 (1989) 397.
- [32] R. Fernandez-Botran, V.M. Sanders, T.R. Mosmann, E.S. Vitteta, Lymphokine mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells, *J. Exp. Med.* 168 (1988) 543–558.
- [33] T.F. Gajewski, F.W. Fitch, Anti-proliferative effect of IFN gamma in the immune regulation. IFN gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones, *J. Immunol.* 140 (1988) 4245–4252.

Prolactine effect on CD69 and CD154 expression by CD4⁺ cells from systemic lupus erythematosus patients

Chavez-Rueda Karina PhD¹, Legorreta-Haquet Ma. Victoria MC¹, Cervera-Castillo
Hernando MD², Sánchez Lourdes MD³, Jara Luis Javier MD⁴, Zenteno Edgar PhD⁵,
Blanco-Favela Francisco MD¹.

1. Laboratory of Autoimmunity at Immunology Research Unit, Pediatric Hospital, Centro Medico Nacional "Siglo XXI", IMSS. México, D.F.
2. Rheumatology Department at the HGZ#25, IMSS. México, D.F.
3. Rheumatology Department, Hospital de Especialidades Centro Medico Nacional "Siglo XXI", IMSS. México, D.F.
4. Rheumatology Department, Hospital de Especialidades Centro Medico Nacional "la Raza", IMSS. México, D.F.
5. Biochemistry Department at the Medicine Faculty in the Autonomous National University of Mexico, UNAM, Mexico D.F.

Please address the correspondence to: Francisco Blanco-Favela MD PhD, at Laboratory of Autoimmunity at Immunology Research Unit, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI" Av. Cuahutemoc 330 Col. Doctores PO Box: 73-032, CP: 03020 IMSS. México, D.F. fblanco1@terra.com.mx

Abstract

Objective: The aim was to explore the role of prolactine (PRL) in the lymphocyte activation process in active and inactive systemic lupus erytematosous (SLE) patients in an *in vitro* model.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) were isolated from SLE patients and healthy individuals. The mRNA for prolactine and its receptor obtained by standard techniques, with an appropriate primer, were subjected to PCR and visualised. The PBMC were cultured with: a) medium alone as a negative control, b) unspecific mitogen as a positive control (PMA-ionomycin for CD154 or concanavalin A for CD69), c) PRL alone, d) mitogen plus PRL, e) mitogen plus antibody anti-PRL (1:50) and f) mitogen plus a non-related antibody. Then by flow cytometry analysis were determined CD69 and CD154.

Results: Twelve inactive and 15 active SLE patients were studied. 25% of the active patients displayed hyperprolactinemia. Under basal conditions CD69 expression was associated with disease activity. In contrast, CD154 did not show this association. The PBMNC activated *in vitro* were capable of producing and secreting prolactine as measured by mRNA and Nb2 assay. In the same fashion the mRNA for prolactine receptor was visualized. Cells from SLE patients cultivated with PRL alone did not display increased CD69 and CD154 expression. The addition of PRL to the unspecific stimulated culture does not have an additive effect. In contrast, the addition of antibodies against PRL in order to block the autocrine prolactine resulted in a striking reduction of CD69 and CD154 expression.

Conclusions: PRL is produced and secreted by the immune cell and act just after the first trigger signal of activation an in autocrine way. The expression of CD69 and CD154 molecules depend partially on the prolactine.

Introduction

Systemic lupus erythematosus is an autoimmune rheumatic disease characterized by widespread inflammation and most commonly affects women. Virtually every organ and/or system may be involved. The course of the disease is characterized by remissions and exacerbation. The exacerbation of the disease has been linked to the activity of the immune system (1-4). The activation process of the immune system cells must be initiated by antigenic peptides bound to class I or II MHC molecules by antigen-presenting cells (APC) which is recognized by T cell receptor (TCR) (5). Its signal determines antigen specificity and plays a central role in initiating T cell activation. However, this interaction, by itself, is not sufficient to fully activate naïve T cells. Thus, subsequent non-antigen-specific co-stimulatory signals are necessary to trigger cytokine gene expression. The best known co-stimulatory signal for T cells is provided by the interaction of CD28 on the T cell with members of the B7 family (CD80 and CD86) on the APC. On the other hand, B cells are also targets of co-stimulatory signals, mainly received through the CD40 receptor after engagement by its ligand CD154 (CD40L) on activated T cells. This signal promotes growth, differentiation, survival and isotype switching on B cells. A third type of signal with a crucial role in T and B cell activation is mediated through the binding of soluble cytokines to their respective receptors (6, 7). The expression of these molecules is a marker of activated cells (8); this plus the increased expression of CD69 is a common association in active SLE patients (9, 11).

Another association described in active SLE patients is the high serum level of prolactine (PRL) (12). Although the clinical trials have yielded conflicting information because some studies have found an association between serum levels of PRL and the disease activity (12-15) but others could no confirm this relationship (16-19). Regarding the frequency of hyper-prolactinemia in SLE patients these is a consensus that 15 to 30% of SLE patients display hyper-prolactinemia (12). In spite of this information other evidences support the participation of the prolactine in the SLE disease activity through the immune system activity like the hyper-prolactinemia patients without autoimmune disease showed an increased frequency of autoantibodies compared with healthy people (20); physiological

hyper-prolactinemia states such as pregnancy and lactancy trigger lupus flares (21); elevated frequencies of hyper-prolactinemia in male SLE patients (14, 22); the finding in the mouse model for SLE where implants of syngeneic pituitary glands, induce a hyper-prolactinemia state, resulting in accelerated autoimmunity and early mortality (23, 24) and the treatment with bromocriptine improves the survival (24); or the experiment where PRL infusion induced a dramatic improvement in the survival of bromocriptine treatment mice after intra-peritoneal injection of *Listeria monocytogenes* (25) and those studies *in vitro* where the aim was to show that the PRL has action as a co-mitogen for T, B and NK cells from both human (26-28) and mice (29, 30). Moreover, recently we describe that SLE patients with auto-antibodies against prolactine display less activity compared with those patients without this antibodies (31, 32).

In spite of this information even is tiny the knowledge about the participation of the PRL in the phenomenon of activation of the cells from the immune system, based in that the address of this research is to explore the participation of prolactine in the lymphocytes activation process from active or inactive SLE patients using *in vitro* approach; the lymphocytes from patients and their controls were stimulated under different conditions in order to determine if the prolactine that has participation in the immune response is from pituitary or lymphoid origin. As a marked of activation cells CD69 and CD254 expression were measured. In the same fashion, we explore the prolactine production at RNA and protein level.

Material and Methods.

The human Ethical Committee and Medical Research of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) approved the study protocol, and written informed consent was obtained from all subjects who participated voluntarily in this study.

Patients: Twenty-seven SLE patients attended at the lupus clinic at the Hospital de Especialidades en el Centro Medico Nacional “Siglo XXI” del IMSS for long-term follow-up were studied, all of them fulfilled four or more of the American College of Rheumatology (ACR) revised criteria for the classification of SLE (1). Recent medications as well as those taken on the day of the evaluation were recorded. Any conditions associated with elevated PRL were noted include pregnancy, PRL-secreting pituitary adenoma (prolactinoma), intracranial tumours compressing the pituitary stalk or hypothalamus, drugs, hypothyroidism, chest wall diseases, hepatorenal disorders. All the hyperprolactinemic patients were classified as idiopathic because no one showed any of the associated conditions for elevated PRL.

Disease activity was graded according to a previous published index (SLEDAI) (2). For the purpose of this study, any value above 0 was considered as disease activity. Twelve of the SLE patients were inactive and fifteen were active. At the time that the samples were taken the treatment was with chloroquine (2.5 mg/Kg) and prednisone (10-20 Mg) none of the SLE had immunosuppressor drug. In the case of active patients the samples were taken just at the moment of hospitalisation before standard treatment for active disease was used. As a control cells and serum from twelve healthy subjects were used. The criteria for healthy was the knowledge of no disease, no menstrual disorder and normal serum level of prolactin (normal levels of PRL are 5 to 20 ng/ml). Venous blood samples were drawn between 8:00 AM and 10:00 AM after an overnight fast.

Cells: Human peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) were isolated by density gradient centrifugation (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, and Oslo Norway). PBMNC were recovered from the interface, washed in PBS, and resuspended in serum-free culture

medium (AIM-V medium, Life Technologies, Grand Island, N.Y.) it is synthetic medium without prolactine. Cell viability, was determined by trypan blue exclusion, it was always above 95%.

PRL: Human PRL (hPRL) and polyclonal antibodies from rabbit against to prolactin used were kindly donated by Dr. A.F. Parlow from the National Hormone & pituitary program Harbor-UCLA Medical Center (lot # AFP3855A). The antibody non-related was obtained through the serum precipitation from normal rabbit.

RNA for prolactine and its receptor: Four microliter (4 μ g) of cellular RNA, obtained from PBMN (6 X 10⁶) stimulated with PMA 5ng/ml-Ionomicina 200 ng/ml, for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h, was used for cDNA strand-Synthesis reaction. Twenty microclines of the cDNA was added to PCR mixture (final volumen, 100 μ l) containing Taq polymerase (2.5 unit; GIBCOBRL) for prolactine we used 5'CAAGAAGAATCGGAACATACAGGCTTT and 3'GCAGTTGTTGTTGTGGATGATTCGGCA primers (25pM) and 5'GTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGC 3'CACTTGCTTGATGTTGCAGTGAAGTTG for prolactine receptor in a PCR Buffer (1.5 mM MgCL₂, 50mM KCl, 20mM Tris HCl, pH 8.4, GIBCOBRL) and dNTP (0.2mM, GIBCOBRL). Reaction mixture were subjected to 30 cycles of PCR (each consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 65°C for 2 min and extension at 72°C for 2 min for prolactin. For prolactin receptor we used 94°C for 30 seg, 65°C for 1 min and 72°C for 1.5 min. In gel amplification was then performed in 1.5% remelted low-melting-point agarose (GIBCO/BRL). Double-distiller water served as a negative control for amplification.

Activation assay. Cells were cultured in 24 (5 X 10⁵ PBMNC/well) and 96-well plates (1 X 10⁵ cells/well) at 37°C. under follows conditions: a) medium alone as a negative control, b) hPRL alone, c) unspecific mitogen as a positive control (PMA-ionomycin for CD154, or concanavalin A for CD69), d) mitogen plus hPRL, e) mitogen plus antibody anti-hPRL (1:50) and f) mitogen plus antibody non-related (1:50). As quality control for the AIMV medium IRMA and Nb2 bioassay were performed.

Flow cytometry analysis: After different experimental conditions mentioned above the cells were re-suspended in PBS-BSA-AZ (PBS pH 7.4, 0.2 % bovine serum albumin, 0.2 % sodium azide) and were stained with varying FITC-labelled mAb, including anti-CD4, anti-CD69, and anti-CD154 (PharMingen, San Diego, CA) for 20 min at 4°C, after which cells were fixed in 1% paraformaldehyde for further analysis. Fluorescence analysis was performed in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). A minimum of 10,000 lymphocyte-gated events were acquired in list mode and analysed with Cell Quest Software.

Nb2 assay: PRL bioactivity was measured using Nb2 lymphoma cell assay as described by Tanaka et al. (33). Briefly, cells were kept at 37°C in Fisher's medium containing 10 % FBS as a source of lactogen, 10 % horse serum, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 50 IU/ml penicillin. Those cells were arrested in the early G₁ phase of the cell cycle by 24 h of pre-incubation in lactogen-free medium. Resumption of the cell cycle was achieved by the addition of increasing concentrations of purified human pituitary PRL (NIDDK hPRL). PRL-like bioactivity was assayed in: a) aliquots of culture medium from PBMNC stimulated with concanavalin A at different times (0, 1, 2, 3 h), b) supernatant plus antibody anti-hPRL, at different dilutions to ascertain parallelism with the standard curve. To inhibit the lactogenic effect of human growth hormone (hGH) rabbit antiserum to hGH (NIDDK-anti-hGH-IC-3 A.S., CYTO [AFPC11981A]) was added to a final dilution of 1:4000. Cultures per triplicate were further maintained in an atmosphere of 95 % air-5% CO₂ at 37 C for 72 h. The effects of hPRL on cell proliferation were analyzed by the incorporation of [3H] thymidine (1μCi) into Nb2 cells. The sensitivity of this assay for PRL was 3 pg/ml.

The competitive test: In separated tubes a constant concentration of anti-PRL was pre-incubated (at 37°C for 1 h) with increasing concentrations of PRL in order to obstruct the binding site of the antibodies. The cells were then incubated with PMA-ionomycin and the complex (anti-PRL antibody - hPRL) was added to the culture. Then, the cells were washed, incubated and fixed. Fluorescence analysis was performed using a FACScalibur cytometer. In was done in order to show that the inhibitions observed in the experiment were due to the capture of PRL by the antibodies.

Statistical analysis. The significance of differences between variables in two independent groups was determined by the non parametric statistic Mann Whitney U and for the tree groups was Kruskal Wallis.

Results

The study population consisted in 27 SLE patients (mean \pm SD age 36 ± 7 years) similar than the control twelve healthy subjects with mean of age of 31 ± 10 years old. The patients were divided using SLEDAI in twelve inactive (42 ± 8 years) and fifteen actives (34 ± 9 years). The clinical feature a long the history of the disease in both groups of patients (actives and inactive) are in the table 1. The mean of serum levels of prolactine in non-active SLE patients was 12 ± 1.9 ng/ml, similar than the mean in the healthy control group 11.1 ± 1.2 ng/ml. In contrast, the mean of sera levels of PRL was higher 16.8 ± 2.9 ng/ml. Moreover, 25% of the active SLE patients had hyperprolactinemia (Figure 1). The mean of SLEDAI in the group of active SLE patients was 14.5 compared with the zero from the non-active patients.

At the moment that sample was taken and before the realization of culture the expressions of CD69 and CD154 by CD4⁺ cells from SLE patients and controls were analyzed. We did not find statistically significant differences in the expressions of CD154 among the active, inactive, and healthy groups (Figure 2). In contrast, the CD69 expressions was higher in CD4⁺ from patients with the disease activity (1 ± 0.45 %), it was statistically significant different ($p < 0.05$) compared with the percentage of CD4⁺ from inactive SLE patients (0.29 ± 0.09 %) and healthy group (0.07 ± 0.02 %). CD69 is early cell activation marked that could show the quantity of active immune cells in the disease activity.

To confirm that the cells of the immune system are capable to producing and secreting PRL: PBMNC from healthy people were activated *in vitro* using unspecific mitogen then supernatant was collected at time 0, 1, 2, and 3 h. finding concentrations of 0, 45.8, 26.2 and 63.4 pg/ml respectively measured by Nb2 assay. In contrast, we did not find Nb2 activation in those cultures with supernatant without stimulus and in those where anti-PRL antibody was added to the supernatant (data not shown). In the same fashion, the mRNA for PRL was obtained at: 0, 1, 2, 3, 4 and 5 h. after the PBMNC stimulated with unspecific mitogen. Then RT-PCR and Dot Blotting was done as can be seen in the Figure 3a. We found mRNA for PRL at time zero. In the measure of time spends after the cells activation

an increased amount of mRNA for PRL was observed. In the same way, the mRNA for PRL receptor was found in activated PBMNC. The amount of mRNA for receptor appears without changes throughout the time Figure 3b.

The cells culture conditions were synthetic medium, non-supplemented with foetal bovine serum (FBS), in order to do not have interference due to growth factors in the foetal serum. Before each experiment the synthetic medium culture was tested for PRL in an Nb2 assay as a quality control. In the same fashion, the antibodies against to PRL were capable to block the biological activity of PRL on the Nb2 cells (data not shown). The figure 4 shows the behaviours of PBMC from SLE patients in culture with human pituitary PRL or without prolactine (depleting with anti-PRL antibodies): The CD69 expression in the negative control (cells with medium) was similar that the CD69 expression in culture with only hPRL, meaning that hPRL alone is not capable to activate cells from active or inactive SLE patients. The positive control; PBMNC stimulated with unspecific mitogen shows high levels of CD69 expression: In the healthy group 30% of CD4+ display CD69 close similar to the 40% finding in the inactive SLE patients. Inexplicably, just 15% of cells from active patients display expression of CD69. To find the effect additive described in the assays of proliferation with PRL the experiments were realized adding hPRL to the cultures stimulated with mitogen unspecific, but we do not find this effect, the expression of CD69 does not change. In contrast, the addition of antibodies against to PRL resulted in a striking reduction of CD69 expression in about 50% in patients and controls with statistical significance differences ($p < 0.05$); the addition of no related antibody did not affect the CD69 expression.

In spite of the control with non related antibody do not show changes in the CD69 expression, we decide to prove that the inhibition of CD69 expression was due to anti-PRL antibody activity: for that, the binding site of the anti-PRL antibody was engaged with hPRL. Different concentrations of hPRL were pre-incubated with a constant concentration of antibody against PRL then were added to the culture.

In the measurement in which the binding site of the antibody anti PRL is blocked, the inhibition in the expression of CD69 returns to the levels of the response to the mitogen, we found statistically significant differences ($p < 0.005$) between the inhibition of CD69 expression with the antibody alone against the complex of antibodies with 12 ng/ml of PRL. In contrast, not statistically significant differences were found in the CD69 expression with the addition of the complex formed by anti-prolactine antibodies and 25, 50 and 100 ng/ml. It demonstrated that the reduction of the CD69 expression was due to the blocking of prolactine produced by lymphocyte and not for another reason like the activity of the Fc antibody portion or by the complex formed between antibody and the PRL (Figure 5).

In PBMNC from SLE patients and healthy subject the hPRL alone was not capable to induce CD154 expression. By contrast, PMA induced CD154 expression in about 50% of PBMNC in SLE patients and controls. The addition of hPRL to PMA-stimulated cells had no effect on CD154 expression. However, the supplement with anti-PRL antibodies resulted in a reduction of CD154 expression on PBMNC in about 59 % as can see in the Figure 6. The responses to unspecific stimulus display a similar pattern in both SLE patients and healthy subject. However, the cells from SLE patients display less CD154 expression than the cells from healthy control. In fact cells from active SLE patients display a weak response to unspecific mitogen, but display a higher reduction of the CD154 expression with anti-PRL antibodies compared with the inactives and healthy control group. In the same fashion, in the three groups studied the inhibitory activity of anti-PRL antibody was ablated by absorption with PRL.

Discussion.

The information about the relationship between PRL and lupus activity in SLE patients has been inconsistent (12). The SLE patients in our research showed a similar pattern than previous trials: 25% of active SLE patients showed hyperprolactinemia, which is similar with the ranges in the previous reports (12, 13, 14, 31). The group of active SLE patients showed higher serum levels of PRL compared with the non-active patients and healthy group similar than previous results from our laboratory (31). In fact, we did not find hyperprolactinemia in any inactive SLE patients supporting the idea that PRL is playing a role in the disease activity. We found as well an association between CD69 expressions with disease activity in the SLE patients probably as reflection of the immune system activity; similar than previous report (9, 11). Surprising the amount of active immune cells measured through CD69 and CD154 expression in SLE patients at moment than the samples were taken (basal) were less than 2% of the cells, it probably denote amount of auto-reactive immune cells in the disease.

Previous research suggests that the hyperprolactinemic state could activate the immune system (23, 24). In contrast, a low level of PRL has been associated with deficient immune response (34). The current study was carried out using cells from active and inactive SLE patients emulating a micro-environment with or without PRL in order to discriminate the activity of pituitary and lymphoid prolactine in the immune cells activation process. The original expectation was that the human PRL (pituitary) could trigger the lymphocyte activation especially in inactive SLE patients or perpetuate the immune cells activation in cells from active SLE patients. In contrast, we found that the hPRL by itself is not capable to induce activation in cells from SLE patients and healthy subject. The hPRL activity was found just after the trigger the immune response (in this case with unspecific mitogen). In the performed experiments the PRL has autocrine and paracrine compartment similar to those previous reported in the literature (28, 29). Moreover, the cells from the immune system were capable to produce and secreted PRL similar than previous research's (28, 29).

The observation that suggest that the PRL through its receptor play a role as grow factor are the hybridomas proliferation and the additive effect in the proliferation assay using mitogen or antigen in immune cells from both human and mice (35, 36). Our results validate that the immune cells are capable to produce and secrete prolactine and this production is related with the amount of activation because we found doses response between PBMNC proliferation with the amount of PRL in the supernatant and at the mRNA levels. In the supernatant we found a correlation among the time of collection after the cell activation (0, 1, 2, and 3 h.) with PRL concentrations (0, 45.8, 26.2 and 63.4 pg/ml respectively), supported by the result obtained with RT-PCR and Dot Blotting where the amount of mRNA from PBMNC stimulated with unspecific mitogen increase along the time. Moreover, the mRNA for prolactine and its receptor were found in cells without stimulus suggesting that the PRL is constitutive of the lymphocyte and in the measure that the cell acquire activation his production and secretion is increased

The central axle in the immune response is the trigger, which is initiated normally antigen presentation of antigenic peptides bound to class I or II MHC molecules to the T cell receptor, by professional antigen-presenting cells (6, 7). This interaction is not enough to fully activate naïve T cells a subsequent non-antigen-specific co-stimulatory signal are necessary to produce an adequate activation. Both moments are relevant because is when the specificity and the magnitude of the immune response is determined. Here the objective was to explore the role of PRL in the immune cells activation, using *in vitro* model described above. The status of activation was measured through the expression of CD69 and CD154. These molecules provided the second signal in the cell activation process by the interaction of CD28 on the T cell. This signal promotes growth, differentiation, survival and isotype switching on B cells. Our results shown that human prolactine added to cells from SLE patients (active or inactive) do not increase the expression of CD69 and CD154. Likewise, the lymphocytes obtained from SLE patients and healthy subject had a similar patter of immune response. In contrast, the depletion of prolactine produced by the lymphoid with anti-PRL antibodies shows a decreased expression in the activation mark molecules in about ~50%, indicating that PRL has participation in a step between the trigger (antigen presentation) and co-stimulatory signal in the immune cells activation and

it could be the explication why the SLE patients with autoantibodies against prolactine has less disease activity (31). Moreover, clearly show that PRL used in the activation process is secreted by the lymphocyte itself. This result is comparable to those experiment carry out with tirocytos where PRL stimulus alone does not change the HLA-DR and CD40 expression (37). These findings are difficult to understand in the context of the literature information because in knockout mouse for PRL not shows any evident abnormalities in the anatomy, in the development in B and T cell and the innate immunity (38). However, adaptive immune response, where most of the effects of PRL have been demonstrated including our results was not studied in the knockout mouse (38). Moreover, in our laboratory we have found that the deletion of PRL with anti-PRL antibody also produces a striking reduction in the secretion of IL-2 and IFN γ by CD4⁺ supporting this results (submitted).

T cell activation is a fundamental step for the onset of the adaptive immune response. This is characterized by profound alterations in cell surface expression of activation and adhesion molecules: increased CD69, CD25, CD40L, FAS-L and CD44 and decreased CD62L and CD45R expression. Some of these changes are necessary for T cells to enter and progress in the cell-cycle (5); these alterations in the outer membrane are observed in lymphocyte from SLE patients probably as a mirror image of the immune system activation. Moreover, some of these changes are related with the disease activity as CD69 expression (9, 11). In fact we found an increased CD69 expression in active SLE patients compared with no active patients and healthy subject before the culture. In the stimulated culture decreased the CD69 expression with the addition of anti-PRL antibody was observed, this reduction was due to PRL depletion and no for another causes because when the binding site on antibody against PRL was engaged with PRL a restored expression of CD69 was observed. In the same fashion, the addition of non-related antibody no affect CD69 expression demonstrating at list that in our model the reduction of the CD69 expression was due to the blocking of prolactine produce by the lymphocyte and not for the possible activity of the Fc antibody portion or immune complex of antibody-PRL.

Further studies are necessary in order to determine the steps and signal where the PRL have action in T cell activation. This model display clearly that the hPRL do not trigger the immune response in resting human cells. However, after the initial stimulus the PRL appear to play a role in order to continue the event of activation like co-stimulatory molecule expression and interleukin secretion necessary for fully response. In addition, the PRL that take effect in the immune response is produced and secreted by the lymphocytes. It could suggest that the hyperprolactinemic states in lupus patients could be secondary in part by the immune cell activation like has been suggested for other hormones (39). In contrast, in agreement with our model the hyperprolactinemic state is not capable initiate the immune cells activation. Moreover the SLE patients with autoantibodies against PRL that display a less clinical manifestation than those without antibodies, could be probably because it antibodies are blocking the prolactine in a similar manner than our *in vitro* model (31, 32).

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT): grant # 34454-N. We would like to thanks to Dr. A.F. Parlow from the National Hormone & pituitary program Harbor-UCLA Medical Center for the donation of human PRL (hPRL) and polyclonal antibody against to prolactine.

References

1. TAN EM, COHEN AS, FRIES JF. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-77.
2. BOMBARDIER C, GLADMAN D, UROWITZ M, CARON D, CHANG CH The Committee on Prognosis Studies in SLE: Derivation of the SLEDAI: A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
3. BLANCO F, KALSI J, ISENBERG DA. Analysis of antibodies to RNA in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic disease. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 66-70.
4. BLANCO F, KALSI J, RAVIRAJAN, SPEIT P, BRADWELL AR, ISENBERG DA. IgG subclasses in systemic lupus erythematosus and other rheumatic disease. *Lupus* 1992; 1: 391-99.
5. KELSOE G. The germinal center. A crucible for lymphocytes selection. *Semin Immunol* 1996;8:179-84.
6. DING L GREEN JM, THOMPSON CB, SHEVACH EM. B7/CD28 dependent and independent induction of CD40 ligand expression. *J Immunol* 1995;155:5124-32.
7. GREWAL IS, FLAVELL RA. The role of CD40 ligand in co stimulation and T cell activation. *Immunol Rev* 1996;153:85-106.
8. TESTI R. D'AMBROSIO D., DE MARIA R. AND SANTONI A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for haematopoietic cells. *Immunol Today* 1994. 15: 479-83.
9. ATZENI F, DEL PAPA N, SARZI-PUTTINI P, BERTOLAZZI F, MINONZIO F, CAPSONI F. CD69 expression on neutrophils from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:331-4.
10. GONZALEZ-AMARO R, PORTALES-PEREZ D, BARANDA L, ABUD-MENDOZA C, LLORENTE L, RICHAUD-PATIN Y, ALCOCER-VARELA J, ALARCON-SEGOVIA D. Role of IL-10 in the abnormalities of early cell activation events of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1998;11:395-402.
11. CRISPIN JC, MARTINEZ A, DE PABLO P, VELASQUILLO C, ALCOCER-VARELA J. Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1998;2:196-200.
12. MOSZKORZOVA L, LACINOVA Z, MAREK J, MUSILOVA L, DOHNALOVA A, DOSTAL C. Hyperprolactinaemia in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:807-12.
13. BLANCO-FAVELA F, QUINTAL-ALVAREZ G, LEAÑOS-MIRANDA A. Association between prolactin and disease activity in SLE. Influence of statistical power. *J Rheumatol* 1999;26:55-9.
14. LAVALLE C, LOYO E, PANIAGUA R. Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987;14:268-72.
15. JARA LJ, GOMEZ-SANCHEZ C, SILVEIRA LH, MARTINEZ-OSUNA P, VASSEY FB, ESPINOZA LR. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Am J Med Sci* 1992;303:222-26.

16. BUSKILA D, LORBER M, NEUMANN L, FLUSSER D, SHOENFELD Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996;23:629-32.
17. PAUZNER R, UROWITZ MB, GLADMAN DD, COUGH J. Prolactin in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994;21:2064-67.
18. NEIDHART M. Elevated serum prolactin or elevated prolactin/cortisol ratio are associated with autoimmune processes in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1996;23:476-81. OSTENDORF B, FISCHER R, SANTEN R, SCHMITZ-LINNEWEBER B, SPECKER CH, SCHNEIDER M. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus? *Scand J Rheumatol* 1996;25:97-102.
20. BUSKILA D, BEREZIN M, GUR H, ALOSACHIE Y, TERRYBERRY JW, BARKA N, SHEN B, PETER JB, SHOENFELD Y. Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. *J Autoimmun* 1995;8:415-24.
21. RUIZ-IRASTORZA G, LIMA F, ALVES J, KHAMASHTA MA, SIMPSON J, HUGHES GR, BUCHANAN NM. Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium: A prospective study of 78 pregnancies. *Br J Rheumatol* 1996;35:133-8.
22. Folomeev M, Prokaeva T, Nassonova V. Prolactin levels in men with SLE and RA. *J Rheumatol*. 1990;17:1569-70.
23. MCMURRAY R, KEISLER D, KANUEKEL K, IZUI S, WALKER SE. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J Immunol* 1991;147:780-87.
24. MCMURRAY RW, KEISLER D, IZUI S, WALKER SE. Hyperprolactinemia in male NZB/NZW (B/W) F1 mice: accelerated autoimmune disease with normal circulating testosterone. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71:338-43.
25. BERNTON EW, MELTZER MS, HOLADAY JW. Suppression of macrophage activation and T lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science* 1988;239: 401-4
26. CLEVINGER CV, FREIER DO, AND KLINE JB. Prolactin receptor signal transduction in cell of the immune system. *J Endocrinol* 1998;157:187-97
27. RUSSEL DH, MATRISIAN L, KIMBLER R, LARSON DF, POULOS B, MAGUN BE. Prolactin receptor on human lymphocytes and their modulation by cyclosporine. *Biochem Bioph Res Co* 1984;121:899-906
28. CLEVINGER CV, RUSSEL DH, APPASAMY PM, PRYTOWSKY MB. Regulation of IL-2 driven T lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc Nat Acad Sciences (USA)* 1990;87:6460-64.
29. HARTMANN DP, HOLODAY JW, BERNTON EW. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB* 1989;3:2194-2202 .
30. MATERA L, CESANO A, BELLONE G, OBERHOLTZER E. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen induced activity of T, B and NK lymphocyte. *Brain behav immun* 1992;6:409-17.
31. LEAÑOS-MIRANDA A, PASCOE-LIRA D, CHAVEZ-RUEDA K, BLANCO-FAVELA F. Anti-prolactin antibodies in systemic lupus erythematosus patients; Frequency and correlation with prolactinemia and disease activity *J Rheumatol* 2001;7:1546-53.

32. BLANCO-FAVELA F, QUINTAL MA G, CHAVEZ-RUEDA K, LEAÑOS-MIRANDA A, BERRON-PEREZ R, VACA RUIZ V, LAVALLE-MONTALVO C. Anti-prolactin autoantibodies in pediatric systemic lupus erithematosus patients. *Lupus* 2001;11:803-8.
33. TANAKA T, SHIU RPC, GOUT PW, BEER CT, NOBLE RL, FRIESEN HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormone measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*1980; 51, 1058 – 63.
34. BERCZI I, NAGY E, KOVACS K, HORVATH E. Regulation of humoral immunity in rat by pituitary hormone. *Acta endocrinol* 1981;98;506-13.
35. DARDENNE M, LEITE DE MORALES MC, KELLY PA AND GAGNERAULT MC. Prolactin receptor expression in human haematopoietic tissues analysed by flow cytofluorometry. *Endocrinology* 1994;134:2108-14.
36. RICHARDS SM, GARMA RD, KEYES L, KAVANAGH B, & MCPHERSONN JM. Prolactin in an antagonist of TGF-b activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol* 1998;184:85-91
37. LI J, TENG W, SHAN Z. Effect of prolactin on HLA-DR and CD40 expressions by human thyrocytes. *Chin Ned J* 2001;114:1151-6
38. HORSEMAN ND, ZHAO W, MONTECINOS RODRIGUEZ E, TANAKA M, NAKASHIMA K ENGLE SJ, SMITH F MARKOFF E & DORSHKIND K. Defective Mammopoiesis, but normal haematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactine gene. *EMBO* 1997;16: 6926-35.
39. CUTOLO M, CAPELLINO S, MONTAGNA P, VILLAGGIO B, SULLI A, SERIOLO B, STRAUB RH. New roles for estrogens in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21:687-90

Legends

Table 1: Demographic data and clinic characteristic of 27 patients with SLE. The clinical data are those that the patients display in some moment a long the history of the disease in both groups of patients (actives and inactive). At time than the sample were taken the treatment of 100% of the patients were with cloroquine (2.5 mg/Kg) and prednisone (10-20 Mg) none of the SLE patients had immuno-suppressor drug.

Figure 1: Serum prolactine levels measure by Nb2 assay in inactive and active SLE patients compared with a group of healthy individuals. The concentration is represents in ng/ml.

Figure 2: The percentage of CD69 and expression CD154 in cells from SLE patients and healthy controls for the moment in which the sample was taken. The expression of CD69 was in CD4⁺ whereas CD154 were stained on PBMNC. We find statistically significant differences ($p < 0.05$) between the active patients with SLE compared it with inactive patients and healthy controls.

Figure 3: mRNA for prolactine visualized by Dot Blotting in the figure 3a; the expression of RNA was found in cells at baseline time (without stimulus). After the stimulus appear to increase the amount of mRNA for prolactine. The figure 3b display the mRNA for PRL receptor here the amount of RNA do not increased after the stimulus.

Figure 4: PBMNC from actives, inactive SLE patients and controls culture under different conditions: culture with synthetic medium, with human pituitary PRL, with mitogen, with hPRL plus mitogen or with mitogen plus anti-PRL antibodies in order to block the prolactine produced by the lymphocytes. Statistically significant differences were found in the response to mitogen between active patients compares with inactive SLE patients and healthy individuals ($p < 0.005$). The performance was close similar in the three groups studied, statistically significant differences were found between the responses to mitogen compared with those cultures were prolactine was block ($p < 0.005$).

Figure 5a: Inhibition test where the binding site of anti-PRL antibody was engaged with 12, 25, 50 and 100 ng/ml of hPRL. Statistically significant differences were found in the inhibition of CD69 expression with the antibody alone and with the complex of antibodies plus 12 ng/ml hPRL ($p < 0.005$). In contrast we did not find statistically significant differences with the complex formed by anti-prolactine antibodies and 25, 50 and 100 ng/ml hPRL. The Figure 5b: is an example of the Flow cytometry analysis with double staining CD4/CD69 stimulating with mitogen, blocking the prolactine with anti-PRL antibody and with non related antibodies.

Figure 6: PBMNC from actives, inactive SLE patients and healthy subject culture under different conditions: with synthetic medium, with hPRL, with mitogen, with hPRL plus mitogen or with mitogen plus anti-PRL antibodies in order to block the lymphoid prolactine. Statistically significant differences were found in the response to mitogen between cells from inactive SLE patients and healthy controls compared with the response found in cells from active SLE patients ($p < 0.005$). In the three groups statistically significant differences were found ($p < 0.005$) between the responses to mitogen compared with those cultures where the prolactine was blocked.

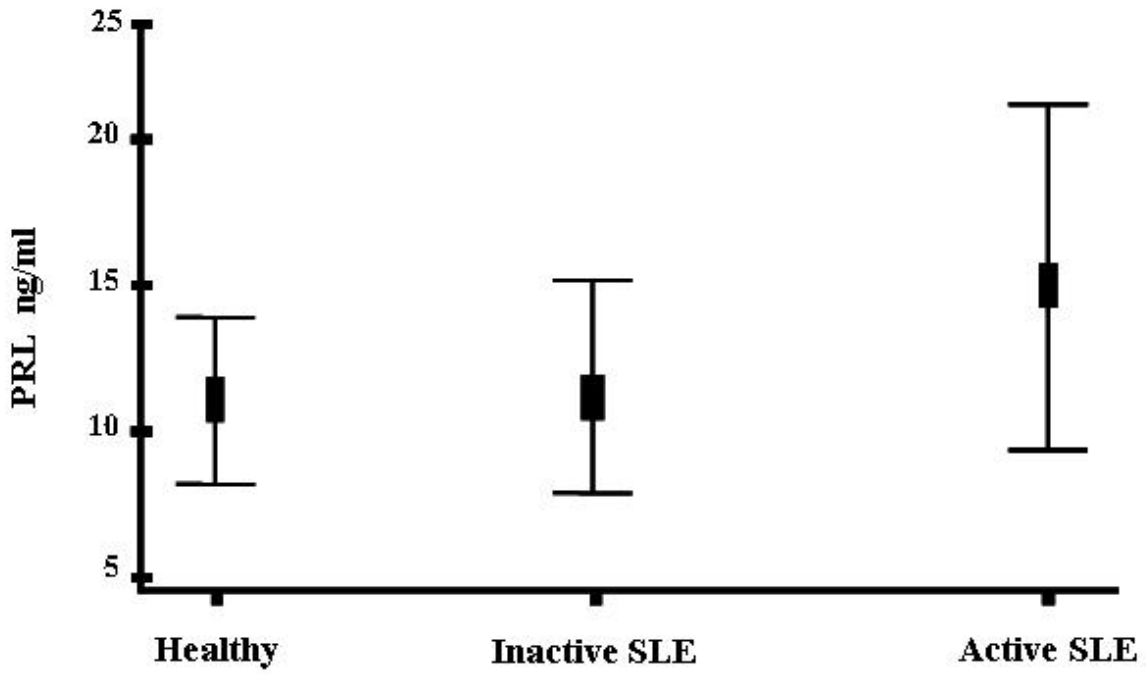


Figure 1

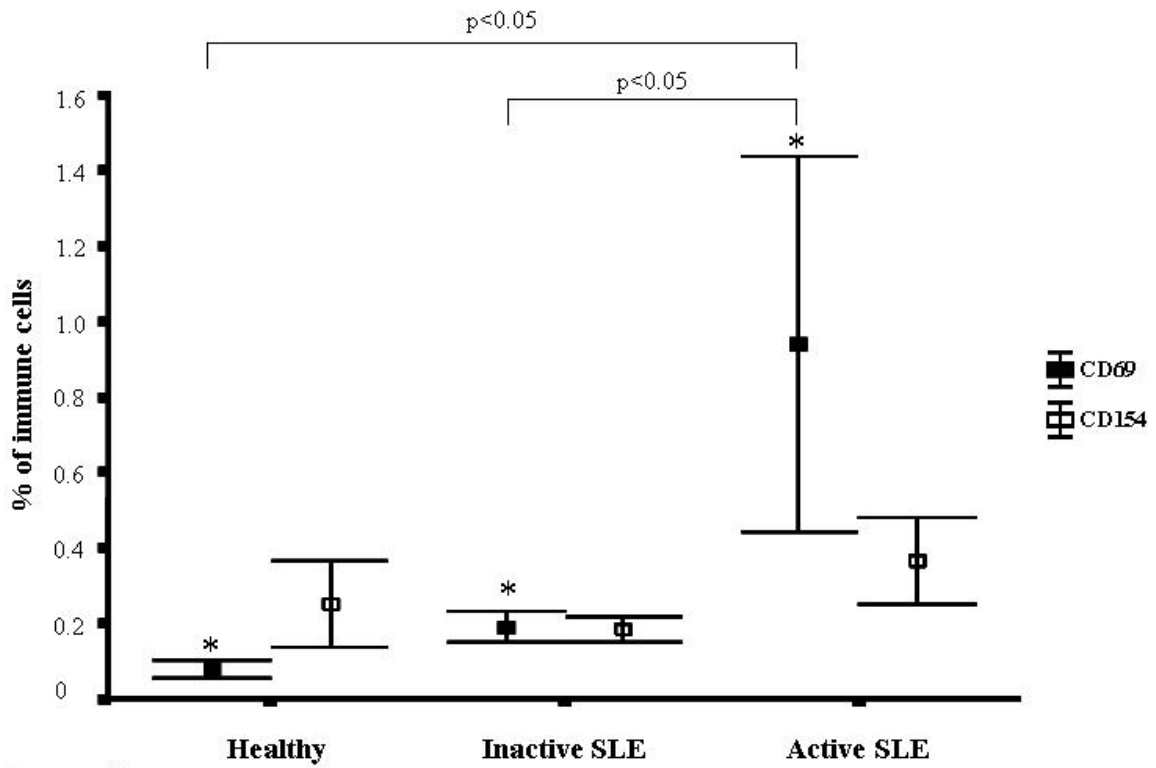


Figure 2

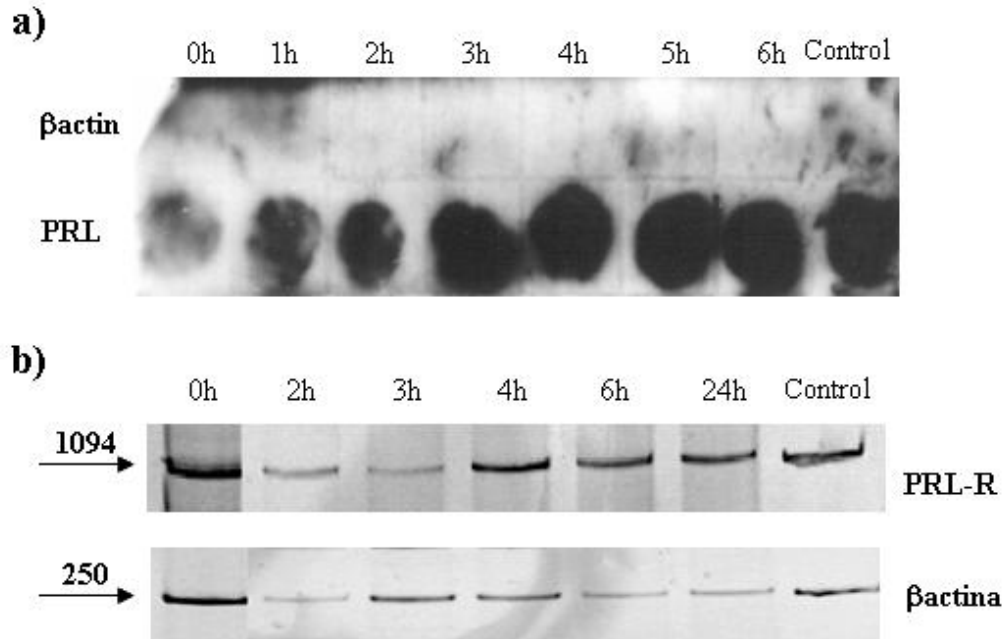


Figure 3

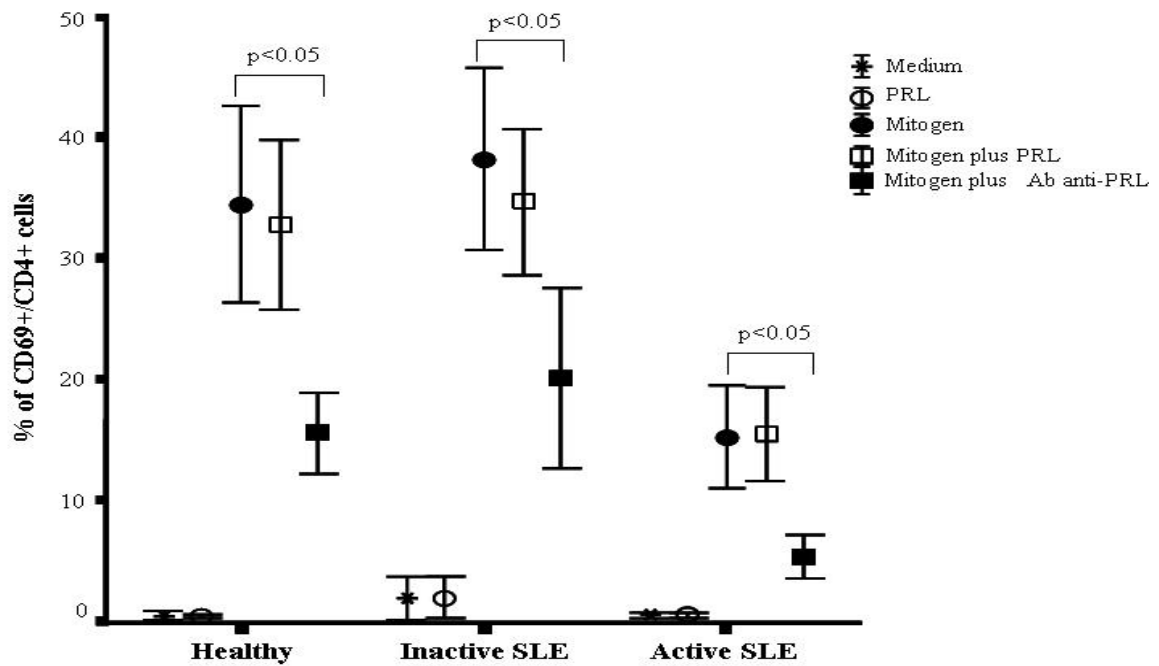


Figure 4

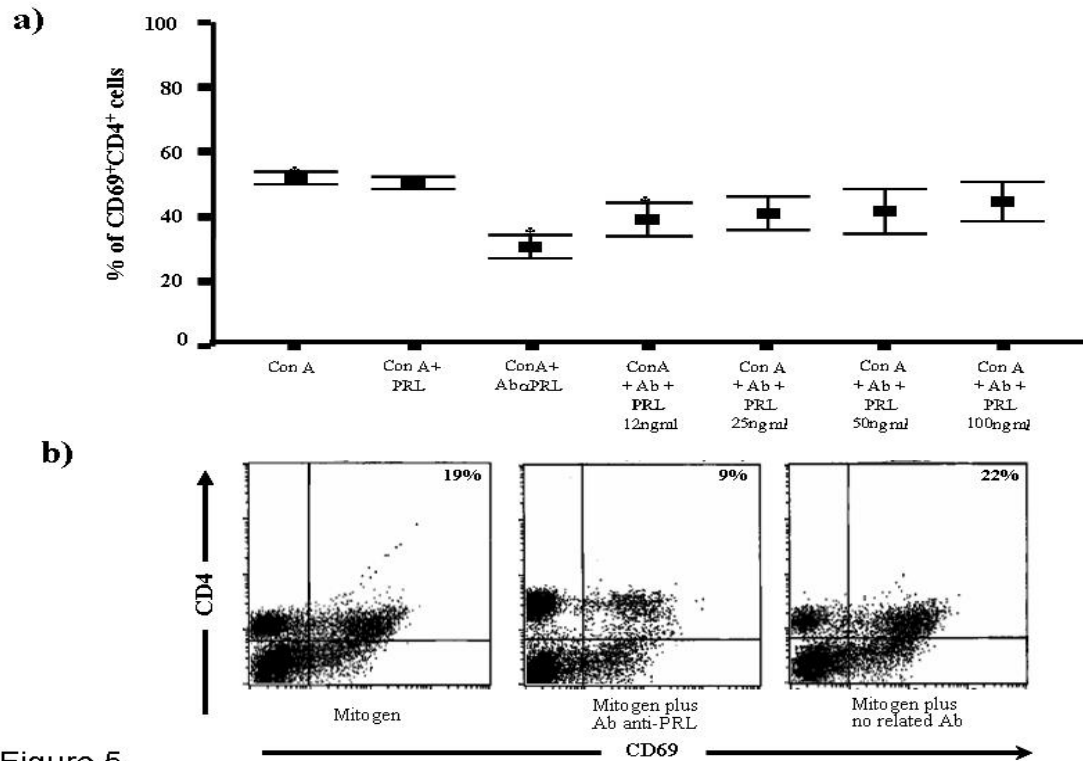


Figure 5

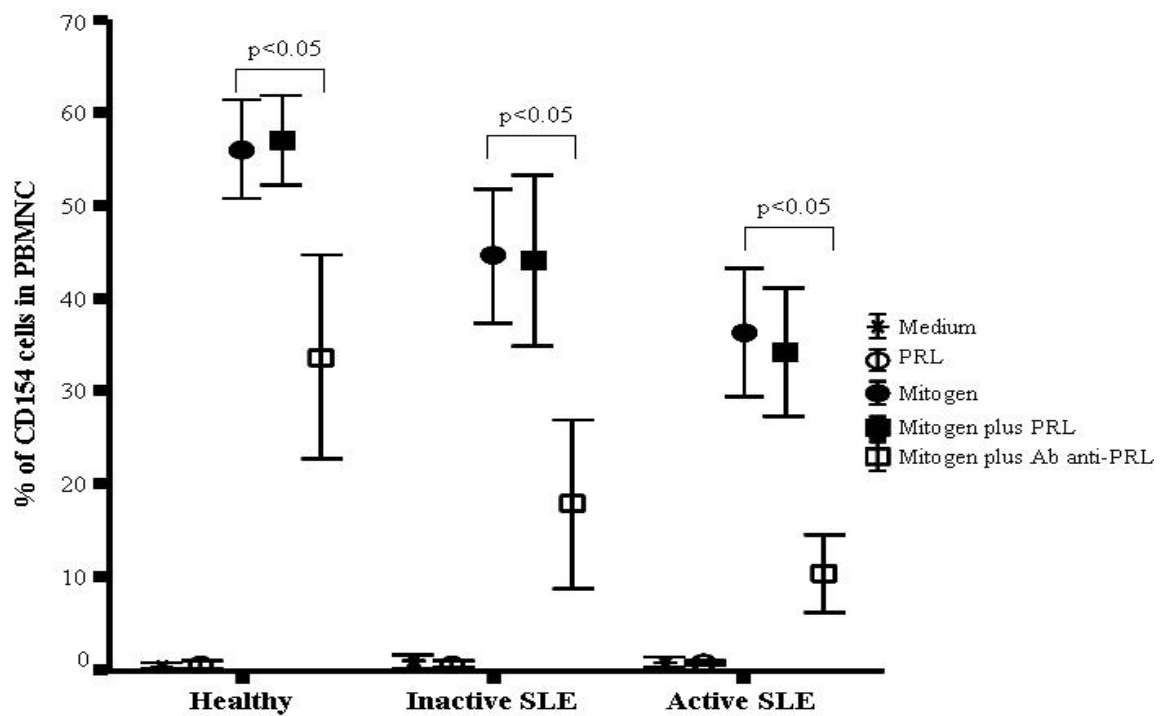


Figure 6