



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EXPRESION DEL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LINFOCITOS B
PROVENIENTES DE RATONES CON LUPUS ERITEMATOSO
SISTEMICO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:
EDNA IRAIS ROSAS TENORIO

DIRECTOR: DRA. ADRIANA KARINA CHAVEZ RUEDA
ASESOR: Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLAN

MEXICO D.F.

NOVIEMBRE 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Bajo la Dirección de la Dra. Adriana Karina Chávez Rueda

Esta Investigación fue financiada por CONACYT (49798) y el Fondo para el Fomento de la Investigación Médica (FOFOI) IMSS (2006/1AI/003)

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Karina Chávez porque con paciencia comparte sus conocimientos y tiempo. Por ser ejemplo de mujer inteligente... para ti mi admiración.

Al Dr. Blanco el que siempre tiene el comentario preciso para cualquier tema o situación. Y porque aun recuerdo su cátedra sobre la investigación el primer día que llegue a la unidad.

A todo el laboratorio, especialmente a Yadira (mi otra maestra), siempre sencilla y considerada. Vicky, Luis y Alicia.

A mi honrosa UNAM, jamás acabaría de enlistar todo lo que me dió.

A mis maestros (ahora Sinodales), Paty Vidal la mujer que no se conforma y busca más y sobre todo por su amistad. Al Dr. Rubén Marroquín una verdadera eminencia en Inmunología.

Y a los que no fueron mis maestros pero me dedicaron su tiempo con sus valiosas observaciones; M en C. Araceli García y M.C. Maurilio Flores.

DEDICATORIA

Antes que a todos al responsable de que este aquí, GRACIAS DIOS porque tu amor y ejemplo me hacen fuerte.

A mi Mami (Silvia Tenorio), hermosa mujer, todo esto es por ti y para ti. Porque siempre fuiste fuerte y nunca nos dejaste caer. TE AMO.

A mis hermanos Itzel, Alfonso, Melani, Rosalba y Gabriel. Por ser mi ejemplo y apoyo... porque siempre estemos juntos con los sobrinos Ary & Adrian (y los que nos faltan). LOS QUIERO.

A toda LA BANDA... por todos los buenos tiempos y la amistad que compartimos.

A mis muertos... porque sin ustedes nunca hubiera entendido el verdadero significado de la vida. SER FELIZ HOY.

TABLA DE CONTENIDO.

INTRODUCCION	3-11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15-21
• Animales	15
• Nivel de Bioseguridad	15
• Cuantificación de Proteinuria	16
• Obtención de suero de Ratón	16
• Obtención de Células de Bazo	17
• Purificación de Linfocitos B	18
• Extracción de RNA a partir de Células B de Ratón	18
• Transformación de RNA a cDNA	19
• PCR tiempo real para la amplificación del PRL-R a partir de Células B	19
• ELISA PRL	20
• ELISA anti-DNA	21
• Análisis Estadístico	21
DIAGRAMA DE FLUJO	22
RESULTADOS	23-27
DISCUSION	28-30
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	32-36
ABREVIATURAS	37

INTRODUCCIÓN.

La prolactina (PRL) es una hormona lactogénica que es sintetizada y secretada por las células de la parte anterior de la hipófisis ⁽¹⁾, se conocen alrededor de 300 actividades biológicas que se pueden agrupar en cinco distintas categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) desarrollo y crecimiento, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos e 5) inmunorregulación ⁽²⁾. La secuencia de aminoácidos de la PRL es similar a la de la hormona lactógeno placentaria (PL) y hormona del crecimiento (HG), debido a la existencia de esta homología comparten características genómicas, estructurales e inmunológicas que nos permite agruparlas en la familia de proteínas llamada PRL/GH/PL ⁽¹⁻³⁾.

La síntesis y la secreción de la PRL dependen de un mecanismo de retroalimentación tónico. La secreción es estimulada por los estrógenos, serotonina, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, antagonistas dopaminérgicos (clorpromazina metoclopramida, etc.), interleucina (IL) 1, embarazo, estimulación del pezón y estrés, mientras que la dopamina y sus agonistas como la bromocriptina inhiben su secreción ^(2,3).

El gen que codifica para la PRL en el humano (hPRL) se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y esta compuesto de cinco exones y cuatro intrones con un peso aproximado de 10kp (914 nucleótidos) ^(2,4), este gen es regulado a nivel transcripcional por dos distintos promotores. El promotor proximal (promotor hipófisiario) y el promotor extrahipófisiario, el gen se encuentra en distintos tipos celulares como: neuronas, células del epitelio mamario, tumorales, timocitos, esplenocitos, fibroblastos, etc ^(2,3). EL mRNA de la PRL tiene una longitud de 1Kb y codifica para una proteína de 227 aminoácidos, que incluye un péptido señal (28 residuos), que es eliminado de la proteína al entrar al retículo endoplásmico. La proteína presenta una conformación estructural de α hélice ^(2,4,5) (Figura 1) y esta formada por una cadena de 199 residuos de aminoácidos (23 kDa) con tres puentes disulfuro que se forman intramolecularmente entre seis residuos de cisteína ^(2,4,6).

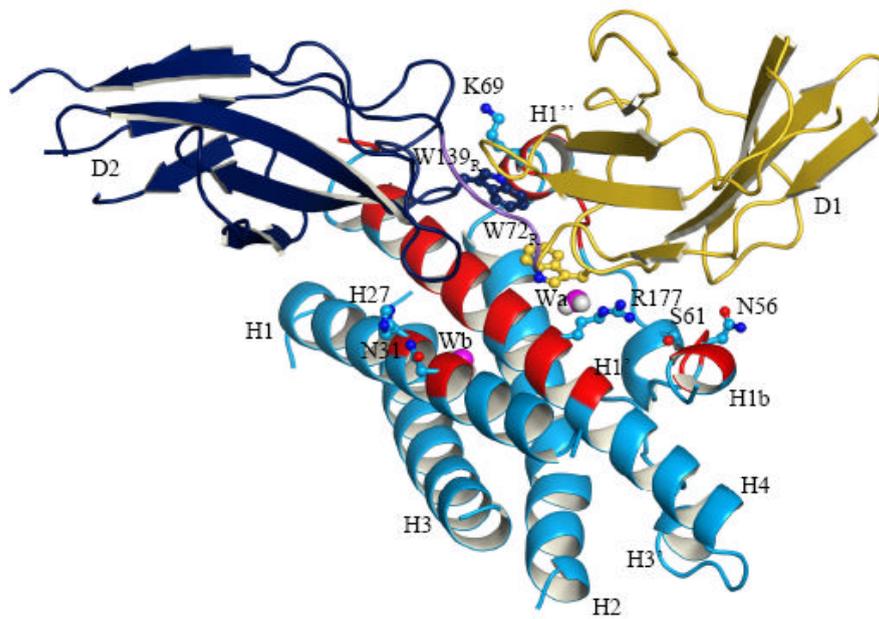


Figura 1. Estructura tridimensional del hPRL ⁽⁶⁾.

Las diferentes isoformas de la PRL resultan de las modificaciones post-transcripcionales (proceso de splicing alternativo de los exones), post-traduccionales como los diferentes cortes de la proteína (16 kDa) ó por modificaciones en su cadena de aminoácidos como la dimerización, polimerización (causantes de las macroprolactinas), fosforilación, glicosilación (25 kDa) y sulfatación además de su interacción con otras proteínas como los anticuerpos (big big PRL de 150 kDa) ^(7,8).

El receptor de la PRL (PRL-R) en humanos, es una proteína transmembranal, su gen se encuentra en el cromosoma 5 y codifica para tres diferentes isoformas (Figura 2), 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 diferentes isoformas exhiben un dominio extracelular idéntico, con aproximadamente 200 aminoácidos (aa). Este dominio se divide en dos subdominios (cada uno de ~100 aa) con características conservadas a los receptores de citocinas tipo 1 ^(2,4,9). En ratón se han descrito una isoforma larga y tres cortas ^(2,6,9).

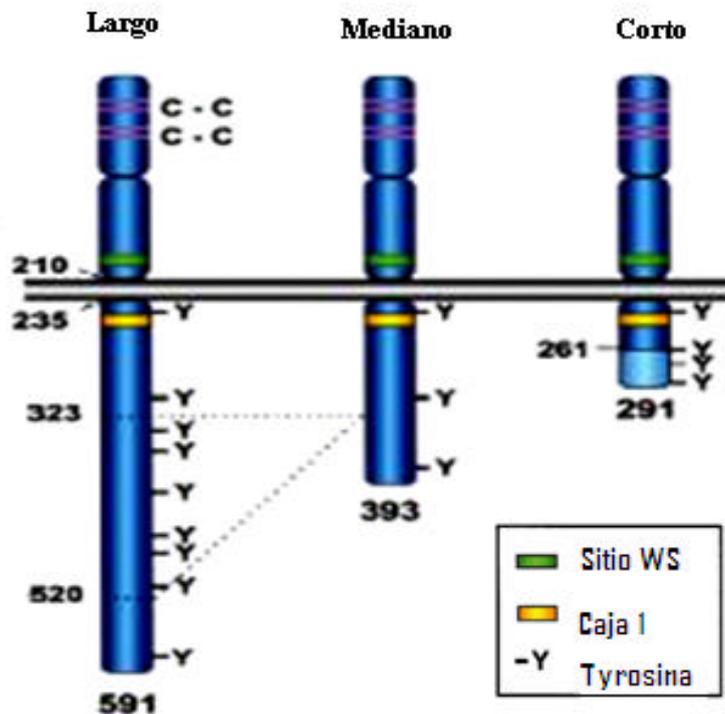


Figura 2. Representación esquemática de las tres isoformas del receptor de prolactina. El dominio extracelular idéntico dividido en dos sub-dominios, la porción intracitoplasmática difiere en tamaño y composición ⁽³⁾.

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 aminoácidos, mientras el intracelular presenta diferente tamaño y composición dependiendo de ello 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 ^(2,4,9).

La interacción PRL – PRL-R activa principalmente la vía de señalización Jak - Stat (Figura 3), 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 dimerización 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 heterodímero que es translocado al núcleo activando el dominio de unión a DNA; la secuencia que reconoce el 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^(2,3,9-13). 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^(2,3). El PRL-R 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.

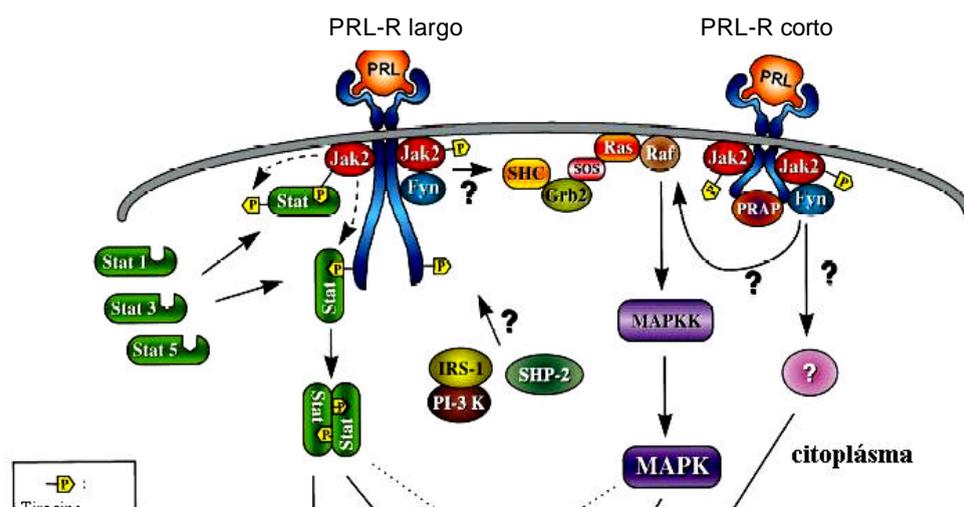


Figura 3. Representación esquemática del camino de señalización del receptor de prolactina de rata (largo y corto) ⁽³⁾.

El sistema inmune es capaz de participar en la regulación de la secreción de prolactina. Las citocinas IL-1, IL-6, TNF- α pueden actuar como reguladores parácrinos o endocrinos en la liberación de PRL hipofisiaria ⁽¹⁴⁾. La relación entre prolactina y el sistema inmune se evidenció en 1930, cuando Smith observó atrofia de timo en ratas hipofisectomizadas ⁽¹⁵⁾. Tiempo después, Nagy y Berci, reportaron la inmunodeficiencia en ratas hipofisectomizadas, en las cuales al administrar PRL, HG y PL, se reestableció su actividad inmunológica y en 1983 se repitieron estos experimentos con bromocriptina (agonista dopaminérgico) para inhibir selectivamente la secreción de prolactina, los resultados fueron similares, disminución en la respuesta inmune tanto celular como humoral, recuperándose al suspender la bromocriptina ⁽¹⁶⁾.

Existe suficiente información que demuestra la participación de la PRL en la respuesta inmune. Los linfocitos son capaces de sintetizar y secretar PRL, la cual tiene actividad biológica mediada por bioensayos en células Nb2 ⁽¹⁷⁾, esta PRL puede actuar como un factor de crecimiento para las células en una forma autócrina y parácrina ⁽¹⁸⁾. Los linfocitos expresan alrededor 360 receptores de PRL y las células NK de 660 ⁽¹⁹⁾. La PRL induce la transcripción del factor regulador de interferón 1 (IRF-1), que es importante en la diferenciación y maduración de linfocito B y T. Además de ser requeridos en la respuesta Th1 (IFN?) ⁽¹⁴⁾. También interviene en la producción de superóxido en macrófagos, la expresión de CD69 y CD154 en linfocitos CD4+ ⁽²⁰⁾, incrementa la secreción

de anticuerpos IgG e IgM en hibridomas⁽²¹⁾, aumenta la proliferación celular de esplenocitos, timocitos y células mononucleares al incubarse con Concaivalina A (Co A). Además los anticuerpos anti-PRL son capaces de inhibir la proliferación de células mononucleares estimuladas con CoA⁽²²⁾.

La inducción de hiperprolactinemia en ratones aumenta la respuesta humoral⁽²³⁾ y los bajos niveles de ésta, se han asociado con atrofia en timo (inmunodeficiencia). Evidencias recientes han demostrado el papel de la PRL en la expresión clínica y en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, principalmente en LES.

LES es una enfermedad reumática autoinmune de etiología desconocida, se ha asociado con factores genéticos, ambientales, infecciosos, inmunológicos y hormonales⁽²⁴⁾ que desempeñan un papel importante en la regulación de la tolerancia inmunológica y en la formación de autoanticuerpos⁽²⁵⁾. Afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva con una relación mujer/hombre de 10:1, este predominio al sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de las hormonas. Además tiene una tendencia a exacerbarse o presentarse durante el embarazo, cuando los niveles séricos de PRL están elevados^(26,27). Estudios realizados en familiares y gemelos idénticos, sugieren predisposición genética hasta en un 12% de pacientes con LES que tienen un pariente de primer grado con la misma enfermedad y existe mayor concordancia entre gemelos idénticos (60%) que en gemelos no idénticos (9%). Se ha reportado también asociación entre las moléculas de clase I y II del HLA, especialmente con B8, DR2 y DR-3⁽²⁸⁾. Entre los factores ambientales que pueden desencadenar la enfermedad destacan la exposición a luz UV-β, metales pesados, alimentos como semillas o germen de alfalfa, fármacos del tipo de procainamida, hidralaza, metildopa clorpromazina, etc. Los agentes infecciosos virales y bacterianos han sido relacionados con el desarrollo de la autoinmunidad a través de mecanismos como mimetismo y/o reactividad cruzada que pueden dar lugar a una falla de la tolerancia inmunológica o a un estímulo anormal de la respuesta inmune⁽²⁸⁻³⁰⁾.

LES presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas y alteraciones inmunológicas, las cuales están caracterizadas por anomalías tanto en linfocitos B como en T, especialmente durante la actividad de la enfermedad. El suero de los pacientes con LES se caracteriza por la reactividad que presenta a gran variedad de autoantígenos, particularmente a nucleoproteínas, entre estos autoanticuerpos se encuentran los que se unen a ADN, ARN, Sm, RNP, LA, Ro é histonas que han sido extensamente estudiados ⁽³¹⁾. Algunos autoanticuerpos como anti-dsDNA y anti-Sm muestran especificidad para LES, otros autoanticuerpos están asociados con manifestaciones particulares de la enfermedad. Por ejemplo, los auto-anticuerpos anti Ro están asociados al lupus cutáneo subagudo, lupus neonatal y lupus seronegativo y los anticuerpos anti-La están presentes en los pacientes con LES que tienen Síndrome de Sjögren ^(24,29-31).

Se han utilizado modelos murinos para tratar de entender mejor la enfermedad. Las cepas de ratones utilizadas son NZB/NZW, BxSB, MRL/MpJ y MRL/MpJ-Fas^{lpr}, que presentan una enfermedad semejante a LES en humanos ^(32,33).

La cepa MRL/MpJ (MRL) proviene de una cruce de ratones C57BL/6, C3H/HeDi, AKR/J y LG/J, durante la cual se presentó una mutación espontánea del gen Fas en la 12^a generación obteniéndose así la cepa MRL/MpJ-Fas^{lpr} (MRL/lpr). Clínicamente presentan depósitos de complejos inmunes, vasculitis, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, producción de anticuerpos anti-nucleares principalmente aquellos dirigidos contra ADN y glomérulo que a menudo es la causa de muerte temprana (50% en 6 meses para la cepa MRL/lpr y 50% en 17 meses para la cepa MRL/MpJ) ⁽³⁴⁻³⁶⁾. La cepa MRL/lpr ha servido para demostrar la importancia de los linfocitos B en el desarrollo de LES ya que los ratones deficientes de linfocitos B muestran una enfermedad menos agresiva (disminución de glomerulonefritis, vasculitis y linfocitos T), en comparación con los ratones que presentan linfocitos B ^(37,38).

Cabe mencionar que en los modelos murinos de lupus las hembras desarrollan la enfermedad más temprano que los machos y su vida media es menor, además el tratamiento con prolactina exagera la actividad de la enfermedad y causa una mortalidad temprana, lo que sugiere la importancia de la PRL en la enfermedad ^(39,40).

Ratones NZB/NZW a los que se ha inducido un estado de hiperprolactinemia producen altos niveles de anticuerpos anti-ADN, hipergamaglobulinemia, depósitos autoinmunes en riñón provocando muerte prematura. ⁽³⁹⁾ En contraste estos animales tratados con bromocriptina (agonista dopaminérgico) muestran una disminución de anticuerpos anti-ADN y aumento en la supervivencia ^(45,46). Los ratones transgénicos BALB/c R4A- γ 2b (transgénicos para un anticuerpo patógeno dirigido contra ADN), no desarrollan lupus ni presentan linfocitos autoreactivos. Sin embargo, al inducirles hiperprolactinemia moderada, el número de linfocitos B autoreactivos incrementa, así como el número de anticuerpos anti-ADN y depósitos de complejos autoinmunes en glomérulo, demostrando que la PRL es capaz de romper la tolerancia e inducir autoinmunidad ⁽⁴⁷⁾.

En humano se han relacionado los niveles altos de PRL con la actividad de la enfermedad, entre 15 - 30% de los pacientes con LES presentan hiperprolactinemia, en comparación con sujetos sanos (1.3%) ^(26,41-44). Se han reportado anticuerpos anti-PRL en pacientes con LES que presentan hiperprolactinemia, lo que evita la unión de PRL a su receptor ⁽⁴⁵⁾. Un estudio que analizó la presencia de isoformas circulantes de la PRL en pacientes con LES e hiperprolactinemia idiopática, mostró que los pacientes con autoanticuerpos anti PRL (con predominio de la forma molecular big big PRL de 150 KDa), tuvieron menor actividad clínica y serológica de la enfermedad que los pacientes sin autoanticuerpos anti-PRL (con presencia exclusiva de la forma de 23kDa) ⁽⁸⁾. Por lo que nos parece importante explicar la expresión del PRL-R en linfocitos B de modelos murinos autoinmunes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad reumática autoinmune que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos y linfocitos B autoreactivos, tiene una tendencia de inicio o exacerbación durante el embarazo, condición que se acompaña de niveles elevados de PRL. Entre el 15-30% de los pacientes con LES presentan un estado hiperprolactinéxico. En modelos murinos la hiperprolactinemia provoca que los síntomas de la autoinmunidad aparezcan más temprano y la sobrevida disminuya.

Se ha demostrado la presencia del PRL-R en linfocitos B. Sin embargo, la relación entre el desarrollo de la enfermedad y la expresión del receptor no ha sido estudiada. El propósito de esta investigación será comparar la expresión del PRL-R en modelos de ratón autoinmunes MRL/MpJ y MRL/lpr con su control C57BL/6.

HIPOTESIS.

- La expresión del PRL-R en linfocitos B de ratones MRL/lpr y MRL incrementa conforme a la edad y al desarrollo de la enfermedad.
- La concentración sérica de PRL en ratones MRL/lpr y MRL incrementa conforme a la edad y al desarrollo de la enfermedad.

OBJETIVOS.

General.

Estudiar la expresión del receptor de prolactina en modelos murinos que presentan una enfermedad similar a lupus a las 9 y 25 semanas de edad.

Específicos.

- Demostrar el desarrollo de lupus en el modelo MRL/lpr y MRL conforme a la edad, mediante la cuantificación de anticuerpos anti-DNA y proteinuria.
- Determinar la concentración sérica de prolactina a las 9 y 25 semanas de edad en ratones MRL, MRL/lpr y C57BL6.
- Cuantificar el ARNm del receptor de prolactina a las 9 y 25 semanas de edad en ratones MRL, MRL/lpr y C57BL6.

MATERIAL Y METODOS.

Animales.

Se utilizaron ratones de 9 y 25 semanas de edad de las cepas MRL/MpJ (MRL) y MRL/MpJ-Fas^{lpr} (MRL/lpr) (Jackson Laboratory) y C57BL/6 (Harlan) provenientes de Estados Unidos. Figura 4. Los cuales se alojaron en cajas de policarbonato con micro aislador esterilizadas por autoclave. Se les dió alimento estéril conteniendo 18% de proteína cruda, 6% de grasa y no más de 3% de minerales. El agua fue potable y esterilizada por autoclave. La administración de agua y alimento fue libre acceso, se les proporcionó los cuidados y la atención veterinaria específica según la Norma Oficial Mexicana-062-ZOO-1999.

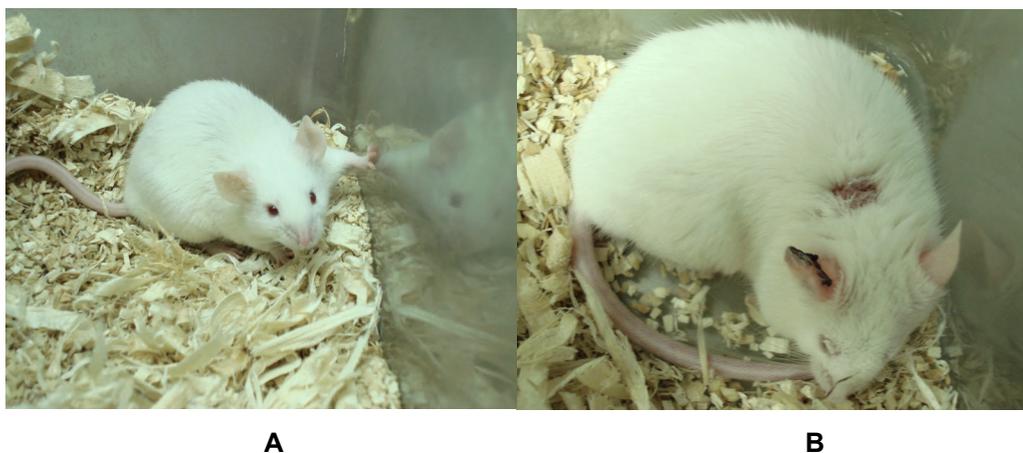


Figura 4. A) Ratón MRL/lpr de 9 semanas. B) Ratón MRL/lpr de 25 semanas.

Nivel de Bioseguridad.

El nivel de bioseguridad de nuestro experimento fue de 1, debido a que se trabajo con material biológico (células de ratón) que no producen enfermedad y no son un riesgo para la salud de las personas y el medio ambiente.

Cuantificación de proteinuria.

Antes de cada experimento se tomó una gota de orina y se colocó en la tira reactiva de Uri-Quick de Stanbio Laboratorios, se registró el cambio en la banda antes del minuto; las lecturas se reportaron en mg/dL. Figura 5.



Figura 5. Toma de muestra de orina para medir proteinuria.

Obtención de suero de ratón.

Los ratones se anestesiaron en una cámara saturada de éter etílico y se procedió a tomar la muestra de sangre ocular con capilares heparinizados, recolectándola en viales. La sangre obtenida se centrifugó a 10000 rpm por 15 min, se separó el suero y se dosificó en viales etiquetados que fueron almacenados hasta su uso a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Figura 6.



Figura 6. Toma muestra de sangre ocular.

Obtención de células de bazo.

Los animales se sacrificaron utilizando éter etílico. Se obtuvo el bazo y se colocó en una caja petri para inyectarle solución salina, enseguida se pasó por un filtro estéril con tela de nylon de 70 μm (BD Falcon) en el cual se maceró con el embolo de una jeringa, se lavó con solución salina y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y a las células se les agregó 1.5 ml del regulador de lisado (SIGMA) durante 1.5 minutos, las células se lavaron con solución salina, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. Las células se resuspendieron en regulador para MACS (PBS, BSA 0.5%, EDTA 2 mM) y se contaron utilizando una cámara de Neubauer. Figura 7.

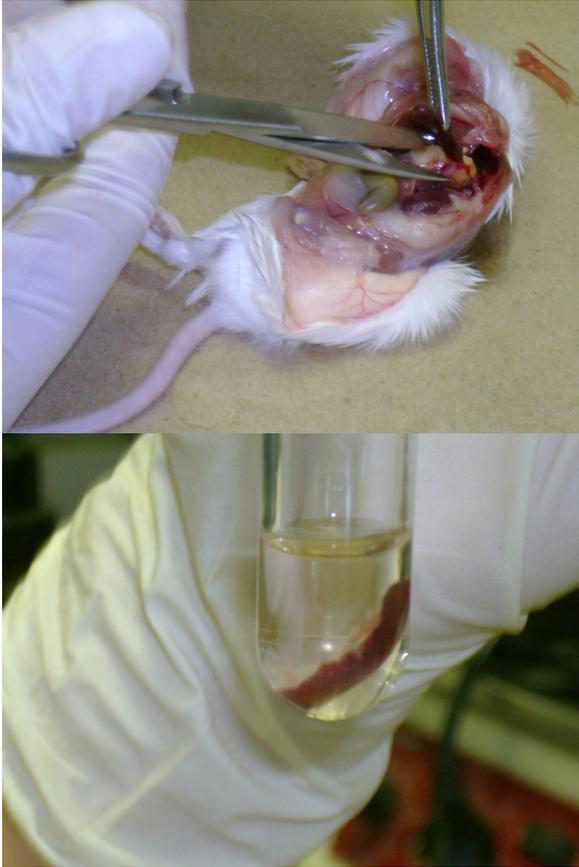


Figura 7. Extracción de bazo.

Purificación de linfocitos B.

Los linfocitos B se purificaron por selección positiva. Células provenientes de bazo (10 millones) se incubaron con 10 μ l de anticuerpo anti-CD19-PE (Miltenyi Biotec, Germany) y 90 μ l de regulador MACS. Las células se incubaron a 4 °C, por 10 min en oscuridad, se lavaron y resuspendieron en 80 μ l de regulador. Se agregaron 20 μ l de anticuerpo anti-PE acoplado a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Germany), se incubaron 15 min a 4 °C, al término de este tiempo se lavaron, se resuspendieron en 500 μ l y pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi Biotec, Germany) previamente lavada con 2 ml de regulador MACS, la pureza se verificó por citometría de flujo (FACS Calibur BD).

Extracción de ARN de células B de ratón.

Linfocitos B (pureza >98%) se resuspendieron en reactivo de Trizol (Invitrogen), 1 ml por cada millón de células, se incubó 5 min en hielo, se adicionó 220 µl de cloroformo grado biología molecular (Sigma Chemical), se homogenizó en vórtex durante 1 min, se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min, se recuperó la fase acuosa y colocó en un tubo limpio, se agregó 500 µl de isopropanol (JT Baker) se incubó a -20 °C durante 30 min y se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min, el exceso de isopropanol se eliminó y al botón de ARN se adicionó 1 ml de etanol (Sigma Chemical) al 75%, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, se eliminó todo el etanol hasta dejar el botón de ARN seco, el material se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

La cantidad de ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro GENE QUANT pro a 260 nm y la integridad de ARN se verificó mediante un corrimiento del material genético en gel de agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis BIO RAD POWER PAC 200.

Transformación de RNA a cADN.

Se utilizó 1 µg de material genético. Se preparó una primera mezcla compuesta por 1µl de oligo DT, el volumen equivalente a 1 µg de material genético y se ajustó el volumen a 11 µl con agua DEPC. Esta mezcla se programó en un termociclador (Lyer Cycler) 10 minutos a 70 °C.

Se preparó la mezcla de reacción compuesta por: 5 µl de buffer 5X, 2µl de Ditiotritol (DTT) y 1 µl de dNTP 10 mM. Una vez terminado el ciclo se adicionó 8 µl de mezcla de reacción y 1 µl de enzima Súper Script o Transcriptasa Reversa (Invitrogen). Se inicio un nuevo programa en el termociclador: 4 min a 37 °C, 1 h a 42 °C, 10min a 80°C y 4 °C hasta sacar las muestras. Las muestras fueron almacenadas a -35 °C hasta su utilización.

PCR tiempo real para amplificar el PRL-R a partir de células B de ratón.

Se emplearon sondas de hidrólisis (Taqman de Roche) específicas para el PRL-R y el gen constitutivo de β actina. Para todas las amplificaciones se partió de 1 μ g de material genético.

Se preparó una mezcla sonda/primer para el PLR-R con primer sentido y antisentido (2.5 μ l) a una concentración 20 μ M, 1 μ l de la sonda específica para PRL-R y 4 μ l de agua para tener un volumen final de 10 μ l, a partir de ésta se preparó otra mezcla de reacción que contiene 1 μ l de la mezcla sonda/primer más 2.5 μ l de Master Mix 5x de el Kit (LightCycler, Taqman Master de Roche) que tiene la enzima (Taq polimerasa) y 4.5 μ l de agua. Con un volumen final de 7.5 μ l. Finalmente se agregó a cada capilar de 7.5 μ l de Master Mix 5x y 2.5 μ l de cADN. Se sellaron los capilares y se centrifugarán a 1500 rpm por 1 minuto. De la misma manera se procedió con las mezclas para el gen constitutivo de β -actina. Además se metió un control negativo que no contenía nada de cADN para asegurarnos de que trabajamos bajo condiciones confiables.

El equipo se programó de la siguiente manera: Preincubación; 95 °C por 10 minutos (1 ciclo). Amplificación; 95 °C por 10 segundos. Tm 59 °C por 20 segundos. Extensión donde se captura la fluorescencia 72 °C por 1 segundos. (40 ciclos). Enfriamiento: 40°C por 30 segundos.

ELISA PRL.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos (Nunc MaxiSorp) con 100 μ l del anticuerpo monoclonal anti prolactina de ratón (R&D Systems) clona 207518 a una concentración de 4 μ g/ml en PBS (Regulador de fosfatos 0.04M pH 7.4) se incubó la placa toda la noche a 4 °C, se lavó con PBS-Tween 0.05% (PBS-T) y bloqueó con 200 μ l de PBS-BSA 2%-Tween 0.05% (PBS-BSA-T) durante 1 hr a 37 °C. Se adicionó 100 μ l de los sueros problema diluidos 1:10 y el estándar de prolactina a distintas concentraciones (250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8, 3.9ng/ml) se incubó a 4 °C toda la noche y 45 minutos a 37 °C, se lavó y adicionó 100 μ l del anticuerpo anti prolactina biotinilada (R&D Systems) a una concentración de 0.1 μ g/ml, se incubó a temperatura ambiente 2 h, se colocó

50 µl de avidina acoplada a fosfatasa alcalina (Zymed Laboratories) diluida 1:400 e incubó 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó y adicionó 100 µl de sustrato para fosfatasa alcalina (Sigma Chemical) se incubó durante 30 minutos en oscuridad y se leyó en un lector de ELISA (Dynatech MR5000) a 405 nm.

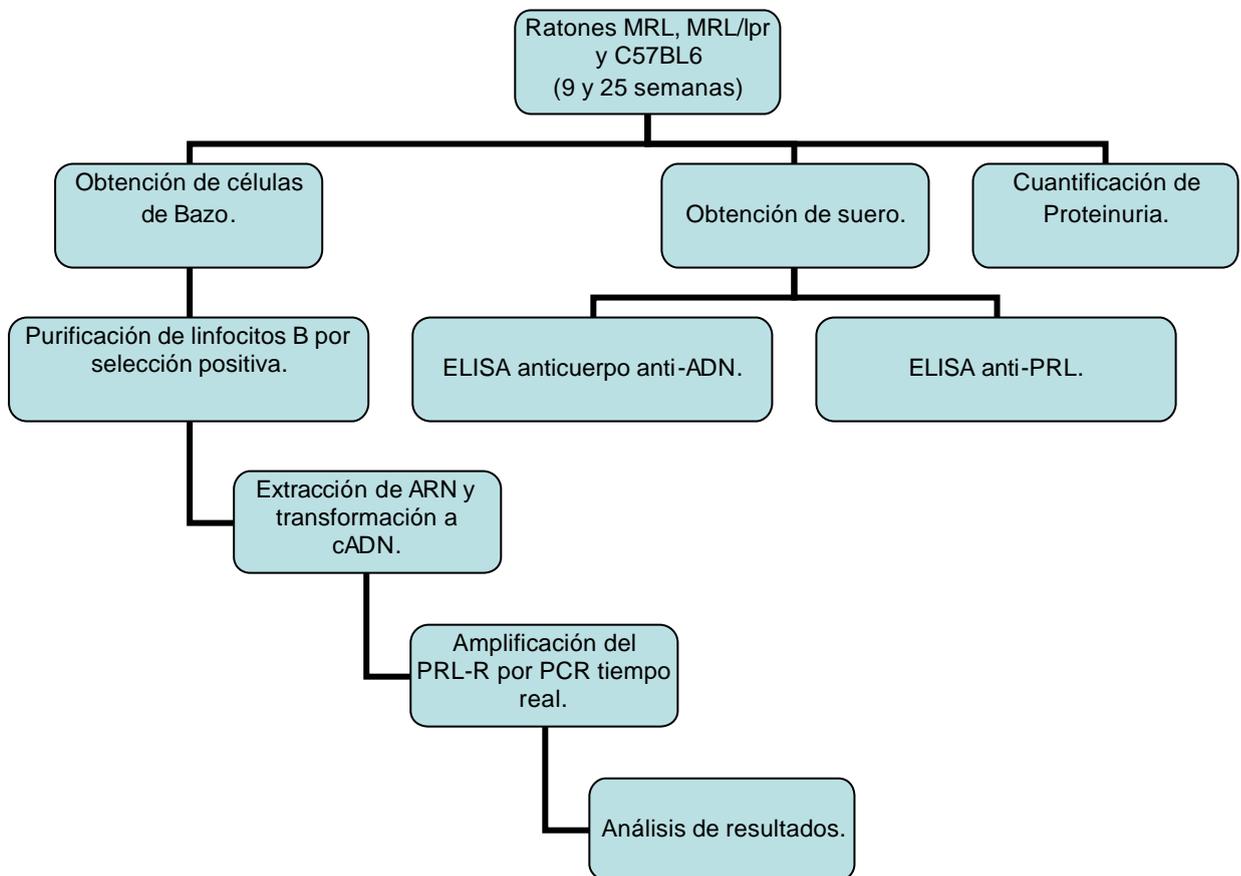
ELISA anti ADN .

La determinación de anticuerpos anti-ADN se realizó por el método de ELISA. La placa se sensibilizó con antígeno (ADN de timo de carnero [SIGMA]) a una concentración de 5 µg/ml, se incubó toda la noche a 4 °C y se lavo 2 veces con PBS-Tween. La placa se bloqueó con 200 µl de PBS-BSA-Tween, se incubó 1 h a 37°C y se lavó 2 veces. Se adicionó 100 µl del estándar de anticuerpo anti-DNA (Chemican International) a distintas concentraciones (250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8ng/ml) y 100 µl de los sueros problemas diluido 1:50, la placa se incubó a 37 °C /1h y se lavó 4 veces. Se colocó 100 µl del conjugado (Ig's de conejo anti IgG de ratón unido a fosfatasa alcalina [Zymed-Invitrogen]) se incubó 45 min. a 37 °C y se lavó 4 veces. Finalmente se adicionó 100µl de sustrato para fosfatasa alcalina y se leyó a los 20 min. a 405 nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000).

Análisis estadístico.

Los resultados se describieron de acuerdo a la distribución de los datos (media y desviación estándar). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba normalidad Shapiro Wilk. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante T de student. Las diferencias entre grupos se determinó utilizando la prueba de anova. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$, el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS 12 para Windows.

DIAGRAMA DE FLUJO.



RESULTADOS.

La exacerbación del lupus en modelo murino se determinó a través de proteinuria y anticuerpos anti-DNA. No existió una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de proteinuria a las 9 y 25 semanas de edad en los ratones de la cepa C57BL/6 (control) y MRL (cepa que muere a los 18-24 meses de edad), ni en la cepa MRL/lpr (vida media 6 meses) a las 9 semanas. Sin embargo, se observó un incremento estadísticamente significativo en los niveles de proteínas en orina en los ratones MRL/lpr a las 25 semanas ($X = 166 \pm 33 \text{ mg/dL}$). Figura 8.

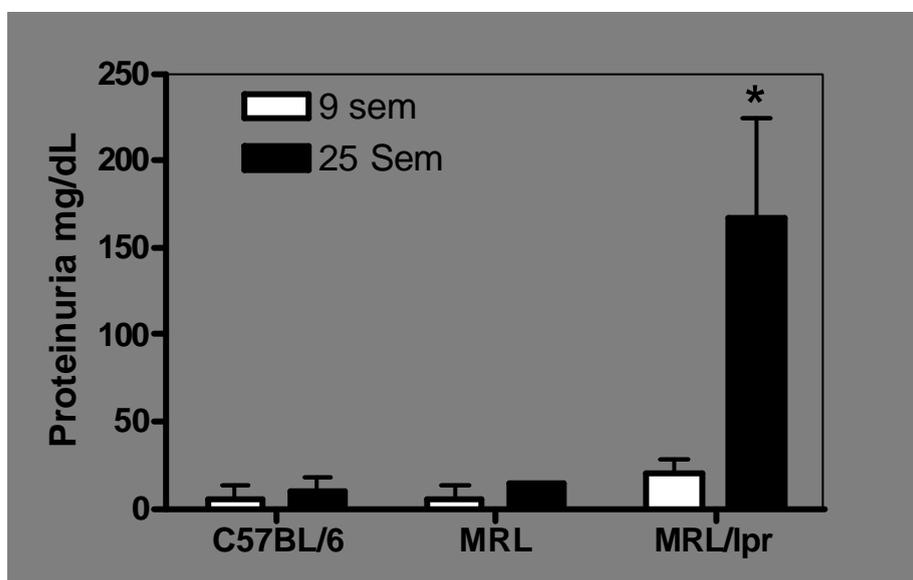


Figura 8. Determinación de proteinuria. Se tomó una gota de orina de las cepas C57BL/6, MRL y MRL/lpr en tiras reactivas de Uri-Quick de Stanbio Laboratorios. En barras abiertas ratones de 9 semanas y en barras cerradas ratones de 25 semanas de cada una de las cepas. $p=0.05$

Se determinaron los niveles séricos de anticuerpos anti-DNA del isotipo IgG. Las concentraciones de anticuerpos anti-DNA fueron muy bajas tanto en la cepa control como la MRL a las 9 (0 $\mu\text{g/ml}$, 0 $\mu\text{g/ml}$) y 25 semanas (1.3 $\mu\text{g/ml}$, 1.6 $\mu\text{g/ml}$), así como en la cepa MRL/lpr a las 9 semanas (1.3 $\mu\text{g/ml}$). En contraste, los niveles de anticuerpo anti-DNA en la cepa MRL/lpr a las 25 semanas (10.91 $\mu\text{g/ml}$) incrementa con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a las antes mencionadas. Figura 9.

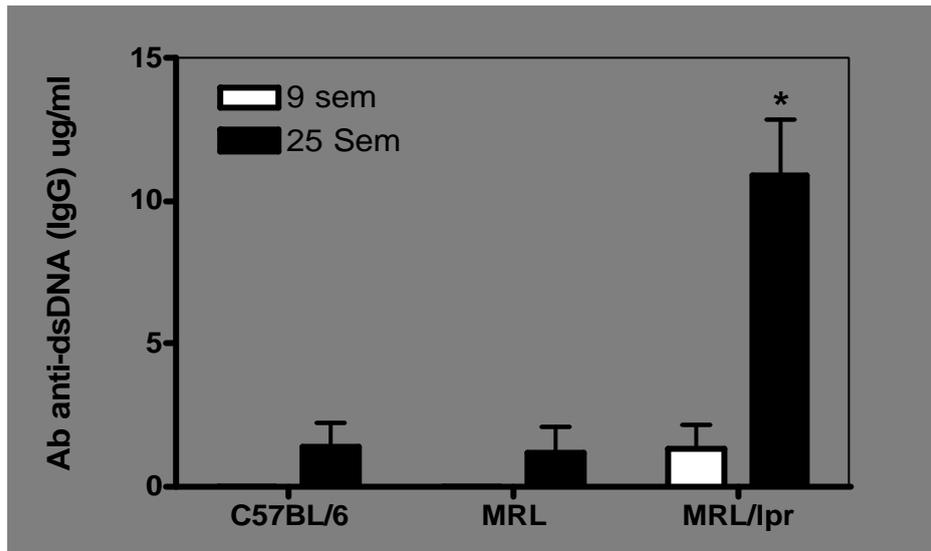


Figura 9. Determinación de anticuerpos anti-DNA. Se obtuvo suero de las cepas C57BL/6, MRL y MRL/lpr a las 9 y 25 semanas de edad, la cuantificación de anticuerpos anti-DNA se realizó por la técnica de ELISA. $\bar{p}=0.05$

Los niveles de PRL en ratones MRL/lpr aun no han sido reportados, nosotros encontramos que las concentraciones en suero de PRL en los ratones MRL y MRL/lpr incrementaron con una diferencia estadísticamente significativa conforme a la edad (9 semanas [3.85 ng/ml, 3.53 ng/m] y 25 semanas [7.2 ng/ml, 7.36 ng/ml]). En contraste, la cepa control (C57BL/6) no presentó un aumento en la concentración de PRL con la edad (9 semanas [2.3 ng/ml] y 25 semanas [3.6 ng/ml]). Figura 10.

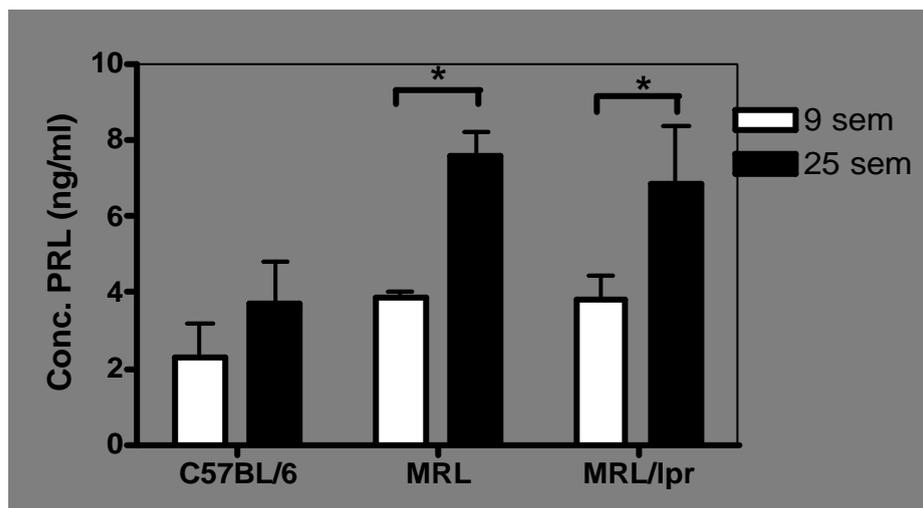


Figura 10. Determinación de PRL. Se obtuvo suero de las cepas C57BL/6, MRL y MRL/lpr a las 9 y 25 semanas de edad, la cuantificación de PRL se realizó por la técnica de ELISA. $\bar{p}=0.05$

La presencia del receptor de prolactina en los linfocitos B con una pureza de más del 98% (Figura 11) en las distintas cepas, se demostró a través de PCR

punto final, empleando primers para la isoforma larga del receptor de prolactina. El transcrito se expresa en los linfocitos B de todas las cepas como se muestra en la figura 12.

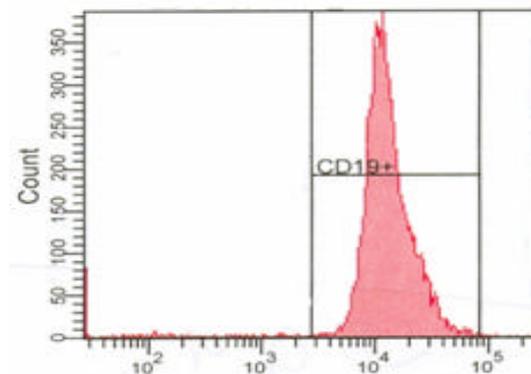


Figura 11. Pureza de linfocitos B. Histograma de la purificación por selección positiva. La pureza fue verificada por citometría de flujo (98%)

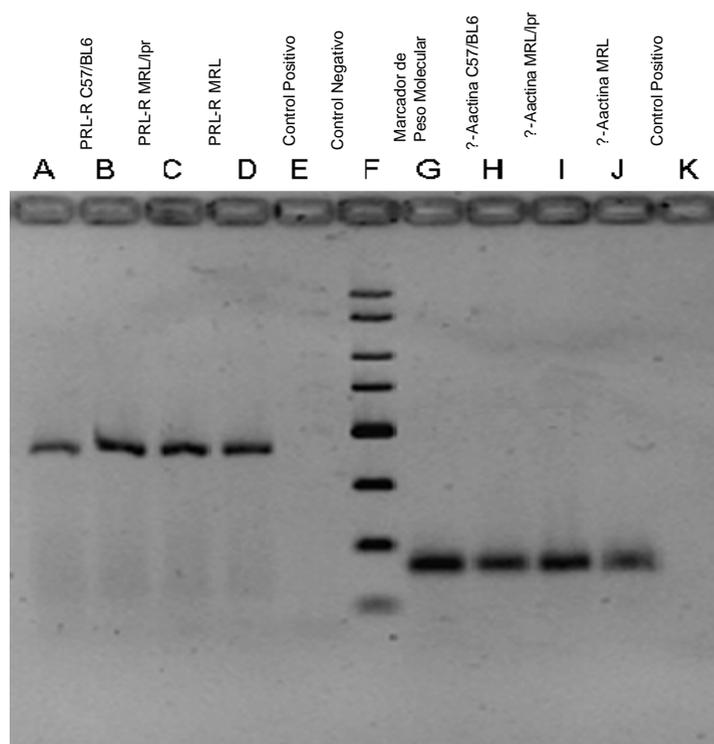


Figura 12. Amplificación de PRL-R. El gel de agarosa al 1.5% muestra la amplificación mediante PCR punto final de linfocitos B de ratón. Además la presencia del gen de β -actina El marcador de peso molecular (50pb) se observa en el carril F.

La figura 13 muestra la expresión de la proteína del receptor de PRL, la cual se encuentra localizada a nivel de membrana celular

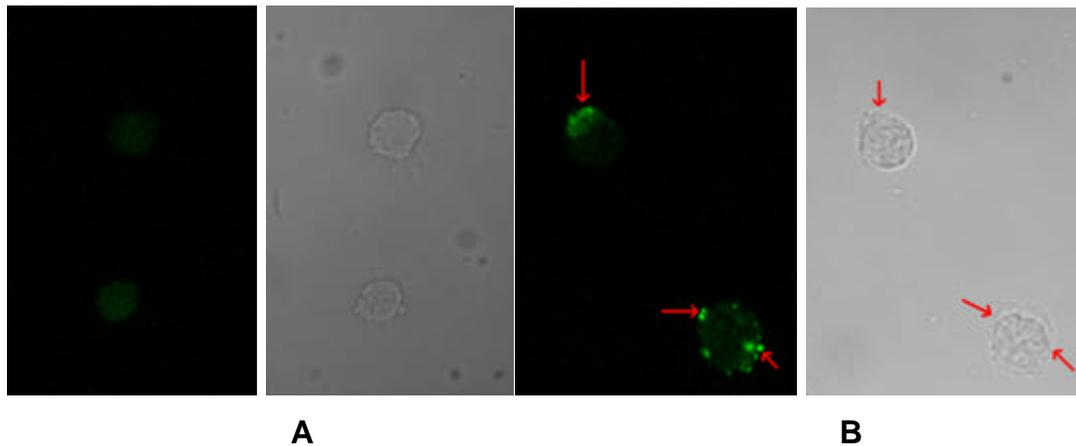


Figura 13. Expresión del PRL-R. Microscopia confocal que muestra la expresión de la proteína (PRL-R) en linfocitos B. Se realizó de manera indirecta con PRL-biotinilada. A) Control negativo (linfocito B con Streptavidina-FITC). B) Linfocitos B incubados con PRL biotinilada más Streptavidina-FITC.

La cuantificación de la expresión del PRL-R se realizó utilizando la técnica de PCR tiempo real. En la figura 14 se observa una curva de amplificación para el PRL-R que comienza a amplificar en el ciclo 25 y para β -actina que amplifica en el ciclo 12.

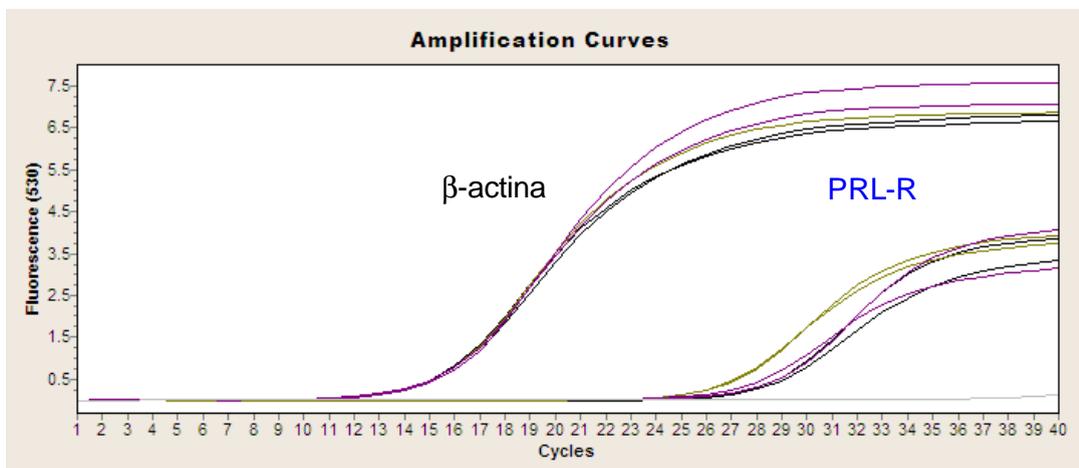


Figura 14. Amplificación de PRL-R por PCR tiempo real. Las líneas que amplifican en el ciclo 12 corresponden al control de β -actina en las diferentes cepas de ratón y las líneas que amplifican en el ciclo 25 corresponden al PRL-R

La figura 15 muestra la expresión relativa del PRL-R en las distintas cepas. En la cepa control a las distintas edades no se encontró una diferencia en la expresión del PRL-R ni con la cepa MRL a las 9 semanas, en esta cepa se

observó un aumento estadísticamente significativo a las 25 semanas. En comparación con la cepa C57BL/6 y MRL la cepa MRL/lpr presenta un incremento en la expresión del PRL-R a las 9 semanas y esta expresión aumenta conforme pasa la edad. Figura 15.

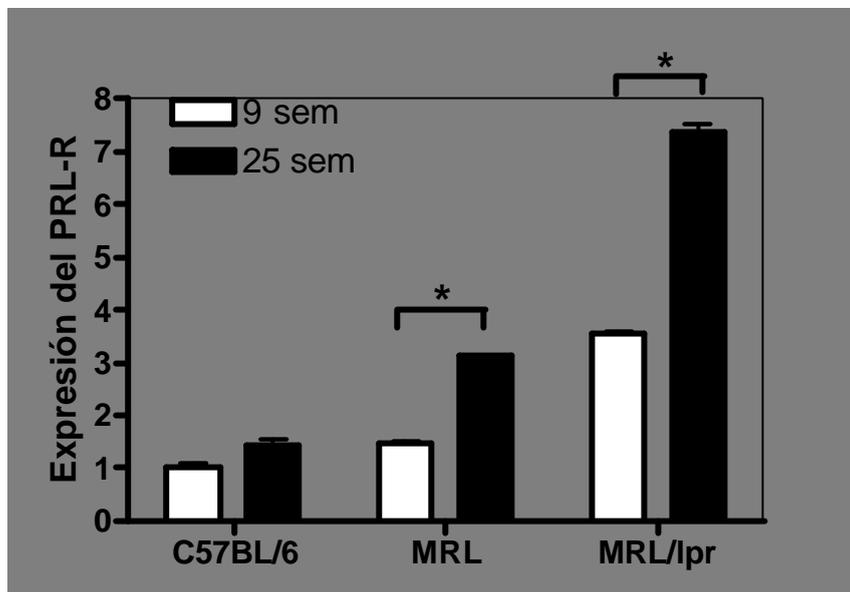


Figura 15. Expresión relativa del PRL-R. $p=0.05$

DISCUSIÓN.

Se han empleado distintos modelos murinos (NZB/NZW, BxSB, MRL y MRL/lpr) para el estudio de lupus eritematoso sistémico (LES) ^(48,49). Nosotros utilizamos las cepas MRL y MRL/lpr, en esta última las manifestaciones clínicas comienzan a las 12 semanas y tienen una vida media de 6 meses, mientras la cepa MRL tiene una vida media de 17 meses y las manifestaciones clínicas son menos agresivas ⁽⁴⁹⁾, como cepa control utilizamos C57BL/6. Los niveles elevados de proteinuria y anticuerpos anti-ADN fueron utilizados como parámetros para confirmar que los animales presentaban la enfermedad; decidimos medir estos parámetros a la 9 y 25 semanas, encontrando que únicamente la cepa MRL/lpr tiene la enfermedad a las 25 semanas y aunque la cepa MRL tienen el mismo fondo genético para desarrollar la enfermedad las manifestaciones clínicas se presentan más tarde ^(49,50).

Estudios recientes han reportado el papel patogénico que tiene la prolactina (PRL) en enfermedades autoinmunes ^(20,26,51,52), específicamente en LES, donde aproximadamente entre el 15% - 30% de los pacientes tienen hiperprolactinemia ^(8,26). McMurray demostró en el modelo murino NZB/W que el incremento en las concentraciones séricas de PRL exacerba la enfermedad ⁽³⁹⁾. Por lo que decidimos determinar los niveles de PRL en suero de nuestros ratones. En la cepa control (C57BL/6) no observamos diferencia en las concentraciones a las distintas edades, a pesar que, Parkening y col. encontraron que los niveles de PRL en esta cepa disminuye con la edad, la diferencia en cuanto a nuestros resultados se puede deber a que Parkening comparó ratones de 2 meses (8 semanas) con ratones de 16-20 meses (64-80 semanas) ⁽⁵⁴⁾, mientras que nosotros utilizamos ratones de 9 y 25 semanas. En cuanto a las cepas que desarrollan lupus (MRL, MRL/lpr) no existen reportes donde determinen los niveles de PRL. Nosotros encontramos que existe un incremento estadísticamente significativo en la concentración de PRL de ambas cepas conforme a la edad, lo que sugiere que existe una relación entre la predisposición genética para desarrollar LES y el incremento PRL. Sin embargo, no existió diferencia en las concentraciones de PRL entre ambas

cepas a pesar que los ratones MRL/lpr ya presentaban la enfermedad, este resultado fue contradictorio a lo esperado (mayor concentración de PRL en la cepa MRL/lpr), por lo que se decidió determinar la expresión del receptor de PRL (PRL-R). Decidimos utilizar linfocitos B debido a los distintos estudios que demuestran el papel patogénico que tienen los linfocitos B en el desarrollo LES murino ⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾, uno de ellos fue realizado por el grupo de Slomchik con ratones MRL/lpr deficientes de linfocitos B los cuales muestran una enfermedad menos agresiva (disminución de glomerulonefritis, vasculitis), en comparación con los ratones que presentan linfocitos B ⁽⁵⁶⁾. Nosotros encontramos la expresión del mRNA y de la proteína del PRL-R en los linfocitos B de las tres cepas estudiadas, resultados que concuerdan con reportes previos ⁽¹⁻⁴⁾.

En la cepa C57BL/6 no encontramos diferencia en la expresión del mRNA del PRL-R a las distintas edades. En contraste, en las cepas que desarrollan lupus existe un incremento del receptor con la edad, este incremento se puede deber a la predisposición genética de estos animales o al aumento en la concentración de PRL que tienen estas cepas. Sin embargo, la cepa MRL/lpr expresa mayor cantidad de mRNA del PRL-R que la MRL y esta cantidad aumenta en el momento que el ratón presenta la enfermedad. En este momento las cepas MRL y MRL/lpr tienen los mismos niveles séricos de PRL, por lo que el incremento en la expresión del PRL-R tal vez no se deba a la concentración de PRL, sino algún otro mecanismo que tenga que ver con la presencia de la enfermedad. En un estudio previo utilizando ratones NZB/W se encontró un aumento en la expresión del PRL-R en linfocitos T con respecto a la edad ⁽⁵³⁾, sugirieron la participación del PRL-R en el desarrollo de LES. Aunque sería interesante determinar si el PRL-R participa directamente en el desarrollo de la enfermedad o es consecuencia de la misma.

CONCLUSIONES.

- A las 25 semanas de edad la cepa MRL/lpr presenta manifestaciones clínicas de LES (proteinuria y anticuerpos anti-DNA) en comparación con la cepa MRL.
- Los niveles séricos de prolactina aumentan con la edad solamente en las cepas que desarrollan lupus.
- La expresión del ARNm del receptor de PRL incrementa en los ratones que tienen fondo genético para desarrollar LES siendo más evidente cuando se presenta la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Goffin V, Bernichetein S, Touraine P, Kelly P. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr Rev.* 2005;26:400-22.
2. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, & NagyG. Prolactin: Structure, Function and Regulation of Secretion. *Physiol. Rev.* 2000;80:1523-163.
3. 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. *Endocr. Rev.* 1998;19:225-268.
4. Truong A, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell G & Martial J. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J.* 1984;3:429-37
5. Berwear M, Martial J & Davis J. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol Endocrinol.* 1994;8:635-42.
6. Svensson A, Bondensgaard K, Norskov-Lauritsen L, Christensen L, Becker P, Andersen M, Maltesen M, Rand K, & Breinholt J. Crystal structure of a prolactin receptor antagonist bound to the extracellular domain of the prolactin receptor. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008;4:19085-94.
7. Sinha YN. Prolactin Variants. *Trends Endocrinol Metab.* 1992; 3: 100 106.
8. Leaños A, Pascoe D, Fraga A & Blanco-Favela F. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. *Lupus* 1998;7 : 398-403.
9. Yu-Lee L. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Rev.* 2002;5:435-55.
10. Sun R, Li AL, Wei HM & Tian ZG. Expression of prolactin receptor and response to prolactin stimulation of human NK cell lines. *Cell Res* 2004;1: 67-73.
11. Paukku K, Silvennoinen U. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Dec;15:435-55.

12. Huang K, Ueda E, Chen Y & Walker A. Paradigm-Shifters: phosphorylated Prolactin and Short Prolactin Receptor. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;1: 69-79.
13. Sporri B, Bickel M, Dobbelaere D, Machado J & Lottaz D. Soluble interleukin-1 receptor--reverse signaling in innate immunoregulation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12:27-32.
14. Chávez-Rueda K, Hernández J, Zenteno E, Leños-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favéla F. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol*. 2005;116:182-91.
15. Smith y col., 1930. Representations of mind: C. S. Sherrington and scientific opinion, c. 1930-1950. *Sci Context*. 2001;14:511-539.
16. Nagy G & Halasz B. Time course of the litter removal-induced depletion in plasma prolactin levels of lactating rats. An immediate full blockade of the hormone release after separation. *Neuroendocrinology*. 1983;37:459-62.
17. Larrea F, Martinez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Queipo G, Cariño C, Alarcon-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. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3664-9.
18. Montgomery DW, Prolactin production by immune cells. *Lupus. Review*. 2001;10:665-75.
19. 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: 91; 505-513.
20. Chaves-Rueda, Legorreta-Haquet, Cervera-Castillo, Sánchez L, Jara L, Zenteno E & Blanco-Favéla, Prolactin effect on CD69 and CD154 expression by CD4+ cells from systemic lupus erythematosus patients., *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23;769-77
21. Richards SM, Garman RD, Keyes L, Kavanagh B, & McPherson JM. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol*. 1998;18: 85-91.
22. Hartmann DP, Holaday JW, & Bernton EW. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J*. 1989;3;2194-2202.

23. Cross RJ, Capbell JL & Roszman TL. Transplantation of pituitary grafts fail to restore immune function and to reconstitute the thymus glands of aged mice. *Mech Ageing Dev.* 1990;56:11-22.
24. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med. Review.* 2008;28:929-39.
25. Dubois. *Lupus Erythematosus.* Wallace J. Daniel, Hahn Hannahs Berra. Lippincott William & Wilkins. 6^a edition USA 2002. Cap 3-5.
26. Leanos-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chavez-Rueda KA, & Blanco-Favela F. Persistence of Macroprolactinemia Due to Antiprolactin Autoantibody before, during, and after Pregnancy in a Woman with Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;8:2619-2624.
27. Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, & Leanos-Miranda A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. *J Rheumatol.* 1999;2: 55-59.
28. Martínez Elizondo. *Introducción a la Reumatología* 2^a edición 1997. SMR.
29. Grammer AC & Lipsky PE. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2003;4:S22-S27.
30. O'Shea JJ, Ma A & Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:37-45.
31. Blanco F, Kalsi J, & Isenberg DA. Analysis of antibodies to RNA in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp. Immunol.* 1991;8:66-70.
32. Andrews BS. et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 1978;14: 1198-1215.
33. Furukawa F & Yoshimasu T. Animal models of spontaneous and drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews.* 2005;4: 345-350.
34. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, & Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;35:314-317.
35. Adachi M. et al. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *PNAS.* 1996;9:2131-2136.

36. Tomita Y, Jyonouchi H, Engelman RW, Day NK & Good RA. Preventive action of carotenoids on the development of lymphadenopathy and proteinuria in MRL-lpr/lpr mice. *Autoimmunity* 1993;1:95-102.
37. Chan OTM, Madaio MP, & Shlomchik M J. B Cells Are Required for Lupus Nephritis in the Polygenic, Fas-Intact MRL Model of Systemic Autoimmunity. *J Immunol.* 1993;16:3592-3596.
38. Shlomchik MJ, Madaio MP, Ni D, Trounstein M & Huszar D. The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *J. Exp. Med.* 1994;1:1295-1306.
39. McMurray R, Keisler D, Izui S & Walker SE. Hyperprolactinemia in Male NZB/NZW (B/W) F1 Mice: Accelerated Autoimmune Disease with Normal Circulating Testosterone. *Clinical Immunology and Immunopathology.* 1994; 7:338-343.
40. Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS, Goodman JR, & Siiteri PK. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Exp. Med.* 1978;14:1568-1583.
41. Gutierrez LA, Molina JF & Jara L. Prolactin and systemic lupus erythematosus: Prolactin secretion by lymphocytes and proliferative autocrine activity. *Lupus* 1995;(5):348-352.
42. Chang DM, Chang CC & Kuo SY. Hormonal profiles and immunological studies of male lupus in Taiwan. *Clin. Rheumatology* 1999;18:158-162.
43. Mozkorzoya L, Lacinova Z & Merck J, Hyperprolactinemia in patients with systemic lupus erythematosus., *Clin. Exp., Rheumatology* 2002; 20:807-812.
44. Smith Khanfir M, Ben Ghorbel I & Feki M. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus. A prospective study of 38 cases., *Tun Med* 2004; 82:512-515.
45. Neidhart M. Bromocriptine has little direct effect on lymphocytes, the immunomodulatory effect being mediated by the suppression of prolactin secretion. *Biomed Pharmacother.* 1997;51:118-125.
46. Walker SE, Allen SH & McMurray RW. Prolactin and autoimmune disease. *Trends Endocrinol Metabol.* 1992;4:147-151.
47. Gaufo GO, Diamond MC. Prolactin increases CD4/CD8 cell ratio in thymus-grafted congenitally athymic nude mice. *Brain Res.* 1997;9:191-9.

48. Cohen PL, Maldonado MA. Animal models for SLE. *Curr Protoc Immunol. Review.* 2003;15:5-20.
49. Singh RR SLE: translating lessons from model systems to human disease. *Trends Immunol.* 2005 Nov;26(11):572-9. Epub 2005 Sep 9. Review. Erratum in: *Trends Immunol.* 2006;27:59-60.
50. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copleland NG et al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 1992;26:314-7.
51. Chavéz-Rueda K, Legorreta-Haquet VM, Cervera-Castillo H, Sanchez L, Jara L, Senteno E, Chavez-Sanchez L & Blanco-Favela F. Effect of prolactin on lymphocyte activation from systemic lupus erythematosus patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1:157-65.
52. Jara LJ, Pacheco-Reyes H, Medina G, Angeles U, Cruz-Cruz P, Savedra MA. Prolactin levels are associated with lupus activity, lupus anticoagulant, and poor outcome in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;11:218-26.
53. Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA and Dardenne M. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J Immunol.* 1993;15:5673-81.
54. Parkening TA, Collins Tj, Smith ER. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH and prolactin in aging Mongolian gerbils. *Exp Gerontol.* 1984;19:359-65.
55. Chan OTM, Madaio MP & Shlomchik MJ. B Cells Are Required for Lupus Nephritis in the Polygenic, Fas-Intact MRL Model of Systemic Autoimmunity. *J Immunol* 1999;163:3592-3596.
56. Shlomchik MJ, Madaio MP, Ni D, Trounstein M & Huszar D. The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis. *J. Exp. Med.* 1994;180:1295-1306.
57. Ahuja A, Shuple J, Dunn R, Kashgarian M, Kehry MR and Shlomchik MJ. Depletion of B Cells in Murine Lupus: Efficacy and Resistance. *The Journal of Immunology,* 2007;179: 3351-3361.
58. Li Y, Chen F, Putt M, Koo YK, Madai M, Cambier JC, Cohen PL and Eisenberg RA. B cell depletion with anti-CD79 mAbs ameliorates autoimmune disease in MRL/lpr mice. *The Journal of Immunology,* 2008;181: 2961-2972.
59. Sabahi R, Anolik JH. B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus. *Drugs.* 2006;66:1933-48.

ABREVIATURAS.

ADN	Acido Desoxiribonucleico
RNA	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
aa	Aminoácidos
HLA	Antigenos Leucocitarios Humanos
Co A	Concavalina A
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
HG	Hormona del Crecimiento
IRF	Factor Regulador de Interferón
IL-	Interleucinas
LP	Lactógeno Placentaria
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
PRL	Prolactina
PRL-R	Receptor de Prolactina