



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**REGULACIÓN DOPAMINÉRGICA DE LA
SÍNTESIS DE LA PROLACTINA DE ORIGEN
LINFOCITARIO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

LETICIA GONZÁLEZ IBARRA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ISABEL CRISTINA MÉNDEZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en una de las instalaciones más reconocidas a nivel internacional.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por haberme otorgado el apoyo económico al posgrado (PAEP) para poder asistir al XLVIII Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C.

A los miembros de mi Comité Tutoral y miembros del jurado. Al Dr. Carlos Rosales Ledezma, a la Dra. Rocío García Becerra y a la Dra. Isabel C. Méndez Hernández por haberme asesorado y dado valiosos consejos en cada uno de los tutorales. Al Dr. Roberto Coria Ortega y a la Dra. Lorenza Díaz Nieto por la revisión crítica de la presente tesis.

Al Dr. Fernando Larrea, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción, por el apoyo incondicional y las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

A la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C., por haber financiado parte de los gastos para asistir al XLVIII Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C. y haber seleccionado mi trabajo como “mejor trabajo libre en el área de la investigación básica”.

Dedicatorias

A mis papas Juventino González y Margarita Ibarra por todo el apoyo otorgado para realizar mis estudios de maestría, por su amor y paciencia. Gracias por todo.

A mi hermana Cecilia González por sus consejos y su gran apoyo a lo largo de mis estudios profesionales. Gracias por estar conmigo.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo incondicional y por hacer del laboratorio un lugar agradable. En especial a mi compañera y amiga Isela Martínez por apoyarme en todo momento y compartir sus valiosos consejos.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Generalidades	4
Gen de la prolactina	4
Dopamina y la Regulación de la prolactina hipofisaria	5
La prolactina y el sistema inmunológico	8
La dopamina y el sistema inmunológico	11
Regulación de la prolactina de origen linfocitario	12
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	16
Objetivos particulares	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Sujetos	17
2. Métodos	17
2.1. Obtención y cultivo de células mononucleares	17
2.2. Análisis de la expresión del RNAm de la prolactina	18
2.2.1. Extracción de RNA total	19
2.2.2. Reacción de la transcriptasa reversa (RT)	19
2.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	19
2.3. Determinación de AMPc por radioinmunoanálisis	20
2.4. Análisis de la expresión de los receptores D2 de dopamina por Western blot	20
2.5. Cuantificación de la prolactina secretada al medio de cultivo por ensayo de ELISA	21
3. Análisis estadístico	22
RESULTADOS	23
Proliferación de las células mononucleares de sangre periférica en respuesta a la IL-2	23
Curvas estándar y de eficiencia de los genes analizados por qPCR	23
Efecto del 8Br-AMPc en la expresión del RNAm y de la secreción de la prolactina en las CMNP en cultivo	25

Efecto de la dopamina en la expresión del RNAm y la secreción de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica en cultivo	28
Efecto de la dopamina en el contenido intracelular de AMPc en las células mononucleares de sangre periférica en cultivo	32
Efecto de agonistas de los DRD2 y DRD1/DRD5 de la dopamina en la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica	32
Expresión basal del DRD2 de dopamina en las células mononucleares de sangre periférica mantenidas en cultivo	32
Expresión del RNAm de los DRD2 en presencia de dopamina y de 2-Br- α -ergocriptina en las células mononucleares de sangre periférica	36
Efecto de la activación de las células mononucleares de sangre periférica con PMA/ionomicina en la expresión del RNAm de la prolactina y el contenido de AMPc intracelular	36
Efecto de la dopamina y de la 2-Br- α -ergocriptina en la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica activadas con PMA/ionomicina <i>in vitro</i>	38

DISCUSIÓN	41
------------------	-----------

CONCLUSIONES	44
---------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	45
---------------------	-----------

RESUMEN

La expresión del gen de la prolactina en las células del sistema inmunológico es regulada por un promotor alterno diferente al de la hipófisis. La dopamina es el principal inhibidor de la síntesis y secreción de la prolactina hipofisaria, sin embargo, no se ha considerado como posible regulador a nivel linfocitario. La presencia de receptores de la dopamina en los linfocitos y los efectos de este neurotransmisor en la síntesis y secreción de citocinas sugieren su participación en la regulación de la prolactina linfocitaria. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de la dopamina, a través de la activación de la vía de señalización del AMPc, en la regulación de la expresión génica y secreción de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica sin activar o activadas *in vitro* de sujetos normales. Se realizaron cultivos de células mononucleares obtenidas de donadores sanos. Las células se cultivaron en medio AIM-V libre de suero, suplementado con antibióticos e 3-isobutil-1-metilxantina, como inhibidor de las fosfodiesterasas, en presencia o ausencia de activadores linfocitarios (PMA/ionomicina) y se llevaron a cabo al menos 3 experimentos diferentes de cada estímulo. Las células mononucleares se incubaron con un análogo no hidrolizable del AMPc, el 8Br-AMPc, con dopamina o con agonistas de los receptores de tipo D1 y D2 de dopamina, el (R)-(+)-SKF-38393 y la 2-Br- α -ergocriptina, respectivamente. La expresión de los RNAm de la prolactina y del receptor D2 de dopamina se evaluó por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). El contenido intracelular de AMPc se cuantificó por radioinmunoanálisis específico. La expresión de los receptores D2 de dopamina en las células mononucleares se determinó por Western blot. La secreción de la prolactina al medio de cultivo se determinó por ELISA. La incubación con el 8Br-AMPc aumentó la expresión del RNAm y la secreción de la prolactina en las células mononucleares en cultivo. La dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina inhibieron la expresión del RNAm y secreción de la prolactina, y aumentaron la expresión del RNAm de los receptores D2 de dopamina en el 50% de los experimentos realizados. El (R)-(+)-SKF-38393 no modificó la expresión del RNAm de la prolactina. La dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina inhibieron el contenido intracelular de AMPc en las células mononucleares sin activar y no se modificó en las células mononucleares activadas. Los resultados de la presente tesis indican que la dopamina ejerce efectos directos a nivel linfocitario inhibiendo la expresión génica y la secreción de la prolactina. Este efecto posiblemente se lleva a cabo a través de la unión a los receptores de tipo D2 de dopamina y la posterior disminución de la concentración intracelular de AMPc.

ABSTRAC

Prolactin exerts immunoregulatory functions and also has been involved in the pathogenesis and clinical course of autoimmune diseases. An alternative promoter which contains cAMP response elements guides prolactin gene transcription in immune cells, but the molecular mechanisms regulating lymphocyte PRL gene expression are not well documented. Previous studies in our laboratory demonstrated that *in vivo* administration of metoclopramide, a DRD2 antagonist, enhanced both, gene expression and secretion of lymphocyte prolactin in peripheral mononuclear cells (PMNC) in healthy subjects, suggesting a role of dopamine in regulating lymphocyte prolactin. The aim of this study was to evaluate the direct effect of dopamine, through cyclic AMP (cAMP) signaling pathway, over both, prolactin gene expression and secretion in PMNC from normal subjects. The cells were obtained from healthy donors and cultured in AIM-V serum-free media, supplemented with 3-isobutyl-1-methylxanthine, as phosphodiesterase inhibitor, in the presence or absence of several pharmacological treatments. Treatment with 8-Br-cAMP increased prolactin mRNA expression. Dopamine and 2-Bromo- α -ergocryptine, a dopaminergic D2 receptor (DRD2), inhibited both, prolactin expression and intracellular levels of cAMP, while DRD2 mRNA expression was stimulated. Treatment with SKF-38393 did not affect prolactin expression. The results of this thesis indicate that dopamine exerts a direct effect inhibiting lymphocyte prolactin gene expression and secretion. This effect probably occurs through binding to dopamine D2 receptors and the subsequent decreasing of in the intracellular content of cAMP.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La prolactina es una hormona-citocina que se sintetiza principalmente en la hipófisis anterior y también es producida en una amplia variedad de sitios extrahipofisarios como la decidua placentaria, la glándula mamaria, la próstata, el cerebro, el miometrio y las células del sistema inmunológico, principalmente los linfocitos [1]. La prolactina nativa consiste de 199 aminoácidos y tiene un peso molecular de 23 kDa. Debido a modificaciones postraduccionales, existen varias isoformas de esta hormona como la glicosilada, la fosforilada, la fosfatada, las macroprolactinas y los productos de proteólisis de menor peso molecular [2]. Los efectos mejor conocidos de la prolactina se localizan a nivel del sistema reproductivo [2, 3], sin embargo, también ejerce acciones a diferentes niveles incluidos en seis categorías: reproducción, crecimiento y desarrollo, balance de agua y electrolitos, metabólicas, conductuales e inmunoreguladoras [1]. La prolactina ejerce sus acciones biológicas a través de la unión a su receptor, que se encuentra ampliamente distribuido en la membrana citoplásmica de diversas células, incluidas las células del sistema inmunológico [4]. El receptor de la prolactina consiste de un paso transmembranal y pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase 1 [1, 4]. La prolactina hipofisaria es regulada principalmente y de manera negativa por la dopamina a través de modificar las concentraciones intracelulares de AMPc y la posterior inhibición del factor de transcripción Pit-1 [2, 5]. Sin embargo, poco se sabe de la regulación de la prolactina en sitios extrahipofisarios. A este respecto, se ha reportado que el AMPc aumenta la expresión génica de la prolactina [6], por lo que, ligandos naturales que puedan modificar las concentraciones intracelulares de este segundo mensajero son candidatos para regular la síntesis de esta hormona en sitios extrahipofisario.

El gen de la prolactina

El gen de la prolactina está localizado en una copia simple en el brazo corto del cromosoma 6, cerca del gen del complejo mayor de histocompatibilidad [1]. El gen que codifica para la prolactina consiste de cinco exones y cuatro intrones y se extiende a lo largo de 15 kb. También se ha reportado la presencia de un sexto exón, el exón 1a, que se encuentra 5.8 kb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción en la hipófisis (Fig. 1) [7, 8]. El promotor que regula la expresión del gen de la prolactina en la hipófisis

consta de una región proximal y una región distal con varios sitios de unión para Pit-1 [1]. Pit-1 es un miembro de una familia de factores de transcripción, que al unirse al DNA, activa la transcripción génica de la prolactina hipofisaria [9]. A pesar de que, tanto el promotor proximal como el aumentador distal de la prolactina no tienen elementos de respuesta al AMPc, Pit-1 específica y constitutivamente interactúa con proteínas de unión a CREB para unirse al DNA y activar al gen de la prolactina hipofisaria [10].

En sitios extrahipofisarios un promotor alternativo diferente al de la hipófisis es el encargado de la regulación del gen de la prolactina (Fig. 1) [7, 11]. Este promotor alternativo es independiente de Pit-1, aunque contiene dos sitios consenso para este factor de transcripción [7, 11], por lo que el mecanismo de control de la expresión génica de la prolactina extrahipofisaria es tejido-específico. El promotor alternativo de la prolactina tiene elementos de respuesta al AMPc, sitios de unión a AP-1 y un motivo Ets [7, 12]. El RNA mensajero (RNAm) de la prolactina generado en sitios como la decidua y células linfoides, bajo la regulación de este promotor, es 150 pb más largo que el originado en la hipófisis, debido a la presencia del exón 1a que sólo se transcribe en estos sitios y que corresponde a la región no traducible del gen (Fig. 1). La secuencia que codifica para la proteína es idéntica en ambos transcritos, por lo que el producto de traducción es el mismo [11].

La dopamina y la regulación de la prolactina hipofisaria

La dopamina es un neurotransmisor que se sintetiza principalmente en el sistema nervioso central a partir del aminoácido tirosina por la acción de dos enzimas. La tirosina hidroxilasa, que metaboliza a la tirosina en L-dihidroxifenilalanina, y la dihidroxifenilalanina descarboxilasa, que metabolizada la L-dihidroxifenilalanina a dopamina [5] (Fig. 2). Este neurotransmisor es sintetizado en varios tejidos y células, principalmente en el cerebro, pero también en la médula adrenal, el páncreas, la hipófisis anterior y los linfocitos [5, 13]. Las concentraciones de dopamina en sujetos sanos varían de 1×10^{-3} a 3×10^{-4} M en la sinapsis, de 1×10^{-4} a 1×10^{-11} en la hipófisis, de 1×10^{-11} a 8×10^{-12} M en la circulación y de 1.7×10^{-4} a 1.7×10^{-6} M en los linfocitos [14]. La dopamina es inactivada por acción de las enzimas catecol-o-metil transferasa y monoamino oxidasa. La dopamina es el principal inhibidor de la síntesis y secreción de la prolactina hipofisaria llevando a cabo sus efectos biológicos a través de la unión a sus receptores específicos de membrana [5]. Los receptores de la dopamina, que

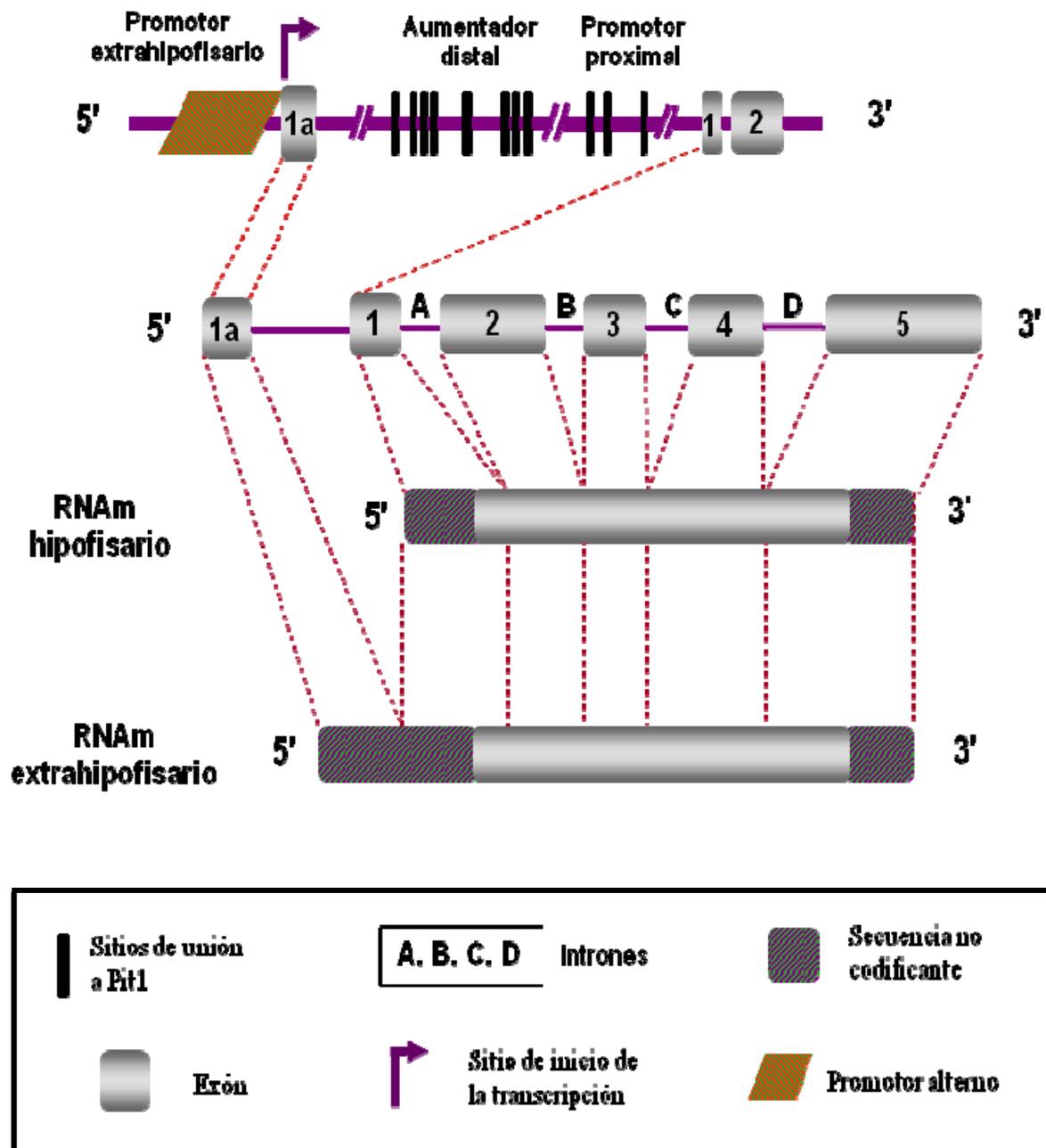


Figura 1. Representación de la estructura del gen de la PRL humana y de los productos de transcripción de los promotores hipofisario y extrahipofisario.

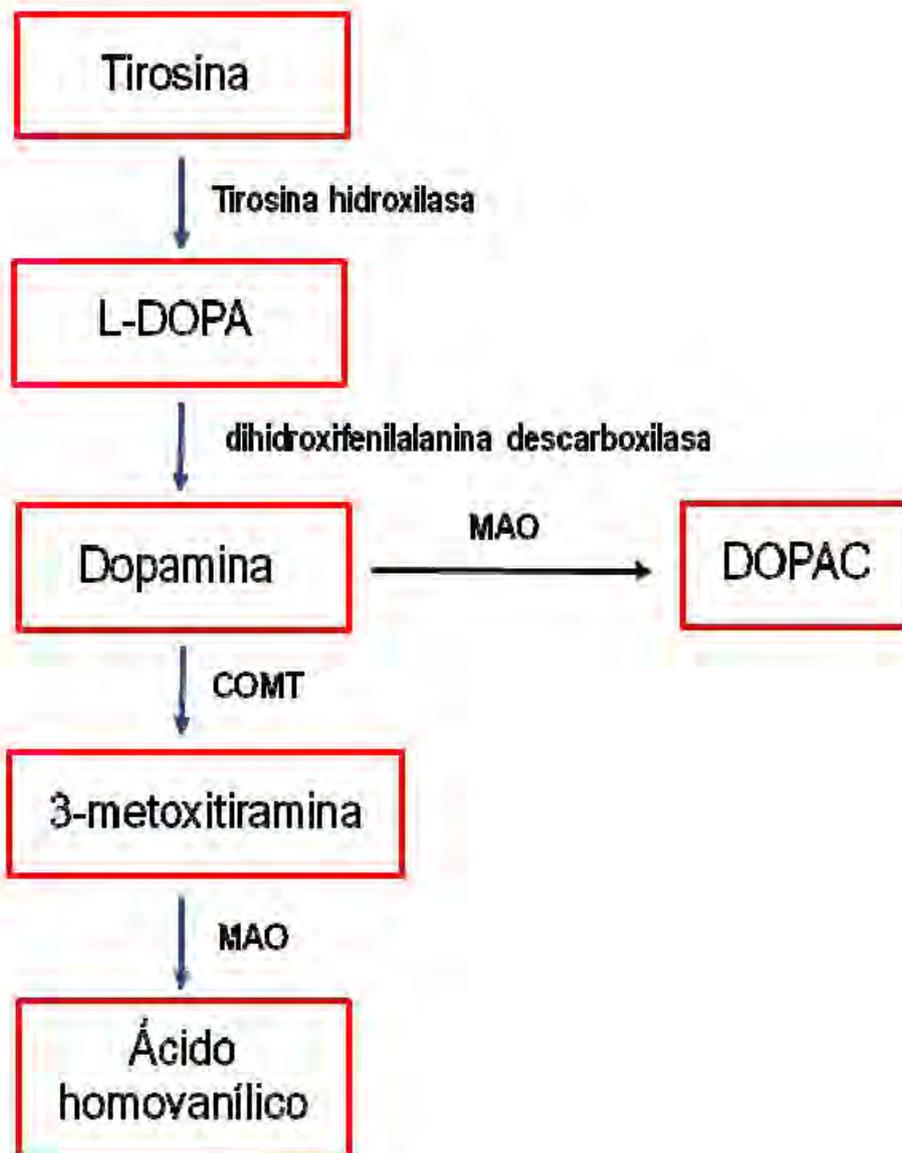


Figura 2. Enzimas que participan en la síntesis y degradación de la dopamina. La tirosina hidroxilasa y la dihidroxifenilalanina descarboxilasa llevan a cabo las reacciones de síntesis de la dopamina a partir del aminoácido tirosina; Mientras que la catecol-o-metil transferasa (COMT) y monoamino oxidasa (MAO) oxidan a este neurotransmisor hasta sus productos de degradación, el ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico. L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

pertencen a la superfamilia de receptores de 7 pasos transmembranales acoplados a proteínas G, se clasifican en dos tipos de receptores: los de tipo D1 (DRD1), con dos subtipos denominados D1 y D5, y los receptores de tipo D2 (DRD2), con tres subtipos denominados D2, D3 y D4 [15]. Los receptores de la dopamina D1 y D2 se encuentran acoplados a proteínas G estimuladoras (Gs) o inhibitorias (Gi), que a su vez activan o inhiben a la enzima adenilato ciclasa, respectivamente (Fig. 3). Esta enzima es la encargada de producir AMPc a partir de ATP [5, 15]. En los lactotopos, las células de la hipófisis especializadas en sintetizar y secretar prolactina, sólo están presentes los receptores de tipo D2. La unión de la dopamina a este receptor activa a la proteína Gi e inhibe a la adenilato ciclasa disminuyendo las concentraciones intracelulares de AMPc. Este segundo mensajero se une a la proteína cinasa A (PKA) para activarla, por lo que al disminuir las concentraciones de AMPc se inhibe a esta enzima [5] (Fig. 3). La PKA fosforila factores de transcripción que pueden inducir o inhibir la transcripción de genes blanco. A través de inhibir a la PKA, la dopamina inhibe de manera indirecta la transcripción génica de la PRL, ya que esta enzima aumenta la transcripción del gen de factor de transcripción Pit-1 [5]. Por otra parte, la dopamina, a través de sus DRD2 acoplados a proteínas G₀, inhibe el flujo de calcio lo que provoca la inhibición de la secreción de prolactina. Además inhibe a la fosfolipasa C y a la proteína cinasa C (PKC), resultando en la disminución de las concentraciones de calcio intracelular al disminuir la movilización de este segundo mensajero en el retículo endoplásmico [9, 15], de esta manera este neurotransmisor inhibe la secreción de la prolactina hipofisaria (Fig. 3). Un mecanismo menos estudiado del control dopaminérgico sobre la expresión de la prolactina hipofisaria, es a través de la vía de las MAPKs. A este respecto se ha reportado que la dopamina, a través de la unión al receptor D2 acoplado a proteínas G₀, inhibe la activación de ERK1/2, un miembro de la familia de las MAPKs; además, aumenta la presencia de los represores ERF y ETS en el núcleo, inhibiendo de esta manera la actividad transcripcional de promotor de la prolactina en la hipófisis [16].

La prolactina y el sistema inmunológico

El RNAm de la prolactina es expresado en varios sitios extrahipofisarios incluyendo la decidua placentaria y las células del sistema inmunológico como son los linfocitos T, los linfocitos B, los monocitos y las células asesinas naturales [17]. La unión de la prolactina a su receptor permite la dimerización del mismo para ser activado, siendo este el primer

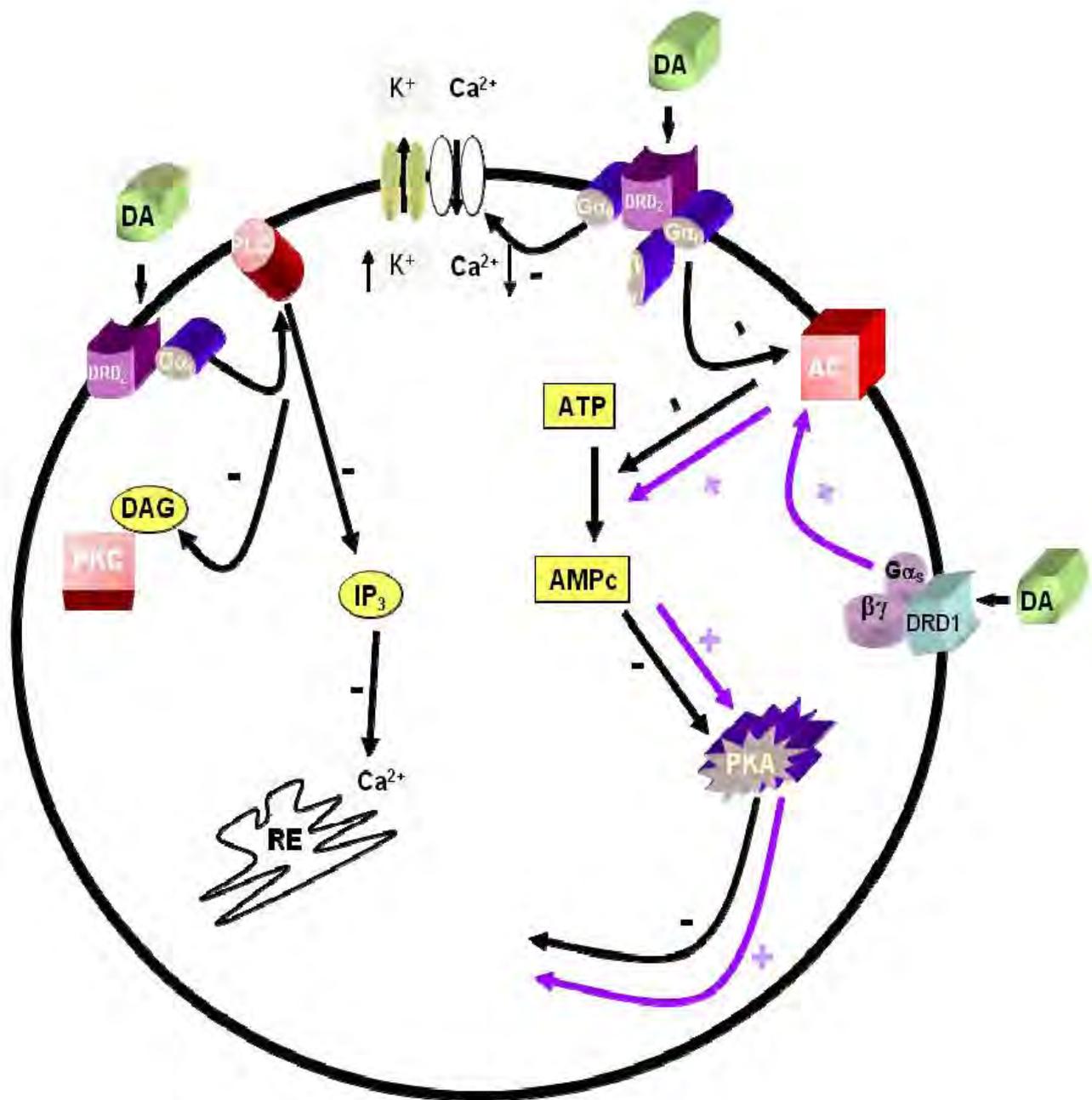


Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores de dopamina (DA). Receptores de tipo 1 y 2 (DRD1 y DRD2) de dopamina, proteína cinasa A y C (PKA y PKC), fosfolipasa C (PLC) diacilglicerol (DAG), inositol trifosfato (IP₃), retículo endoplásmico (RE), proteínas G estimuladoras e inhibitorias (Gs y Gi), adenilato ciclasa (AC), estimula (+), inhibe (-). Las proteínas G consisten de tres subunidades, α, β y γ.

paso para que ésta hormona ejerza sus acciones en las células blanco [3]. El receptor de la prolactina es expresado en las células mononucleares, incluyendo a los linfocitos T, los linfocitos B, los monocitos y las células asesinas naturales [18, 19]. Existen cinco isoformas del receptor de prolactina, producto del procesamiento alternativo de su RNAm: una isoforma larga, una isoforma intermedia, dos isoformas cortas y una isoforma soluble [1]. La unión del ligando a su receptor activa varias vías de señalización que incluyen a la janus cinasa y transductores de señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT), a la MAPK y a la fosfoinositol 3 cinasa [1]. Al parecer la prolactina no es una molécula indispensable en las funciones del sistema inmunológico, dado que el modelo deficiente de su receptor sobrevive y no presenta inmunosupresión o alteración en las funciones inmunológicas básicas [20]. Por tal motivo, se ha sugerido que sus acciones serían redundantes con las de otras citocinas [20]. De hecho, esta hormona es considerada una citocina debido a que: es sintetizada y secretada por las células del sistema inmunológico, su receptor pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase 1 y ejerce acciones autócrinas y parácrinas en estas células [17, 21, 22]. En relación a sus efectos, se ha reportado que la prolactina es un factor de supervivencia celular, ya que promueve la proliferación de los linfocitos y ejerce efectos anti-apoptóticos [2, 17, 23]. Esta hormona-citocina también actúa como una molécula adaptadora al estrés, importante en el mantenimiento del sistema inmunológico. En este respecto, se ha demostrado que la prolactina es necesaria para el balance de los efectos negativos de los glucocorticoides y de otros mediadores inmunes o inflamatorios [22, 24]. Además inhibe la apoptosis de los linfocitos inducida por los glucocorticoides a través de las vías de señalización que incluyen la inducción de pim-1 y miembros de la familia de la proteína antiapoptótica bcl-2 [24-26]. Existe evidencia de que la prolactina tiene efectos agudos y crónicos en la respuesta inmune y autoinmune: esta hormona activa a la PKC que es esencial para la proliferación de las células T, además de que, como citocina, conduce a la respuesta de tipo Th1 aumentando la secreción de citocinas tales como IL-12, IL-1, IL-6 e INF- γ y aumenta el efecto de IL-2, y la expresión de sus receptores, en los linfocitos [27]. A la prolactina se le ha implicado en la patogénesis y progresión de ciertas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y el lupus eritematoso generalizado [27, 28]. El lupus eritematoso generalizado es una enfermedad autoinmune sistémica, que se caracteriza por el depósito de complejos autoinmunes en diferentes órganos, siendo más común en mujeres en edad reproductiva en una relación 10:1 comparada con hombres [29].

Aproximadamente el 30% de los pacientes que cursan con esta enfermedad tienen elevadas concentraciones de prolactina circulante o hiperprolactinemia [27]. Además, la secreción y síntesis de prolactina de origen linfocitario se encuentra aumentada en estos pacientes [28]. En modelos animales existe una clara evidencia entre la hiperprolactinemia y la actividad de la enfermedad [30], sin embargo, en casos clínicos la asociación entre ambos es controversial [28]. La prolactina aumenta la secreción de anticuerpos anti-dsDNA inmunoglobulina M (IgM) e IgG en las células mononucleares de los pacientes con lupus y permite la síntesis y secreción de citocinas en los linfocitos T, como la interleucina 1 (IL-1), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e interferón γ (INF- γ) que estimulan la proliferación y diferenciación de las células B [27, 31]. Por lo anterior, la prolactina se ha asociado con la fisiopatología del lupus [31], sin que hasta el momento se conozca si las concentraciones elevadas de esta hormona sean parte de la causa o sean producto de la respuesta a esta patología. El conocimiento más profundo de la regulación génica de la prolactina a nivel linfocitario, contribuirá a entender mejor la fisiopatología de enfermedades autoinmunes como es el lupus eritematoso generalizado.

La dopamina y el sistema inmunológico

La dopamina, además de sus efectos a nivel del sistema nervioso central y de la hipófisis, también participa en la respuesta inmunológica. En los linfocitos humanos existe la maquinaria metabólica tanto de la síntesis como de la degradación de las catecolaminas, incluyendo a la dopamina. En estas células se encuentran presentes las enzimas de síntesis (tirosina hidroxilasa y la dihidroxifenilalanina descarboxilasa) y de degradación de las catecolaminas (la monoamino oxidasa y la catecol-o-metil transferasa) (Fig. 2) [13]. Así mismo, los receptores de tipo D1 (DRD1) y D2 (DRD2) de dopamina también se encuentran presentes en las células del sistema inmunológico; específicamente en los linfocitos T, los linfocitos B, los monocitos, los neutrófilos, los eosinófilos y las células asesinas naturales [32], por lo que la dopamina, que es sintetizada en los linfocitos, macrófagos y neutrófilos, ejerce efectos autocrinos y paracrinos. En los linfocitos T, la dopamina inhibe la proliferación y la secreción de citocinas como la IL-12p40, la IL-2, el INF- γ y la IL-4, al unirse a sus DRD2 y DRD3 y actuando como supresor de las citocinas proinflamatorias [33, 34]. Por otra parte, aumenta la síntesis y secreción de IL-10 y TNF α al unirse a sus DRD2, DRD3 o DRD1/D5 [35]. Estudios *in vivo* han mostrado que la administración de la L-DOPA (precursor de la dopamina) o la misma dopamina disminuyen el número de células

linfocitarias de bazo productoras de INF- γ [36]. Además, la dopamina induce la apoptosis en las células mononucleares al incrementar las concentraciones intracelulares de las especies reactivas del oxígeno y disminuyendo las concentraciones intracelulares de la superóxido dismutasa (una enzima antioxidante), así como la proteína anti-apoptótica bcl-2 [37]. Por lo anterior se deduce que la prolactina y la dopamina ejercen efectos contrarios, tanto en la secreción de citocinas como en la supervivencia de los linfocitos. Por otra parte, en un estudio realizado en linfocitos humanos, la dopamina no tuvo efecto en el contenido intracelular de AMPc [38], sin embargo, al ser estimulados con un activador directo de la adenilato ciclasa, la forskolina, la dopamina inhibió el contenido intracelular de este segundo mensajero de manera dosis-dependiente, sugiriendo la participación de los DRD2 [38] que se encuentran acoplados a proteínas Gi.

Regulación de la prolactina de origen linfocitario

La regulación de la prolactina de origen linfocitario ha sido poco estudiada. A este respecto, se ha demostrado que análogos del AMPc así como activadores de las células T como la fitohemaglutinina (PHA) y ésteres de forbol como el PMA, aumentan la actividad transcripcional del promotor alternativo de la prolactina [39]. Asimismo, en un estudio realizado en células mononucleares cultivadas *in vitro*, se observó que el AMPc aumenta la expresión del gen de la prolactina, mientras que el PMA lo inhibe [6]. En células Jurkat, que es una línea celular derivada de linfocitos T humanos, se demostró que la prostaglandina E₂, a través de sus receptores EP3 y EP4, que están acoplados a proteínas G, aumentan la expresión génica de la prolactina, además de aumentar las concentraciones de Ca²⁺ y AMPc, respectivamente [40]. También se ha reportado que diferentes citocinas como la IL-2 y la IL-4 inhiben la expresión génica de la prolactina; mientras que el TNF α aumenta la actividad transcripcional del promotor alternativo de la prolactina [41, 42]. Actualmente, la dopamina no es considerada como regulador de la síntesis de la prolactina de origen linfocitario, aunque se ha sugerido esta posibilidad dado que la administración de bromocriptina, un agonista selectivo de los receptores de tipo D2 de dopamina, tiene un efecto ligero sobre la secreción de la prolactina a nivel linfocitario [43], lo que sugiere que la prolactina hipofisaria y/o la dopamina tendrían efectos directos en la síntesis de la prolactina a nivel linfocitario. Además, la presencia de los receptores de dopamina en los linfocitos [32], la síntesis de dopamina por los linfocitos [13], así como el papel de este neurotransmisor en la supresión de citocinas

proinflamatorias [33], sugiere la participación de la dopamina en la regulación de la prolactina de origen linfocitario. Esto es apoyado por la presencia de elementos de respuesta al AMPc en el promotor alternativo de la prolactina y su regulación transcripcional por este segundo mensajero, así como el hecho de que la dopamina modifica las concentraciones intracelulares de AMPc a través de la unión a sus receptores. Así mismo, estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que las células mononucleares obtenidas de sujetos sanos 90 minutos posterior a un estímulo anti-dopaminérgico *in vivo*, secretaban más PRL comparadas con las células mononucleares de sujetos sanos que no recibieron dicho estímulo (Fig. 4), efecto que no se observó en las células de pacientes con lupus (Fig. 4) [44]. Estos antecedentes sugieren la participación de la prolactina circulante o de la dopamina en la síntesis y secreción de la prolactina de origen linfocitario, así como la desregulación de la síntesis de esta hormona en el lupus. Por lo que, en el presente trabajo de tesis se estudió la participación de la dopamina en la expresión del RNAm y la secreción de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica en cultivo.

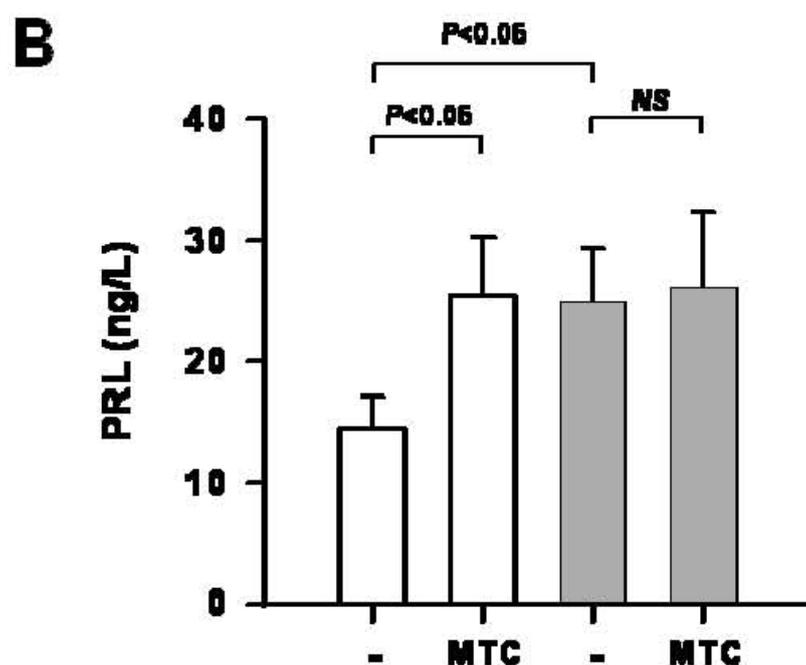
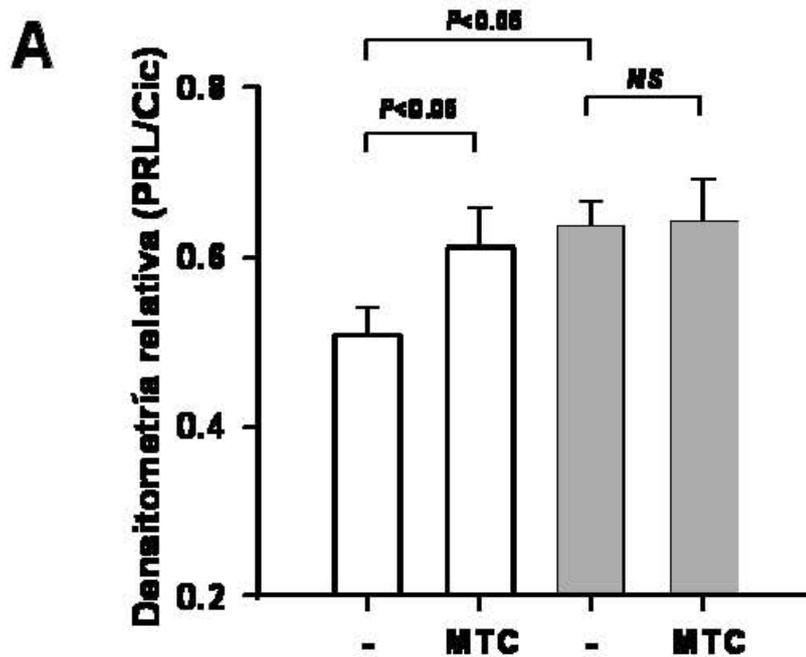


Figura 4. Efecto de la administración de un antagonista dopaminérgico *in vivo*, la metoclopramida (MTC), en la expresión del RNAm y en la secreción de la prolactina (PRL) en las células mononucleares en cultivo (panel A y panel B, respectivamente). Barras blancas = sujetos sanos, barras grises = pacientes con lupus eritematoso generalizado, ciclofilina = Cic (utilizado como gen constitutivo). Las células mononucleares fueron obtenidas en condiciones basales (-) y 90 minutos posteriores al estímulo con MTC *in vivo*.

HIPÓTESIS

La dopamina inhibe la expresión génica y la secreción de la prolactina de origen linfocitario a través de sus receptores D2 y de inhibir las concentraciones intracelulares de AMPc en las células mononucleares de sangre periférica en cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de la dopamina, a través de la inhibición de la vía de señalización del AMPc, en la regulación de la síntesis y secreción de la prolactina linfocitaria en las células mononucleares de sangre periférica sin activar o activadas *in vitro* de sujetos normales.

Objetivos particulares

- 1 Evaluar el efecto de la dopamina y de agonistas de los receptores D1 y D2 sobre la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares en cultivo.
- 2 Estudiar el efecto de la dopamina y de agonistas de los receptores D1 y D2 en el contenido intracelular del AMPc en las células mononucleares en cultivo.
- 3 Analizar la posible inducción de la expresión del RNAm de los receptores D2 por la dopamina y sus agonistas en las células mononucleares en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sujetos

EL estudio se realizó en células mononucleares de sangre periférica de sujetos femeninos y masculinos, que de manera voluntaria decidieron participar en el estudio. Los criterios de inclusión fueron: sujetos sanos entre los 20 y 39 años de edad. En caso de las voluntarias femeninas, con ciclos menstruales regulares que estuvieran en la fase folicular temprana del ciclo menstrual y en ausencia de tratamiento hormonal. Los criterios de exclusión fueron: para las voluntarias femeninas, la presencia de embarazo, lactancia o tratamiento hormonal; en ambos casos, consumo de bebidas alcohólicas por lo menos tres días antes del estudio o la presencia de sintomatología de infección dentro de las siguientes 72 horas posteriores a la toma de la muestra. El estudio fue avalado por el Comité de Ética en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

2. Métodos

2.1 Obtención y cultivo de las células mononucleares de sangre periférica

Para la obtención de las células mononucleares, se colectaron 40 ml de sangre por punción de la vena antecubital de cada donador y se añadieron en un tubo con EDTA 0.5 M (1% del volumen de sangre) como anticoagulante, a las 9:00 h de la mañana en condiciones de ayuno. La sangre se diluyó en un volumen equivalente con solución salina al 0.9% homogenizando por inversión suave. De la sangre diluida se añadieron 15 ml lentamente en un volumen equivalente de Lymphoprep™. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después, las células mononucleares se recuperaron de la interfase y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 pH 7.4 (GIBCO) centrifugando a 1200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El medio se decantó, las células se resuspendieron en 20 ml de medio libre de suero AIM-V (GIBCO) suplementado con 50 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma), como inhibidor de las fosfodiesterasas, y con antibióticos (sulfato de estreptomicina 50 µg/ml y sulfato de gentamicina USP 10 µg/ml). Las células se contaron por el método de tinción vital con azul tripán. La población de células mononucleares se ajustó a una concentración de 1×10^6 células/ml. Con la finalidad de evaluar la expresión del RNAm de la prolactina, las células mononucleares sin activar o

activadas con PMA-ionomicina (2.5 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) se cultivaron en el medio AIM-V suplementado en ausencia o presencia de los diferentes estímulos: 8-Br-AMPC, dopamina, o agonistas de los receptores D2 (DRD2) y D1 (DRD1), 2-Br- α -ergocriptina y (R)-(+)-SKF-38393 (Sigma), respectivamente, por 18 hr a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de aire, en ambiente húmedo. Los fármacos se prepararon al momento para evitar su oxidación o degradación. Para la determinación del AMPc por radioinmunoanálisis específico las células se lisaron con solución de lisis RIPA [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, Nonidet P-40 al 1%, inhibidor de proteasas Mini-Complete (ROCHE)]. Para normalizar los valores de AMPc obtenidos, las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford. El RNA total se extrajo a partir de una alícuota celular por el método del Trizol. Los lisados y los medios se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento. Para evaluar la prolactina secretada al medio de cultivo, las células mononucleares se cultivaron en medio AIM-V en ausencia o presencia de 8-Br-AMPC o de dopamina por 96 hr a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de aire en ambiente húmedo. Al término de la incubación, las células se homogenizaron y se separó el medio por centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos. El medio se congeló a -80 °C hasta su procesamiento. Como control de viabilidad y funcionalidad celular, se cultivaron 1 x 10⁶ células/ml en medio AIM-V suplementado con BSA al 0.1% por triplicado estimuladas con IL-2 (40 U/ml) (ROCHE). Como vehículo, se utilizó PBS 1x en donde fue resuspendida la citocina. Estas células se incubaron por 72 h en las mismas condiciones y se evaluó de manera indirecta la funcionalidad celular en términos de proliferación en respuesta a la IL-2 y diferentes concentraciones de dopamina utilizando el estuche comercial XTT (ROCHE). Brevemente, al término de la incubación, a las células se les agregó el reactivo colorimétrico XTT que es metabolizado por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, dando un producto colorido que es directamente proporcional a la cantidad de células viables. 18 h después, se midió la absorbancia en los pozos a una $\lambda = 492$ nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Labsystems).

2.2 Análisis de la expresión del RNAm de la prolactina

Para evaluar la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares incubadas con los diferentes tratamientos, se realizó la extracción del RNA total que se procesó por la reacción de la transcriptasa reversa (RT) y, posteriormente, por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) de la siguiente manera:

2.2.1 Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo de las células mononucleares por el método de TRIzol (Invitrogen). Al paquete celular se adicionó 1 ml de TRIzol por cada 2×10^6 células, se homogenizó y se separó en alícuotas de 1 ml. Posteriormente, se adicionó cloroformo (0.2 ml por cada ml de TRIzol empleado) y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El RNA se recuperó de la fase acuosa y se precipitó con isopropanol (0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol empleado), se lavó con etanol al 80% (1 ml de etanol por cada ml de TRIzol empleado) y se resuspendió en agua grado PCR. Finalmente, el RNA se cuantificó por espectrofotometría a una $\lambda = 260$ nm y se almacenó a -80 °C para posteriormente procesarlo en la reacción de la RT y qPCR.

2.2.2 Reacción de la transcriptasa reversa (RT)

Debido a que la expresión del RNAm de la prolactina en las CMNP es muy baja, se sintetizó el DNA complementario (DNAc) a partir del RNAm por acción de la enzima transcriptasa reversa. Para la síntesis de la primera cadena de DNAc se utilizó 1.5 μ g de RNA total como molde usando el estuche comercial Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche). La síntesis de la primera cadena de DNAc se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9600 y se llevó a cabo de la siguiente manera: un ciclo a 65 °C por 10 minutos, un ciclo a 55 °C de 30 minutos y un ciclo de 85 °C por 5 minutos. Posteriormente, el DNAc obtenido se amplificó utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para la amplificación del DNAc de la prolactina y de los DRD2 de dopamina, se utilizaron oligonucleótidos específicos (GIBCO) en la reacción de qPCR con las siguientes secuencias: prolactina sentido (5') GCACAGGAGCAGGTTTGAC (3'), prolactina anti-sentido (5') AAAGGATCGCCATGGAAAG (3'); DRD2 sentido (5') TGTTTCAGGATGTGTGTGATGAA (3'), DRD2 anti-sentido (5') CTCAGATGCTCGCCATTGT (3'). Para normalizar la expresión del RNAm de la prolactina y D2, se utilizaron oligonucleótidos para el gen constitutivo de gliceraldeído-3-fosfodeshidrogenasa (GAPDH) con las siguientes secuencias: GAPDH sentido (5') GCCCAATACGACCAAATCC (3') y GAPDH anti-sentido (5') AGCCACATCGCTGAGACAC (3'). En el caso de las células mononucleares activadas,

se utilizaron los oligonucleótidos para el gen constitutivo de L-32 con las siguientes secuencias: L-32 sentido (5') TGTTTCAGGATGTGTGTGATGAA (3') y L-32 anti-sentido (5') ACCGTCCTTCTCTCTTCCT (3'). Las reacciones de amplificación generaron un fragmento de 60 pb para la PRL, un fragmento de 75 pb para DRD2, un fragmento de 66 pb para el GAPDH y un fragmento de 77 pb para L-32. El PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando un termociclador LightCycler 2.0 de ROCHE (ROCHE Diagnostics, Mannheim, Germany) de acuerdo al siguiente protocolo: Activación de la Taq DNA polimerasa: desnaturalización a 95 °C por 10 minutos y, 45 ciclos de amplificación consistiendo de 10 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 1 s a 72 °C.

2.3 Determinación de AMPc por radioinmunoanálisis

Para evaluar el contenido intracelular de AMPc en las células mononucleares incubadas en presencia de los diferentes estímulos, se utilizó la técnica de radioinmunoanálisis de la siguiente manera: Se preparó el ¹²⁵I-AMPc (PerkinElmer) a una concentración de 10,000 cpm en 25 µl en solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM con BSA 0.1%, pH 6.1. Se utilizó un anticuerpo anti-AMPc de conejo (Calbiochem) diluido 1/3000 en solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM con BSA 0.1%, pH 6.1. Se utilizó adenosine 3,5'-cyclic monophosphate sodium salt, (Sigma, No. Cat A-6885) para la realización de la curva estándar de AMPc. Tanto las concentraciones de la curva como las muestras problema, se acetilaron con una mezcla de trietilamina y anhídrido acético (2:1) (Sigma), debido a que el anticuerpo reconoce la molécula de AMPc acetilada haciendo más sensible el análisis. Se utilizaron 50 µl de cada muestra o de la curva estándar, 25 µl de anticuerpo AMPc y 25 µl de ¹²⁵I-AMPc, por duplicado. Los tubos con las mezclas se incubaron a 4 °C por 18 horas. Después de la incubación, la reacción fue detenida adicionando 1 ml de etanol de 96° frío e inmediatamente se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Al término de la centrifugación se decantó el sobrenadante y se cuantificó la radioactividad del precipitado en un contador para radiaciones gamma (PACKARD, Cobra II auto gamma). Los valores de las muestras desconocidas se interpolaron en la curva estándar.

2.4 Análisis de la expresión de los receptores D2 de dopamina por Western blot

Para determinar la expresión de los DRD2 en las células mononucleares, se realizó la técnica de Western blot de la siguiente manera: al término del cultivo, las células se

lisaron con solución RIPA y se determinó las concentraciones de proteína total de cada muestra, por el método de Bradford. De cada muestra, se procesaron 80 µg de proteína en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 13%, que posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF (Inmobilon, Millipore). Las membranas se incubaron con solución de bloqueo TBST (20 mM de tris base, 0.5 M de NaCl, 0.1% de tween 20) con 5% de leche descremada toda la noche a 4°C. Al término de la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST y se incubaron con anticuerpo (IgG de conejo) anti-DRD2 (1/100) (Santa Cruz Biotechnology) por 1.5 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBST por 10 minutos y se incubaron en el segundo anticuerpo (IgG de cabra) anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1/2000) (Santa Cruz Biotechnology). Se realizaron 4 lavados con TBST de 10 minutos. Para la detección de las bandas se utilizó Luminol (Amersham).

2.5 Cuantificación de la prolactina secretada al medio de cultivo por ensayo de ELISA

La prolactina secretada al medio de cultivo por las células mononucleares, se determinó con el estuche comercial de ELISA (R&D, cat. No. DY682) en placas de 96 pozos con alta afinidad a proteínas (Corning). El procedimiento consistió en lo siguiente: las placas utilizadas fueron sensibilizadas con 100 µl de anticuerpo de captura, a la concentración recomendada en el protocolo comercial R&D, y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Al término de la incubación, las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado (PBS + 0.05% de Tween 20). Posteriormente, se adicionó 300 µl de solución de bloqueo y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado. Se preparó una curva estándar de prolactina recombinante que incluyó una serie de 7 concentraciones por duplicado. De cada muestra de medio de cultivo se adicionó 100 µl, por duplicado, y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Al término de la incubación, las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado. 100 µl anticuerpo de detección específico para la prolactina se adicionaron, se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y al término de la incubación se lavaron 3 veces con solución de lavado. Posteriormente, 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) se adicionaron y se incubaron por 20 minutos en ausencia de la luz. Al finalizar la incubación, las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado. A continuación, 100 µl de solución sustrato R&D (1:1 peróxido de hidrógeno y tetrametilbenzidina) se adicionaron y se incubaron por 20

minutos en ausencia de la luz. Inmediatamente, para parar la reacción, se adicionaron 50 μ l de ácido sulfúrico 1 N. Finalmente, se cuantificó la absorbancia del producto colorido a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Multiskan Labsystem). La cantidad del producto colorido formado fue directamente proporcional a la cantidad de PRL en la muestra.

3. Análisis estadístico

Las diferencias entre los estímulos fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía y posteriormente aplicando la prueba de Dunnet o Kruskal-Wallis dependiendo de la distribución de los datos, considerando como significativamente diferente un valor de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Proliferación de las células mononucleares de sangre periférica en respuesta a la IL-2

Las células mononucleares de sangre periférica son una población constituida por linfocitos T, linfocitos B, monocitos y células asesinas naturales (NK). La IL-2 estimula la proliferación de los linfocitos T [45], por lo que las células mononucleares obtenidas se estimularon, por separado, con IL-2 como un control de viabilidad y funcionalidad celular. Las células se incubaron por 72 h y se determinó la proliferación de forma indirecta utilizando el reactivo colorimétrico XTT. En la figura 5A se observa que la IL-2 aumentó significativamente la proliferación de las células mononucleares mantenidas en cultivo.

Por otra parte, se ha reportado que la dopamina inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis tanto en las células mononucleares, los linfocitos T, como en las células mononucleares de bazo [36, 37, 46]. Por tal motivo, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de dopamina en la proliferación de las células mononucleares mantenidas en cultivo. Las células se incubaron por 72 h y se determinó utilizando el reactivo colorimétrico XTT. Los resultados muestran que las diferentes concentraciones utilizadas de dopamina no modificaron la concentración de células viables en el cultivo (Fig. 5B).

Curvas estándar y de eficiencia de los genes analizados por PCR en tiempo real.

La técnica de PCR en tiempo real (qPCR) permite la detección de amplificación de DNA durante las fases tempranas de la reacción de qPCR. Esta técnica se fundamenta en la utilización de una sonda, que al sintetizarse nuevas cadenas de DNA, emite luz fluorescente y la intensidad de luz es proporcional al número de cadenas sintetizadas. Con el fin de validar la técnica de qPCR, se realizaron curvas estándar utilizando diferentes diluciones, por triplicado, de varias muestras de RNA procesadas por RT-qPCR. Para cada uno de los genes analizados se utilizaron oligonucleótidos específicos. Como controles negativos, se utilizaron agua estéril y una muestra de RNA procesada en ausencia de la enzima transcriptasa reversa. Con las curvas estándar, se calculó la eficiencia del método.

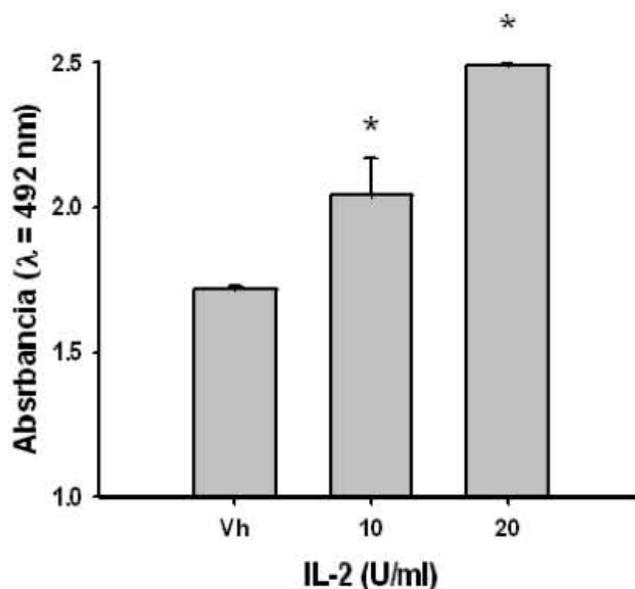
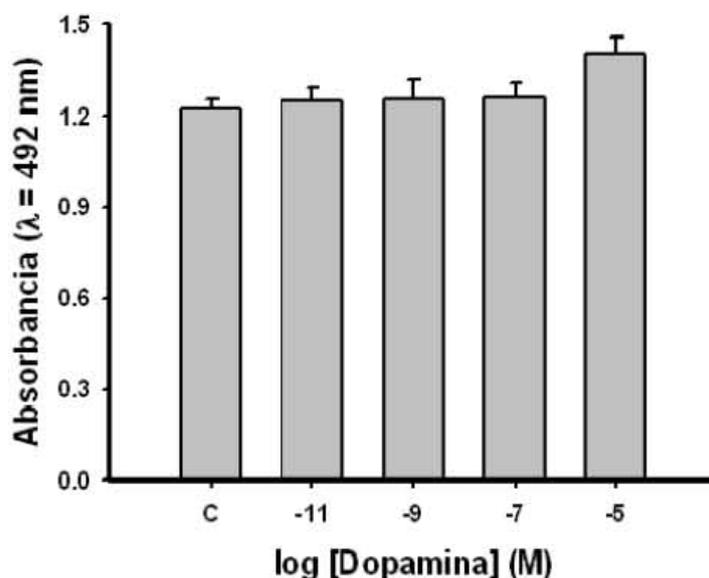
A**B**

Figura 5. Efecto de la IL-2 (panel A) y de la dopamina (panel B) en la proliferación de las células mononucleares en cultivo. La proliferación celular se midió indirectamente por la medición de la absorbancia, a una $\lambda = 492$ nm, del producto colorido formado al añadir el reactivo de XTT. C = control, Vh = vehículo (PBS 1x). Los resultados están representados como la media \pm EE, $n = 3$ y $n = 4$, respectivamente. * $P < 0.05$ vs Vh.

En la figura 6 se muestran las curvas estándar de los genes analizados (6A PRL, 6B GAPDH, y 6C L-32), representadas por el número de ciclos de amplificación vs la absorbancia de luz fluorescente emitida. Se observó que las curvas generadas en el qPCR son proporcionales a la dilución realizada, siendo los triplicados reproducibles. Las eficiencias de 1.6 a 2 son los valores requeridos para considerar que el método de qPCR es confiable. Las eficiencias calculadas para cada una de las curvas fueron: prolactina = 1.711, GAPDH = 1.770 y L-32 = 1.852. En los controles negativos de qPCR y RT no se observó amplificación. Debido a que la expresión de los receptores D2 de dopamina (DRD2) en las células mononucleares fue muy baja, no se pudo obtener una curva estándar para este gen.

Con el objeto de confirmar si los productos de qPCR generados son del tamaño esperado, además de que son productos únicos de amplificación, éstos se procesaron en un gel de agarosa al 4%. En la figura 6D se observó que los productos de qPCR tuvieron el tamaño esperado: de 60 pb para prolactina, de 66 pb para GAPDH y de 77 pb para L-32. Sin embargo, en el producto de amplificación del DRD2 se observaron dos bandas, incluyendo la banda esperada en 75 pb. El DRD2 de dopamina tiene dos isoformas producto del procesamiento alternativo del RNAm, una larga (DRD2_L) y una corta (DRD2_S), por lo que, posiblemente los oligonucleótidos utilizados detectan ambas isoformas.

Efecto del 8Br-AMPC en la expresión del RNAm y de la secreción de la prolactina en las CMNP en cultivo.

Estudios previos han demostrado que análogos del AMPC aumentan la expresión del gen de la prolactina en los linfocitos [6]. Para evaluar si este segundo mensajero modifica la expresión del RNAm de la PRL en las células mononucleares en nuestro sistema, las células se cultivaron en presencia de 8Br-AMPC, que es un análogo no hidrolizable del AMPC. El RNA total extraído de las células se procesó por RT y qPCR. Los resultados fueron normalizados contra el gen constitutivo de GAPDH. La expresión del control (células mononucleares sin tratamiento) se le asignó el valor de 1 y las muestras de los diferentes estímulos fueron comparadas contra dicho control. Los resultados obtenidos muestran que el 8Br-AMPC aumentó significativamente la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares mantenidas en cultivo (Fig. 7A). Los resultados fueron similares al ser normalizados con el gen constitutivo de β -actina (dato no mostrado).

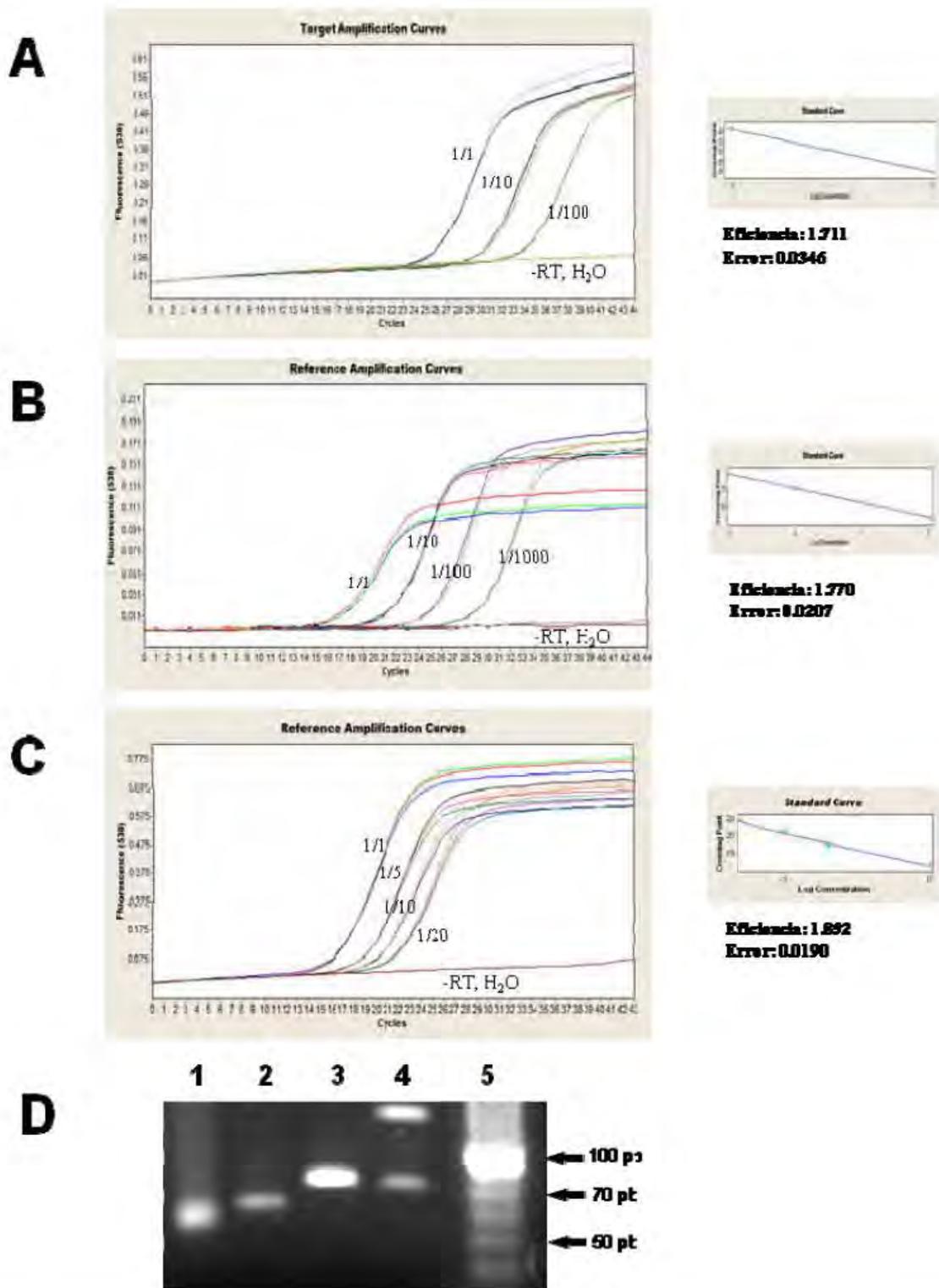


Figura 6. Curvas estándar y de eficiencia de los genes analizados por triplicado por qPCR. Panel A) PRL. panel B) GAPDH y panel C) L-32. Panel D) Productos de qPCR coridos en gel de agarosa al 4% de los diferentes genes analizados; 1= PRL (60 pb), 2= GAPDH (66 pb), 3= L-32 (77 pb), 4= DRD2 (75 pb) y 5= marcador de peso molecular en escalera de 10 pb.

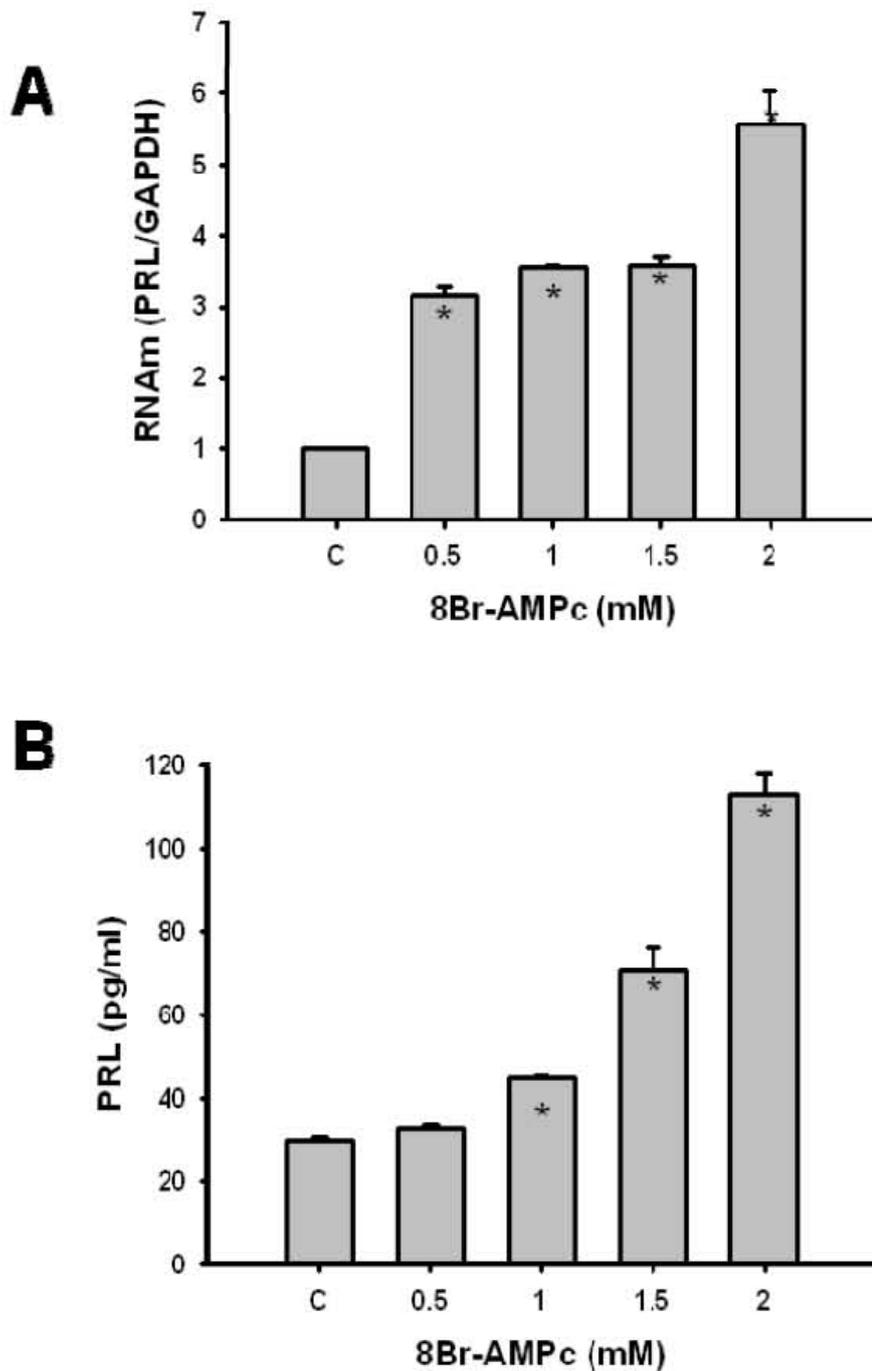


Figura 7. Efecto del 8Br-AMPC en la expresión del RNAm de la PRL en las células mononucleares en cultivo (panel A). Los resultados fueron normalizados contra el gen constitutivo de GAPDH, al control se le asignó el valor de 1. Efecto del 8Br-AMPC en la secreción de la PRL en las células mononucleares (panel B). C = control (sin tratamiento). Experimento realizado por triplicado y expresado como la media \pm DE. *P < 0.05 vs C.

Con el objeto de evaluar el efecto del análogo del AMPc en la secreción de la prolactina en las células mononucleares en cultivo, estas células se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de 8Br-AMPc y se cuantificó la prolactina en el medio por el método de ELISA. Los resultados obtenidos muestran que el 8Br-AMPc aumentó de manera dosis-dependiente la secreción de la prolactina en las células mononucleares (Fig. 7B), de manera similar a lo observado con la expresión del RNAm de la prolactina.

Efecto de la dopamina en la expresión del RNAm y la secreción de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica en cultivo.

Para evaluar el efecto de la dopamina en la expresión del RNAm de la prolactina, las células mononucleares fueron incubadas en presencia de diferentes dosis de este neurotransmisor. Los valores de la expresión de prolactina fueron normalizados contra los valores de la expresión del gen constitutivo de GAPDH. El valor obtenido de esta relación para el control se le dio el valor de 1. Los resultados mostraron que la dopamina inhibió la expresión del RNAm de la prolactina en el 50% de los experimentos realizados en las células mononucleares (n = 5) (Fig. 8A), mientras que en el otro 50% de los experimentos, la dopamina no modificó la expresión del RNAm de la prolactina (n = 5) (Fig. 8B). La respuesta dual de la dopamina no fue debida al donador, ya que diferentes muestras de un mismo donador tomadas en diferentes días fueron analizadas y la respuesta podía ser inhibitoria o haber falta de respuesta. Por lo que estos resultados sugieren que diferentes mecanismos de regulación de la prolactina o enfermedades subclínicas contribuyen en la respuesta dual de la dopamina en estas células. El efecto observado de la dopamina en la expresión del RNAm de la prolactina fue similar en las células mononucleares que provenían de hombres (Fig. 9) con respecto a las células que provenían de mujeres.

Con el objeto de evaluar si la dopamina modifica la secreción de prolactina de origen linfocitario, las células mononucleares se estimularon con diferentes concentraciones de este neurotransmisor. Debido a que las células mononucleares secretan bajas concentraciones de prolactina estas células fueron activadas con concanavalina A (Con A) y de esta forma estimular su secreción. Los resultados mostraron que la dopamina inhibió la secreción de la prolactina en el 50% de los experimentos realizados en las células mononucleares (Fig. 10A); asimismo, el otro 50% de los experimentos la dopamina no tuvo efecto sobre la secreción de la prolactina (Fig. 10B).

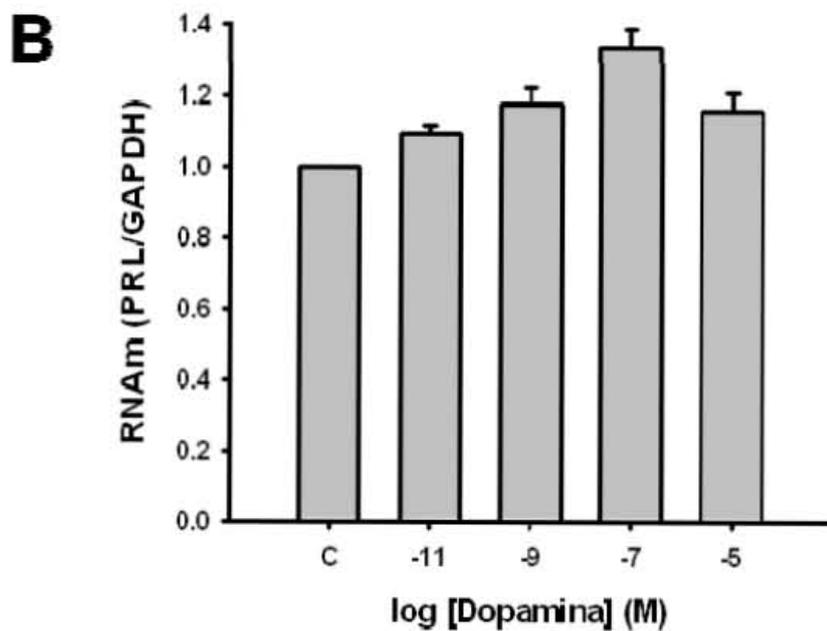
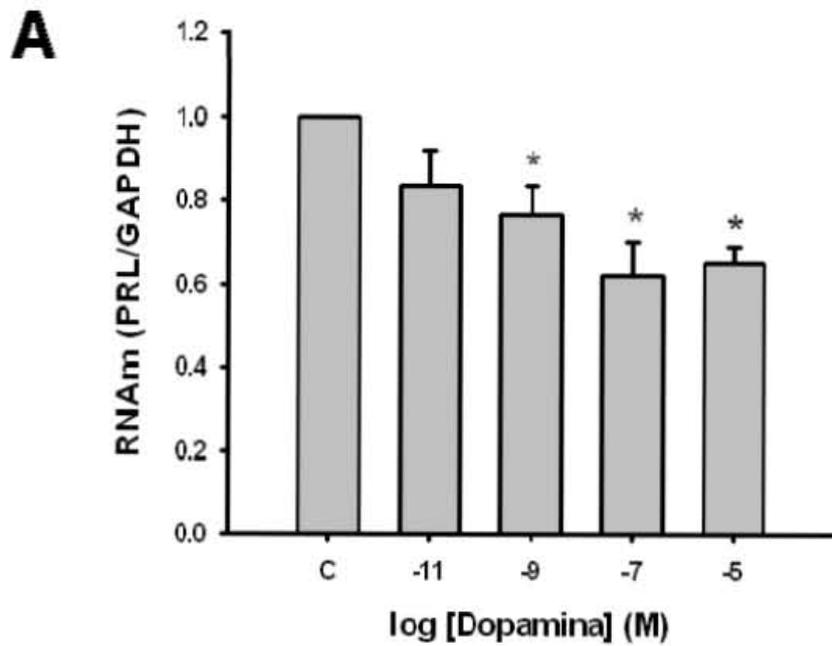


Figura 8. Efecto de la dopamina en la expresión del RNAm de la PRL en las CMNP en cultivo obtenidas de mujeres sanas. Efecto inhibitor (panel A). sin efecto (panel B). C = control (sin tratamiento). Al control se le asignó el valor de 1. Los resultados están representados como la media \pm EE de 5 experimentos diferentes. * $P < 0.05$ vs C.

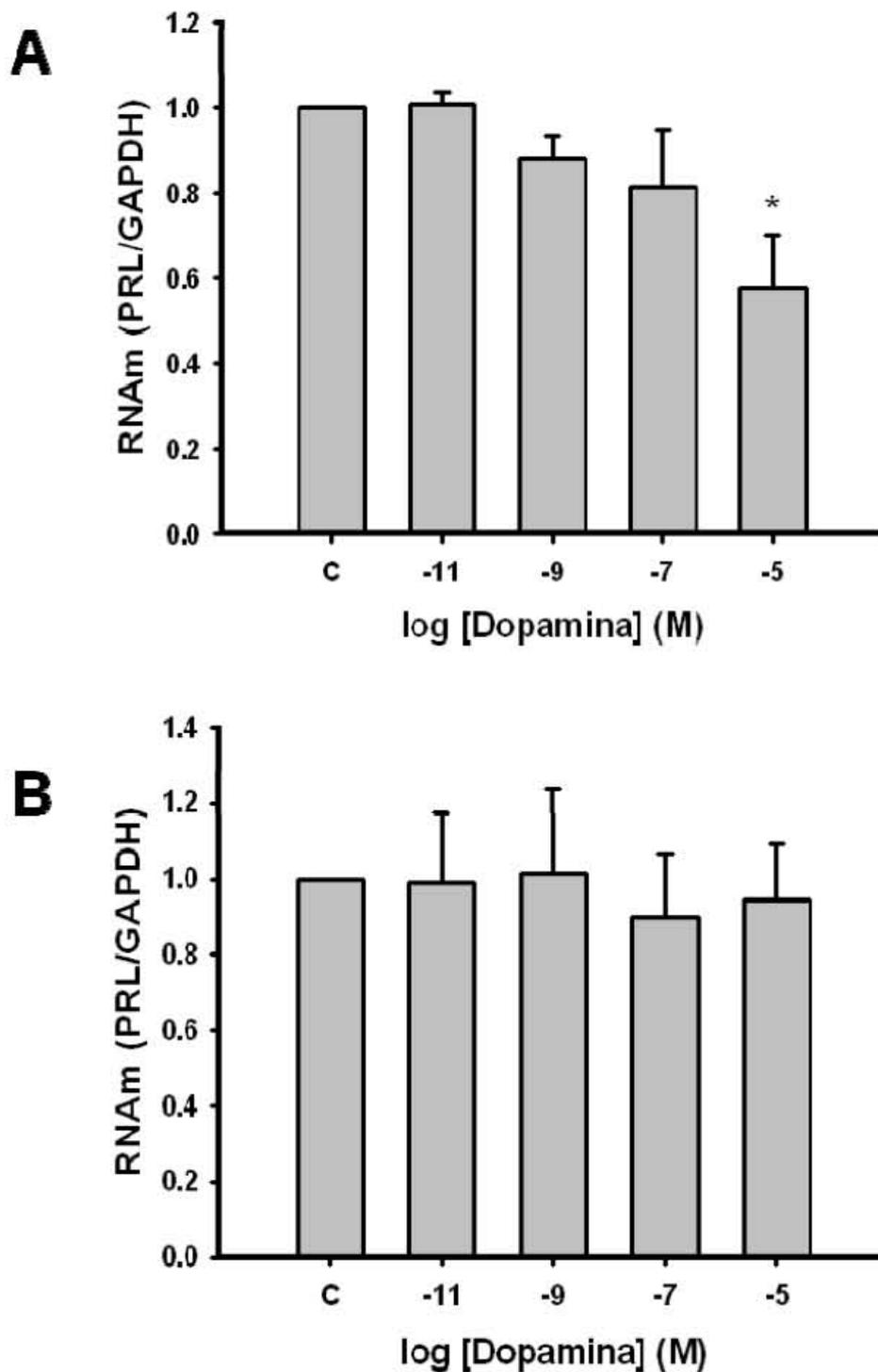


Figura 9. Efecto de la dopamina en la expresión del RNAm de la PRL en las CMNP en cultivo obtenidas de hombres sanos. Efecto inhibitor (panel A), sin efecto (panel B). C = control (sin tratamiento). Al control se le asignó el valor de 1. Los resultados están representados como la media \pm DE de un experimento realizado por duplicado.

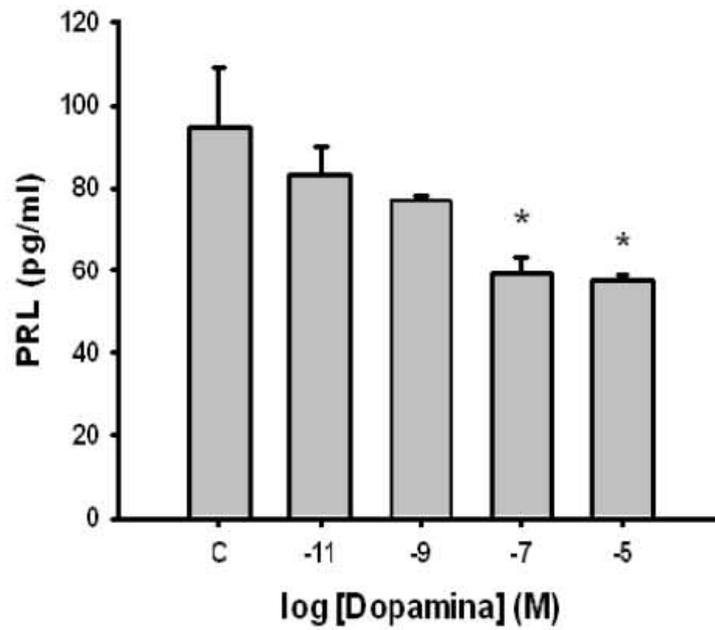
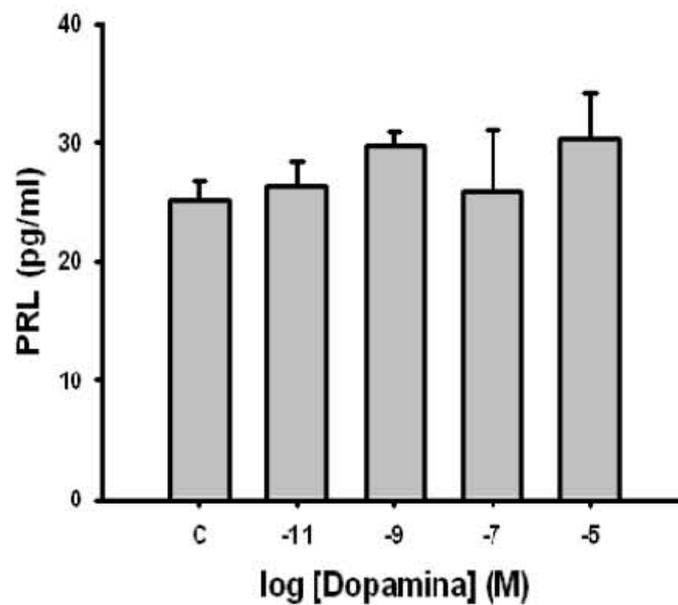
A**B**

Figura 10. Efecto de la dopamina en la secreción de la PRL en las CMNP activadas con Con A (2.5 $\mu\text{g/ml}$) obtenidas de mujeres sanas. Efecto inhibitor (panel A), sin efecto (panel B). Los resultados están representados como la media \pm DE de un experimento realizado por triplicado de pozo.

Efecto de la dopamina en el contenido intracelular de AMPc en las células mononucleares de sangre periférica en cultivo.

Dado que los receptores de la dopamina actúan a través de modificar las concentraciones intracelulares de AMPc, se determinó el contenido intracelular de este segundo mensajero en respuesta a diferentes concentraciones de dopamina. En los resultados se observó que este neurotransmisor inhibió significativamente el contenido intracelular de AMPc a las dosis de 10^{-7} M y 10^{-9} M de dopamina en el 50% de los experimentos realizados en las células mononucleares en cultivo (Fig. 11A). Mientras que el otro 50% de los experimentos, la dopamina no modificó la expresión del AMPc intracelular (Fig. 11B).

Efecto de agonistas de los DRD2 y DRD1/DRD5 de la dopamina en la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica.

Para evaluar si el efecto inhibitorio de la dopamina en la expresión del RNAm de la prolactina es a través de sus DRD2, las células mononucleares fueron incubadas en presencia de un agonista selectivo, la 2-Br- α -ergocriptina. Los resultados del presente estudio muestran que la 2-Br- α -ergocriptina inhibió la expresión del RNAm de la prolactina (Fig. 12A) en el 50% de los experimentos realizados con las células mononucleares, de manera similar a lo observado con la dopamina (Fig. 8A). Mientras que en el otro 50% de los experimentos realizados, la 2-Br- α -ergocriptina no modificó la expresión del RNAm de la prolactina (Fig. 12B).

Con el objeto de evaluar si los DRD1/DRD5 participaban en la regulación de la expresión del RNAm de la prolactina de origen linfocitario, las células mononucleares fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de (R)-(+)-SKF-38393 (SKF), un agonista selectivo de dichos receptores. Los resultados mostraron que este agonista no modificó la expresión del RNAm de la prolactina en las CMNP en cultivo (Fig. 12C).

Expresión basal del DRD2 de dopamina en las células mononucleares de sangre periférica mantenidas en cultivo.

Para comprobar que las células mononucleares expresan a los DRD2 de manera basal, se determinó su presencia en estas células por la técnica de Western blot. Como se muestra en la figura 13A, se detectó la banda correspondiente a los DRD2 en las células mononucleares, con un peso molecular aparente de 50 kDa, que es el peso

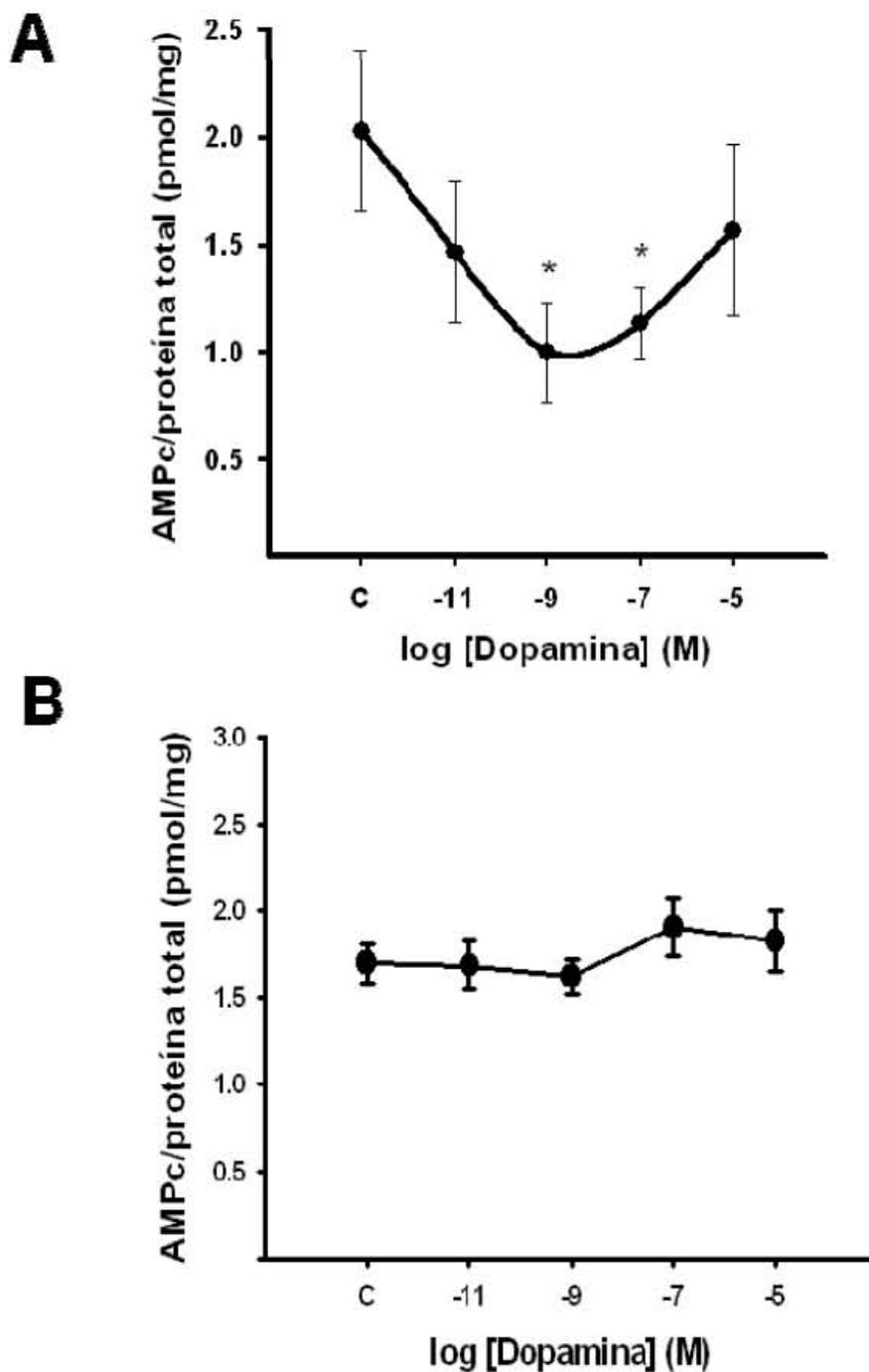


Figura 11. Efecto de la dopamina en el contenido intracelular de AMPc en las células mononucleares en cultivo obtenidas de mujeres sanas. Efecto inhibitor (panel A), sin efecto (panel B). C = control (células mononucleares sin tratamiento). Los resultados están representados como la media \pm EE de 4 experimentos diferentes. * $P < 0.05$ vs C.

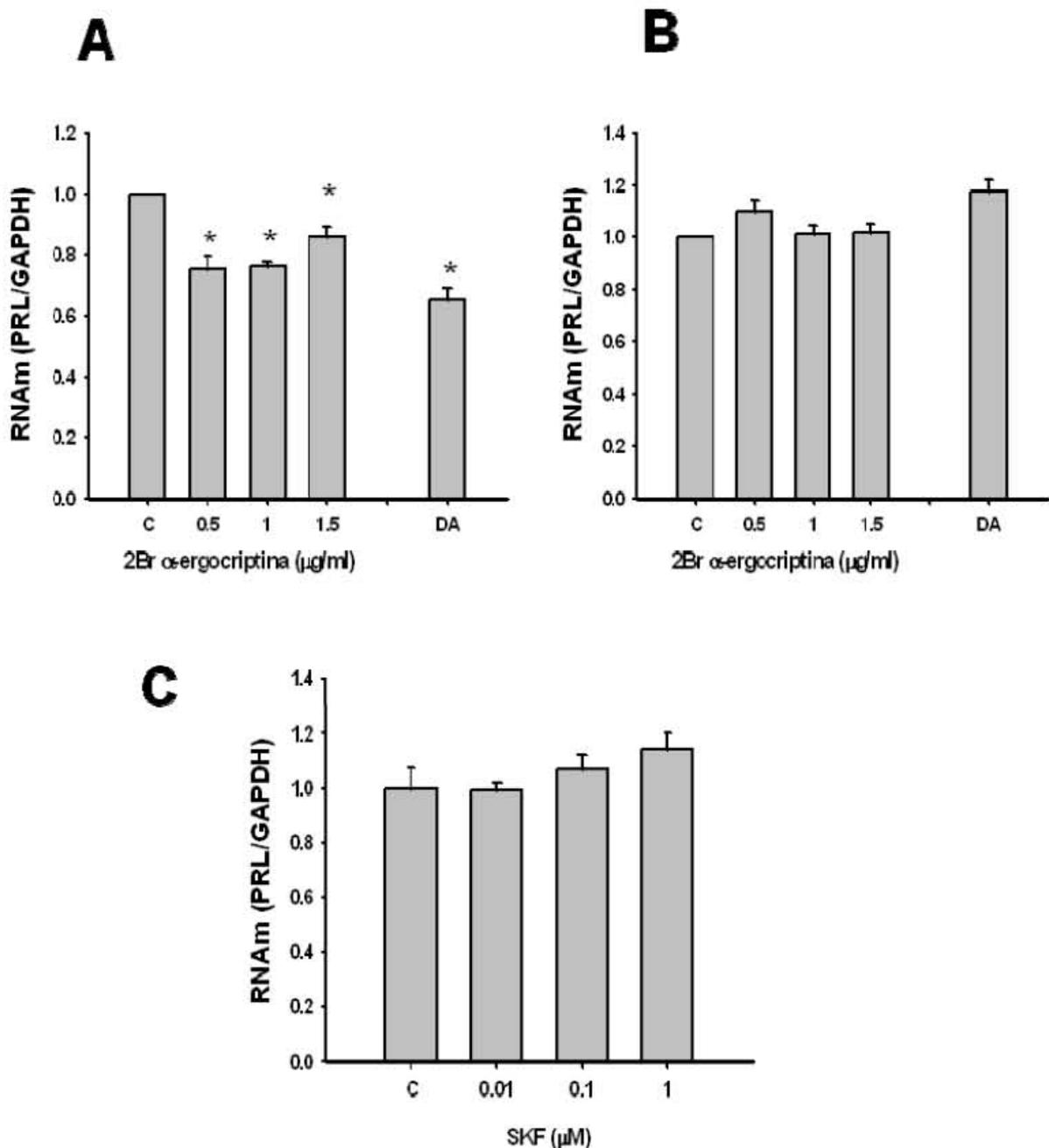


Figura 12. Efecto de los agonistas de los receptores D2 y D1 de la dopamina en la expresión del RNAm de la prolactina (PRL) en las células mononucleares en cultivo obtenidas de mujeres sanas. Efecto inhibitorio (panel A, n = 3), sin efecto (panel B, n = 5) del agonista de los receptores D2, la 2-Br- α -ergocriptina. Efecto del agonista del receptor D1/D5, el SKF, en la expresión del RNAm de la PRL en las células mononucleares en cultivo (panel C, n = 5). DA = 10^{-9} M de dopamina; C = control (sin tratamiento). Al control se le asignó el valor de 1. Los resultados se muestran como la media \pm EE. *P < 0.05 vs C.

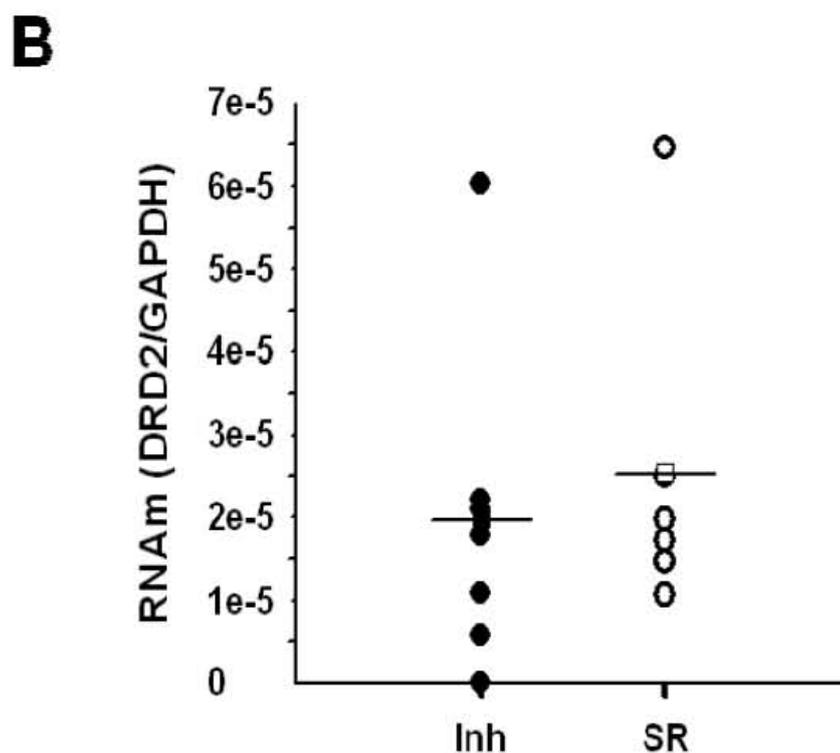
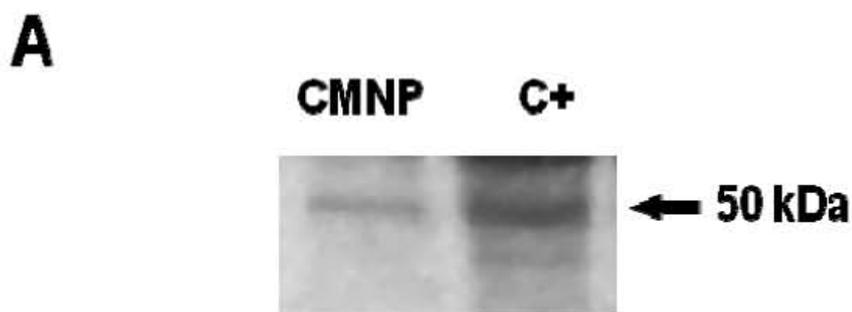


Figura 13. Expresión basal de los receptores D2 de dopamina (DRD2) en las células mononucleares en cultivo obtenidas de mujeres sanas. DRD2 determinado por Western blot y qPCR (panel A y panel B, respectivamente). Experimentos realizados en las células mononucleares en donde la dopamina inhibió (Inh) o no tuvo efecto (SR) en la expresión del RNAm de la PRL. C+ = control positivo (extracto de cerebro de ratón).

esperado. Por lo que se decidió investigar si la dopamina modifica la expresión génica de los DRD2 en las células mononucleares en cultivo.

La expresión basal del RNAm de los DRD2 se determinó por qPCR entre las poblaciones en la que la respuesta era inhibitoria o carente de respuesta. Los resultados fueron normalizados contra el gen constitutivo de GAPDH. En la figura 13B se muestra gran variabilidad en la expresión del RNAm de los DRD2 de dopamina de manera basal en las células mononucleares en cultivo. Además, no se observó diferencia en la expresión del RNAm de DRD2 entre las poblaciones de células mononucleares en donde la dopamina inhibió o fue carente de respuesta con respecto a la expresión del RNAm de la PRL.

Expresión del RNAm de los DRD2 en presencia de dopamina y de 2-Br- α -ergocriptina en las células mononucleares de sangre periférica.

Con el objeto de evaluar si el tratamiento con dopamina o con 2-Br- α -ergocriptina modifica la expresión del RNAm de los DRD2 en las células mononucleares, estas células se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de estos dos compuestos, como se ha reportado en la hipófisis [47]. Los resultados fueron normalizados contra el gen constitutivo de GAPDH. Los datos obtenidos en este estudio mostraron que la dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina aumentaron la expresión del RNAm de los DRD2 en aquellos cultivos donde los compuestos inhibieron la expresión del RNAm de la prolactina (Fig. 14A); mientras que no se modificó la expresión del RNAm de los DRD2 cuando la dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina no tuvieron efecto en la expresión del RNAm de la prolactina (Fig. 14B).

Efecto de la activación de las células mononucleares de sangre periférica con PMA/ionomicina en la expresión del RNAm de la prolactina y el contenido de AMPc intracelular.

Los resultados del presente estudio mostraron que la dopamina ejerce un efecto dual sobre la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares en cultivo. Este efecto posiblemente se deba a que las células obtenidas hubieran estado activadas previamente debido a una enfermedad subclínica no manifestada. Con el objeto de determinar si la activación de las células mononucleares modificaba la expresión del RNAm de la prolactina, estas células se activaron con PMA más ionomicina, dos

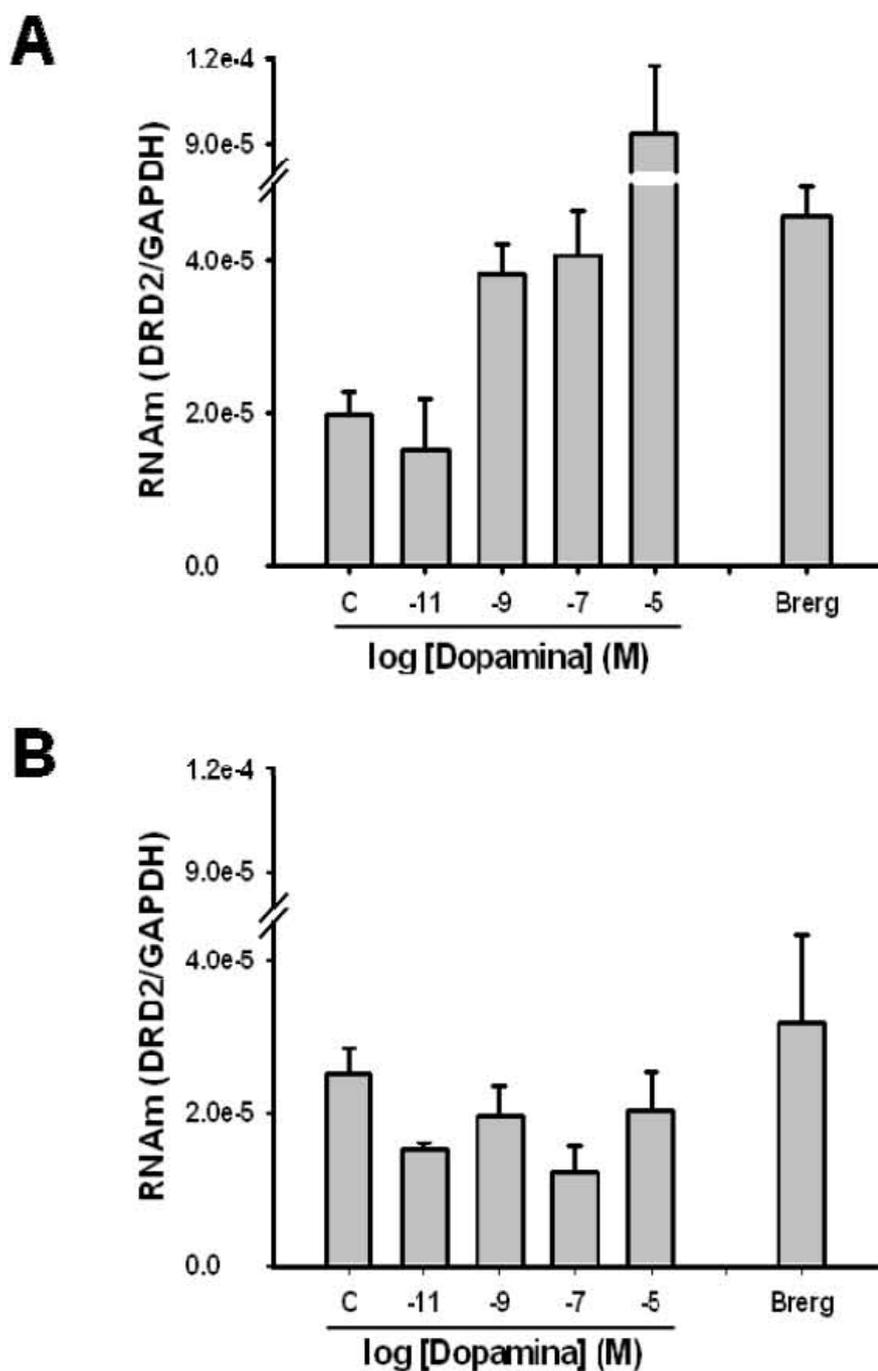


Figura 14. Efecto de la dopamina en la expresión de sus DRD2 en las células mononucleares en cultivo obtenidas de mujeres sanas, cuando este neurotransmisor inhibió o cuando no tuvo efecto la expresión del RNA_m de la PRL (panel A y panel B, respectivamente). C = control (sin tratamiento), Breg = 1.5 μ g/ml de 2-Br- α -ergocriptina. Los resultados se muestran como la media \pm EE de 5 experimentos diferentes.

compuestos ampliamente utilizados para la activación de los linfocitos T a través de la activación de la PKC y la movilización de calcio intracelular, respectivamente. Los valores obtenidos de la expresión del RNAm de la prolactina en células activadas se normalizaron contra los valores obtenidos de la expresión del RNAm del gen constitutivo de L-32, que no modificó su expresión en presencia de estos activadores. De manera interesante, se observó que la simple activación de estas células con PMA/ionomicina, inhibió tanto la expresión del RNAm de la prolactina como el contenido intracelular de AMPc (Fig. 15).

Efecto de la dopamina y de la 2-Br- α -ergocriptina en la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares de sangre periférica activadas con PMA/ionomicina *in vitro*.

Con el objeto de evaluar el efecto de la dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina en la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares activadas *in vitro* con PMA/ionomicina, se incubaron las células mononucleares con diferentes concentraciones de estos dos compuestos. Los resultados obtenidos mostraron que tanto la dopamina como la 2-Br- α -ergocriptina tendieron a inhibir la expresión del RNAm de la prolactina, sin embargo, no fue estadísticamente significativo (Fig. 16A y 16B, respectivamente).

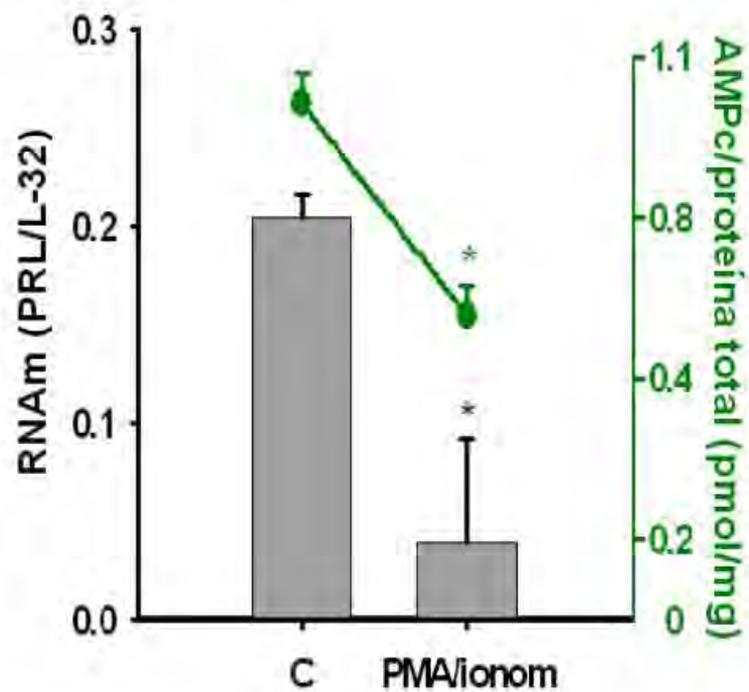


Figura 15. Efecto de la activación de las células mononucleares con PMA/ionomicina en la expresión del RNAm de la prolactina (PRL, barras) y el contenido intracelular de AMPc (líneas). C = control (sin activar). Los resultados están representados como la media \pm EE de 3 experimentos diferentes, *P < 0.05 vs C.

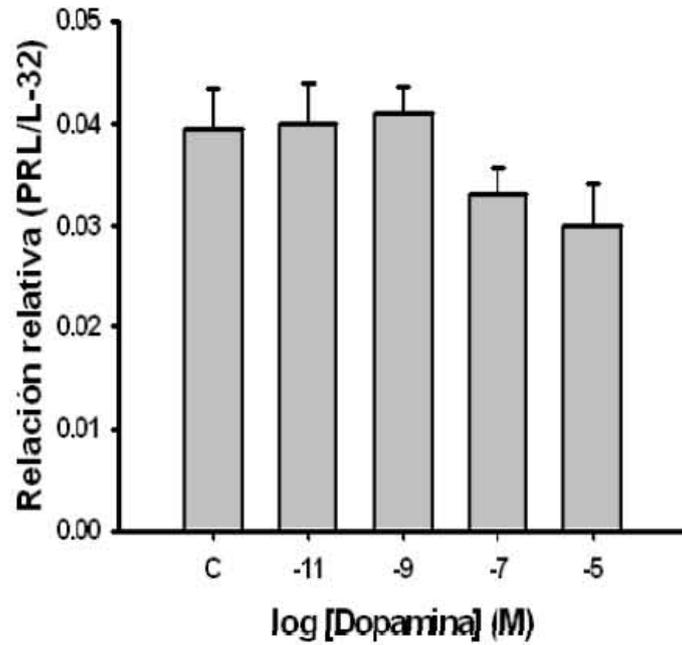
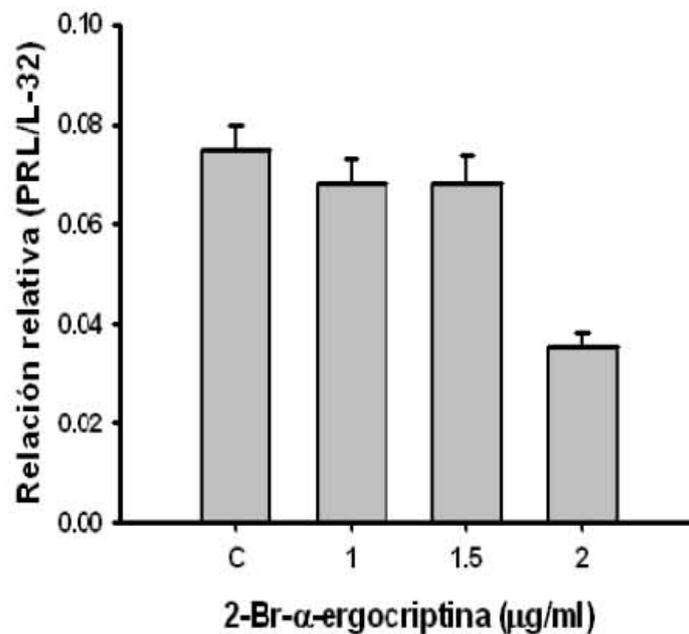
A**B**

Figura 16. Efecto de la dopamina y de la 2-Br- α -ergocriptina en la expresión del RNAm de la PRL en las células mononucleares activadas *in vitro* con PMA/ionomicina. Dopamina (panel A), 2-Br- α -ergocriptina (panel B). C = control (sin tratamiento). Los resultados están representados como la media \pm EE de 3 experimentos diferentes.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren que la dopamina, principal regulador de la prolactina hipofisaria, también regula la expresión del gen de la prolactina de origen linfocitario a través de la unión a sus receptores de tipo D2 (DRD2). Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio confirman las observaciones previas de varios autores [6, 40] en donde análogos del AMPc inducen la expresión del RNAm de la prolactina. En este trabajo se hipotetizó que, ligandos naturales que se unan a receptores acoplados a proteínas G y que modifiquen el contenido intracelular de AMPc, eran candidatos para regular a la prolactina de origen linfocitario. En este aspecto, utilizando como modelo la línea celular jurkat de origen linfocitario, se ha reportado que la prostaglandina E2 se une a sus receptores acoplados a proteínas G y aumenta tanto las concentraciones de AMPc como la expresión del gen de la PRL [40]. Asimismo, los receptores de dopamina se encuentran acoplados a proteínas G, los receptores de tipo D1 (DRD1/DRD5) están acoplados a proteínas G estimuladoras, mientras que los DRD2 están acoplados a proteínas G inhibitorias, por lo que este neurotransmisor posiblemente regula la síntesis y/o secreción de la prolactina de origen linfocitario. La dopamina inhibe la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias como son la IL-2, el IFN- γ y la IL-4, actuando como supresor de estas citocinas [33, 34], inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las células mononucleares [36, 46]. Por su parte, la prolactina estimula la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-2, la IL-1, la IL-6 y el INF γ , además de aumentar el efecto de la IL-2 y la expresión de sus receptores en los linfocitos [18, 27]. También actúa como un factor de supervivencia al estimular la proliferación en los linfocitos T [24] e inhibir la apoptosis en los linfocitos T y en los linfocitos B [23], por lo que, la dopamina actúa en sentido contrario a la prolactina en las células del sistema inmunológico. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que las células mononucleares obtenidas de sujetos sanos 90 minutos posteriores a la administración *in vivo* de metoclopramida, un antagonista de los DRD2 de dopamina, sintetizan y secretan más prolactina comparadas con las células mononucleares en condiciones basales [44]. Sin embargo, no se sabía si el antagonista dopaminérgico bloqueaba a los DRD2 directamente en estas células o se debía a las elevadas concentraciones de prolactina, derivada de la hipófisis, que estuvieran regulando de manera autocrina y/o paracrina la síntesis y secreción de la prolactina linfocitaria. De manera interesante, estudios clínicos realizados en pacientes con lupus eritematoso generalizado, han sugerido que la administración de bromocriptina, un agonista de los DRD2, puede tener efectos benéficos en la actividad de la enfermedad, sin que todavía se conozca si tiene efectos directos sobre los linfocitos de estos pacientes [30, 43]. Los resultados obtenidos en el

presente trabajo indican que en el 50% de los experimentos realizados, la dopamina inhibe tanto la expresión del RNAm como la secreción de la prolactina en las células mononucleares en cultivo. Tanto el efecto inhibitorio de la dopamina en el contenido intracelular del AMPc como el efecto inhibitorio de la 2-Br- α -ergocriptina en la expresión del RNAm de la prolactina, sugieren que la dopamina se une a sus DRD2 y que, a través de la vía del AMPc, inhibe la expresión del RNAm de la prolactina. No obstante, en el otro 50% de los experimentos realizados, la dopamina no tuvo efecto en la expresión génica ni en la secreción de la prolactina linfocitaria. Además, los efectos de la dopamina sobre la expresión génica de la prolactina son similares entre las células mononucleares obtenidas de hombres que las células obtenidas de mujeres, por lo que no existe diferencia entre sexo. Se ha reportado que los DRD1 y DRD2 de dopamina se encuentran presentes en las células del sistema inmunológico, como los linfocitos [32, 48]. En este estudio, se demostró por RT-qPCR y se confirmó por Western Blot que las células mononucleares expresan a los DRD2 de dopamina de manera basal en estas células. De manera interesante, la expresión del RNAm de este tipo de receptores aumentó cuando la dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina inhibieron la expresión del RNAm de la prolactina y no se modificó cuando ambos compuestos no tuvieron efecto en la expresión génica de la prolactina. El efecto dual de la dopamina sobre la expresión génica de la prolactina y la presencia diferencial de sus receptores en respuesta a este neurotransmisor, sugieren que otros mecanismos y/o vías de señalización pudieran estar implicados en la regulación génica de la prolactina de origen linfocitario. A este respecto, se ha reportado la participación de los receptores D1/D5 de dopamina en la proliferación y apoptosis en las células del sistema inmunológico [36, 37, 49]. Por lo que pudieran estar implicados en la regulación de la síntesis de la prolactina de origen linfocitario. Sin embargo, en el presente estudio no se encontró evidencia de que los receptores D1/D5 participen en la regulación del gen de la prolactina linfocitaria, ya que el agonista de este tipo de receptores, el (R)-(+)-SKF-38393, no modificó la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares en cultivo. Por otra parte, existe controversia entre los efectos de la dopamina en el sistema inmunológico y la mayoría de estos estudios se han realizado en células activadas [33]. A este respecto, se realizaron cultivos con células mononucleares activadas con PMA/ionomicina y explicar, en parte, que sólo el 50% de la población respondiera al efecto inhibitorio de la dopamina. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina tendieron a inhibir la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares activadas *in vitro*, aunque no fue estadísticamente significativo. Además, no se observó diferencia en el contenido intracelular de AMPc, ya que la simple activación con PMA/ionomicina de las células mononucleares inhibe el contenido

intracelular de este segundo mensajero. A este respecto, se ha reportado que la activación de las células mononucleares con TPA, un éster de forbol, aumenta la secreción de catecolaminas incluyendo a la dopamina [49], por lo que, al activar a las células mononucleares con PMA/ionomicina pudieran encontrarse elevadas las concentraciones de dopamina en estas células, que a su vez esté inhibiendo la expresión génica de la prolactina linfocitaria. Una observación importante fue que en células activadas la dopamina y la 2-Br- α -ergocriptina inhibieron la expresión del RNAm de la prolactina. Posiblemente existen otros mecanismos de regulación, independientes de la activación celular, que estén contribuyendo a este nivel. Se ha reportado que activadores directos de la proteína cinasa C (PKC) inhiben la expresión génica de la prolactina en las células mononucleares mantenidas en cultivo [6]. Esto nos indicaría la posible intercomunicación entre la vía del AMPc y la vía de la PKC en la regulación génica de la prolactina linfocitaria. Por otra parte, estudios previos han reportado que el estrés promueve cambios en las densidades de los receptores de dopamina en el cerebro, dependiendo del tipo de receptor y del área del cerebro en donde se encuentren [47, 50]. Del mismo modo, la administración de un antagonista de los receptores D2 de dopamina en condiciones de estrés cambia el perfil de citocinas y la densidad de proteínas G en las células mononucleares del bazo en un modelo de ratones [50]. Se requerirá de estudios posteriores para conocer si existe diferencia entre las densidades de las proteínas G en respuesta a la dopamina, y si esto correlaciona con la respuesta diferencial de este neurotransmisor en la expresión del RNAm de la prolactina en las células mononucleares en cultivo. Los resultados obtenidos indican que la dopamina regula la expresión del gen de la prolactina de origen linfocitario, ejerciendo efectos directos a este nivel. El efecto inhibitor del agonista selectivo de los receptores D2 de dopamina, la 2-B- α -ergocriptina, en la expresión génica de la prolactina y el aumento en la expresión de los receptores D2 de dopamina, indican que la dopamina lleva a cabo sus efectos inhibitorios a través de la unión a este tipo de receptores. Los resultados del presente trabajo pueden contribuir para el mejor entendimiento en la regulación de la prolactina de origen linfocitario y su papel en el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado. Este acercamiento básico contribuye al conocimiento de los efectos de la dopamina en el sistema inmunológico, incluyendo el mecanismo de acción implicado en la regulación de la prolactina de origen linfocitario, lo que aporta conocimiento para la elaboración de nuevos abordajes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades del sistema inmune en los que esta hormona-citocina pudiera estar implicada, como son las enfermedades autoinmunes.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que la dopamina tiene un efecto dual en la síntesis y secreción de la prolactina de origen linfocitario.

El efecto inhibitorio de la dopamina en la expresión génica de la prolactina en las células mononucleares es a través de mecanismos dependientes del receptor de tipo D2 de dopamina y la consecuente disminución de las concentraciones intracelulares de AMPc.

La activación de las células mononucleares con PMA/ionomicina inhibe la expresión del RNAm de la prolactina y atenúa el efecto inhibitorio de la dopamina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ben-Jonathan, N., C.R. LaPensee, and E.W. LaPensee, *What can we learn from rodents about prolactin in humans?* *Endocr Rev*, 2008. **29**(1): p. 1-41.
2. Freeman, M.E., et al., *Prolactin: structure, function, and regulation of secretion*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(4): p. 1523-631.
3. Bole-Feysot, C., et al., *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice*. *Endocr Rev*, 1998. **19**(3): p. 225-68.
4. Clevenger, C.V. and J.B. Kline, *Prolactin receptor signal transduction*. *Lupus*, 2001. **10**(10): p. 706-18.
5. Ben-Jonathan, N. and R. Hnasko, *Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(6): p. 724-63.
6. Gerlo, S., et al., *Regulation of prolactin expression in leukemic cell lines and peripheral blood mononuclear cells*. *J Neuroimmunol*, 2003. **135**(1-2): p. 107-16.
7. Berwaer, M., J.A. Martial, and J.R. Davis, *Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(5): p. 635-42.
8. Mendez, I., C. Carino, and L. Diaz, [*Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects*]. *Rev Invest Clin*, 2005. **57**(3): p. 447-56.
9. Lew, A.M., H. Yao, and H.P. Elsholtz, *G(i) alpha 2- and G(o) alpha-mediated signaling in the Pit-1-dependent inhibition of the prolactin gene promoter. Control of transcription by dopamine D2 receptors*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(16): p. 12007-13.
10. Zanger, K., et al., *A novel mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of gene expression by CREB-binding protein*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(2): p. 268-75.
11. Gellersen, B., et al., *Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(3): p. 356-73.
12. Brar, A.K., C.A. Kessler, and S. Handwerger, *An Ets motif in the proximal decidual prolactin promoter is essential for basal gene expression*. *J Mol Endocrinol*, 2002. **29**(1): p. 99-112.
13. Jiang, J.L., et al., *Immunoregulatory role of endogenous catecholamines synthesized by immune cells*. *Sheng Li Xue Bao*, 2006. **58**(4): p. 309-17.
14. Basu, S. and P.S. Dasgupta, *Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system*. *J Neuroimmunol*, 2000. **102**(2): p. 113-24.
15. Missale, C., et al., *Dopamine receptors: from structure to function*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(1): p. 189-225.
16. Liu, J.C., et al., *Activation of Go-coupled dopamine D2 receptors inhibits ERK1/ERK2 in pituitary cells. A key step in the transcriptional suppression of the prolactin gene*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(39): p. 35819-25.
17. Ben-Jonathan, N., et al., *Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects*. *Endocr Rev*, 1996. **17**(6): p. 639-69.
18. Matera, L., et al., *Role of prolactin in the in vitro development of interleukin-2-driven anti-tumoural lymphokine-activated killer cells*. *Immunology*, 1996. **89**(4): p. 619-26.
19. Pellegrini, I., et al., *Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**(7): p. 1023-31.
20. Bouchard, B., et al., *Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 576-82.
21. Goffin, V., et al., *Prolactin: the new biology of an old hormone*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 47-67.

22. Yu-Lee, L.Y., *Prolactin modulation of immune and inflammatory responses*. Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 435-55.
23. Buckley, A.R., *Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor*. Lupus, 2001. **10**(10): p. 684-90.
24. Dorshkind, K. and N.D. Horseman, *The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency*. Endocr Rev, 2000. **21**(3): p. 292-312.
25. Kochendoerfer, S.K., et al., *Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells*. J Endocrinol, 2003. **178**(2): p. 265-73.
26. Krishnan, N., et al., *Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo*. Endocrinology, 2003. **144**(5): p. 2102-10.
27. Vera-Lastra, O., L.J. Jara, and L.R. Espinoza, *Prolactin and autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2002. **1**(6): p. 360-4.
28. Orbach, H. and Y. Shoenfeld, *Hyperprolactinemia and autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2007. **6**(8): p. 537-42.
29. Gomez, D., et al., *Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective?* Semin Arthritis Rheum, 2004. **33**(6): p. 404-13.
30. Walker, S.E., *Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2001. **10**(10): p. 762-8.
31. Peeva, E., et al., *Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(5): p. 310-9.
32. McKenna, F., et al., *Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study*. J Neuroimmunol, 2002. **132**(1-2): p. 34-40.
33. Ghosh, M.C., et al., *Dopamine inhibits cytokine release and expression of tyrosine kinases, Lck and Fyn in activated T cells*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(7): p. 1019-26.
34. Torres, K.C., et al., *Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC*. J Neuroimmunol, 2005. **166**(1-2): p. 144-57.
35. Besser, M.J., Y. Ganor, and M. Levite, *Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both*. J Neuroimmunol, 2005. **169**(1-2): p. 161-71.
36. Carr, L., A. Tucker, and R. Fernandez-Botran, *In vivo administration of L-dopa or dopamine decreases the number of splenic IFN gamma-producing cells*. J Neuroimmunol, 2003. **137**(1-2): p. 87-93.
37. Cosentino, M., et al., *Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(10): p. 1233-40.
38. Santambrogio, L., et al., *Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes*. J Neuroimmunol, 1993. **45**(1-2): p. 113-9.
39. Reem, G.H., D.W. Ray, and J.R. Davis, *The human prolactin gene upstream promoter is regulated in lymphoid cells by activators of T-cells and by cAMP*. J Mol Endocrinol, 1999. **22**(3): p. 285-92.
40. Gerlo, S., et al., *Mechanism of prostaglandin (PG)E2-induced prolactin expression in human T cells: cooperation of two PGE2 receptor subtypes, E-prostanoid (EP) 3 and EP4, via calcium- and cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated signaling pathways*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 5952-62.

41. Gerlo, S., P. Verdood, and R. Kooijman, *Tumor necrosis factor-alpha activates the extrapituitary PRL promoter in myeloid leukemic cells*. J Neuroimmunol, 2006. **172**(1-2): p. 206-10.
42. Gerlo, S., et al., *Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines*. J Neuroimmunol, 2005. **162**(1-2): p. 190-3.
43. Neidhart, M., *Bromocriptine has little direct effect on murine lymphocytes, the immunomodulatory effect being mediated by the suppression of prolactin secretion*. Biomed Pharmacother, 1997. **51**(3): p. 118-25.
44. Mendez, I., et al., *Neuroendocrine dopaminergic regulation of prolactin release in systemic lupus erythematosus: a possible role of lymphocyte-derived prolactin*. Lupus, 2004. **13**(1): p. 45-53.
45. Kirken, R.A., et al., *Mechanisms of cytokine signal transduction: IL-2, IL-4 and prolactin as hematopoietin receptor models*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **63**(1-2): p. 27-36.
46. Colombo, C., et al., *Dopaminergic modulation of apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells: possible relevance for Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 679-82.
47. Cabib, S., et al., *Stress promotes major changes in dopamine receptor densities within the mesoaccumbens and nigrostriatal systems*. Neuroscience, 1998. **84**(1): p. 193-200.
48. Amenta, F., et al., *Neurotransmitter receptor expression by peripheral mononuclear cells: possible marker of neuronal damage by exposure to radiations*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2002. **48**(4): p. 415-21.
49. Ferrari, M., et al., *Dopaminergic D1-like receptor-dependent inhibition of tyrosine hydroxylase mRNA expression and catecholamine production in human lymphocytes*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(5): p. 865-73.
50. Fiserova, A., et al., *Effects of D2-dopamine and alpha-adrenoceptor antagonists in stress induced changes on immune responsiveness of mice*. J Neuroimmunol, 2002. **130**(1-2): p. 55-65.