



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**“EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN Y FUNCIÓN  
DE LINFOCITOS B MADUROS”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

ANA MARLENE ESQUIVEL HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ADRIANA KARINA CHÁVEZ RUEDA

ASESOR INTERNO

DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO D. F. 8 DE MARZO DE 2011



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, del hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: CONACYT 49798

Y el Fondo de Investigación en Salud IMSS: FIS/PROT/G09/767

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Karina Chávez por compartir su tiempo y conocimiento conmigo y por todo el apoyo que me brindo para poder concluir este trabajo.

Al Dr. Edelmiro por todo el apoyo brindado.

A Yadira, Vicky, Luis y Eduardo por compartir sus conocimientos y toda la ayuda que me brindaron.

A toda mi familia por siempre estar a mi lado cuidándome y apoyándome.

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo primero que nada a mis padres ya que gracias a ellos pude concluir esta etapa, por que son los pilares de mi vida y por que siempre me brindaron su apoyo y confianza.

A mis hermanas Alma, Claudia, Yanine, Fernanda y a mi sobrino David por que estuvieron conmigo en todo momento mostrándome que siempre podía contar con ellas.

A Isaac por que es una persona muy importante en mi vida y por que siempre estuvo a mi lado cuidándome y dándome todo su apoyo.

<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
INDICE DE FIGURAS.....	i
ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
DIAGRAMA DE FLUJO.....	21
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	36
PERSPECTIVAS.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
Figura 1	Rearreglos de genes en los estadios de maduración del linfocito B	3
Figura 2	Subpoblaciones de linfocitos B inmaduros	4
Figura 3	Estadios de maduración del linfocito B.	5
Figura 4	Subpoblaciones de linfocitos B maduros	5
Figura 5	Estructura tridimensional de la prolactina (PRL)	8
Figura 6	Receptor de prolactina	9
Figura 7	Pureza de linfocitos B	22
Figura 8	Producción de anticuerpos (IgM e IgG)	23- 24
Figura 9	Producción de TNF- $\alpha$ en linfocitos B	25
Figura 10	Receptor de prolactina	26
Figura 11	Purificación de las subpoblaciones de linfocitos B	27
Figura 12	Expresión relativa del receptor de prolactina	28
Figura 13	Diferenciación de linfocitos B maduros de zona marginal.	31
Figura 13.1	Diferenciación de linfocitos B maduros foliculares.	32

## **ABREVIATURAS**

<b>ACTH</b>	Hormona del crecimiento
<b>AR</b>	Artritis reumatoides
<b>BCR</b>	Receptor de linfocito B
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>CD</b>	Molécula de diferenciación
<b>CBA</b>	Citometric Bead Array
<b>DNA</b>	Acido Desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>FACS</b>	Análisis de fluorescencia de células
<b>FO</b>	Linfocito B Folicular
<b>HT</b>	Tiroiditis de Hashimoto
<b>Ig's</b>	Inmunoglobulinas
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF <math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IRF-I</b>	Factor regulador del interferon-1
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>MZ</b>	Linfocito B de Zona Marginal

<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>PALS</b>	Bolsa linfoide periarterial
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PRL-R</b>	Receptor de Prolactina
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNA</b>	RNA mensajero
<b>SFB</b>	Suero Fetal de Bovino
<b>SS</b>	Síndrome de Sjögren
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>T1</b>	Linfocito B transitorio 1
<b>T2</b>	Linfocito B transitorio 2
<b>T3</b>	Linfocito B transitorio 3

## RESUMEN

La prolactina (PRL) es una hormona producida por distintas estirpes celulares, interviene en diferentes funciones fisiológicas, entre ellas, modulación del sistema inmune. Utilizando diferentes estímulos (medio de cultivo [AIMV], PRL [50 ng/mL], anticuerpo anti-IgM [20 µg/mL], PRL más anticuerpo anti-IgM, anticuerpo anti-CD40 [10 µg/mL] y anticuerpo anti-CD40 más PRL) se determinó la producción de anticuerpos en linfocitos B maduros encontrando que al incubar con PRL y anti-IgM se produjeron anticuerpos del isotipo IgM ( $0.6 \pm 0.3$ ). En cambio, cuando las células B se incubaron con anti-CD40 más PRL se observó un incremento en la producción de anticuerpos de los isotipos IgM ( $1.8 \pm 0.3$ ) e IgG ( $1.2 \pm 0.1$ ), de igual forma se determinó la producción de citocinas encontrando solo un incremento significativo en TNF- $\gamma$  al estimular a los linfocitos B maduros con anti-IgM ( $205.6 \pm 29$  pg/mL) y co-estimulados con PRL ( $211.5 \pm 28.8$  pg/mL). La literatura muestra que los linfocitos B expresan el receptor de PRL. Utilizando PCR-tiempo real nosotros confirmamos que las distintas subpoblaciones de linfocitos B maduros (Foliculares, Zona Marginal) expresan el RNAm del receptor de PRL. Los linfocitos B de Zona Marginal presentan mayor expresión del mRNA del receptor de PRL ( $6.9 \pm 0.58$ ) que los linfocitos B Foliculares ( $3.74 \pm 0.22$ ). El efecto de la PRL sobre la diferenciación de las diferentes poblaciones de linfocitos B maduros se determinó por citometría de flujo encontrando que los linfocitos B Foliculares no presentaron ningún incremento significativo. Sin embargo, la PRL co-incubada con anti IgM incrementa el porcentaje de linfocitos B de Zona Marginal a las 24 h ( $12.4 \pm 0.8$ ). Este estudio es importante ya que en modelos murinos y en ensayos clínicos, se ha relacionado a la PRL con la patogénesis de las enfermedades autoinmunes en cuanto a la función y diferenciación de linfocitos B y T ocasionado una producción exacerbada de auto-anticuerpos.

## **INTRODUCCION**

### **Maduración del linfocito B**

El proceso de maduración del linfocito B inicia en médula ósea donde las células precursoras pasan por diferentes etapas de diferenciación, las cuales se caracterizan por presentar un patrón específico de expresión de genes de inmunoglobulinas (Ig's) y proteínas de superficie. El primer estadio es el de linfocito Pro-B en el cual se presenta la primera recombinación de genes de la cadena pesada, este estadio se divide en pro-B temprano donde se realizan rearrreglos del gen D-J y el pro-B tardío en el cual se realizan los rearrreglos del gen V-DJ dando paso a la síntesis de la cadena pesada  $\mu$  que se une a la cadena ligera subrogada (idéntica en todos los linfocitos). Posteriormente comienza el estadio de pre-B en el cual se da el reordenamiento de los genes de la cadena ligera; primero se rearregla la cadena  $\kappa$  en un cromosoma, si este arreglo no es exitoso o se reconocen antígenos propios se rearregla el segundo cromosoma. Si estos rearrreglos no son exitosos se rearregla la cadena ligera  $\lambda$  en el primer cromosoma y si esto no es exitoso se rearregla el segundo cromosoma. Una vez sintetizada la cadena ligera se une a la cadena pesada  $\mu$  para formar la molécula de IgM la cual se expresa en la superficie del linfocito B inmaduro (IgM<sup>+</sup>), en esta etapa es cuando el linfocito B sale de medula ósea y migra hacia bazo (Figura 1)(1,2).

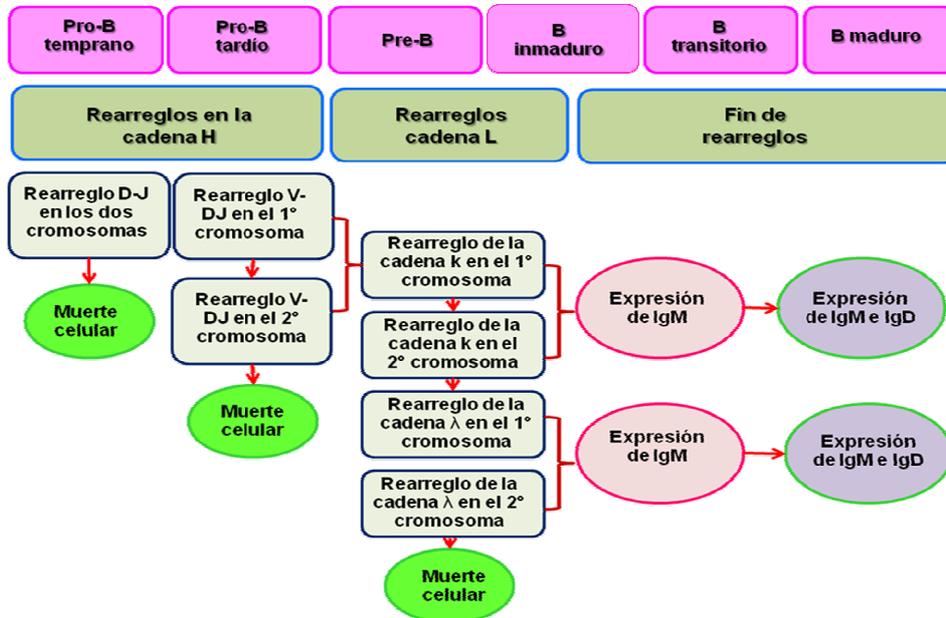
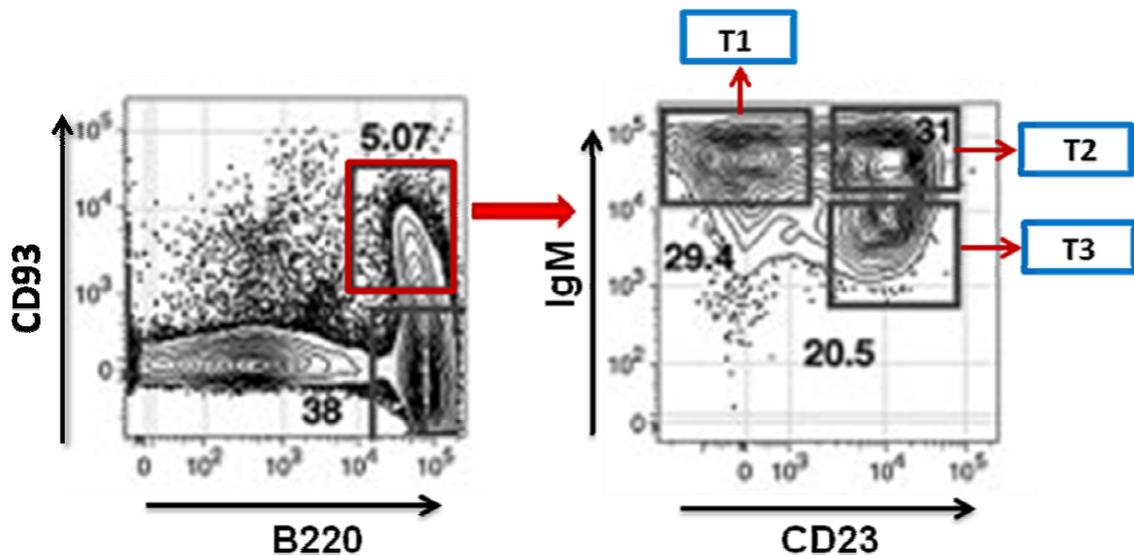


Figura 1. Rearreglos de genes en los estadios de maduración del linfocito B (1,2)

Para diferenciar a los linfocitos B inmaduros que se encuentran en médula ósea de los que viajan a bazo, se ha utilizado el término de linfocito B transitorio (T). Allman y Coleman sugieren que en bazo existen tres tipos de linfocitos B transitorios, los transitorios 1 (T1) que presentan el fenotipo  $CD93^+B220^+CD23^+IgM^{high}$ ; los transitorios 2 (T2)  $CD93^+B220^+CD23^+IgM^{high}$  y los transitorios 3 (T3)  $CD93^+B220^+CD23^+IgM^{low}$  (Figura 2) (3).

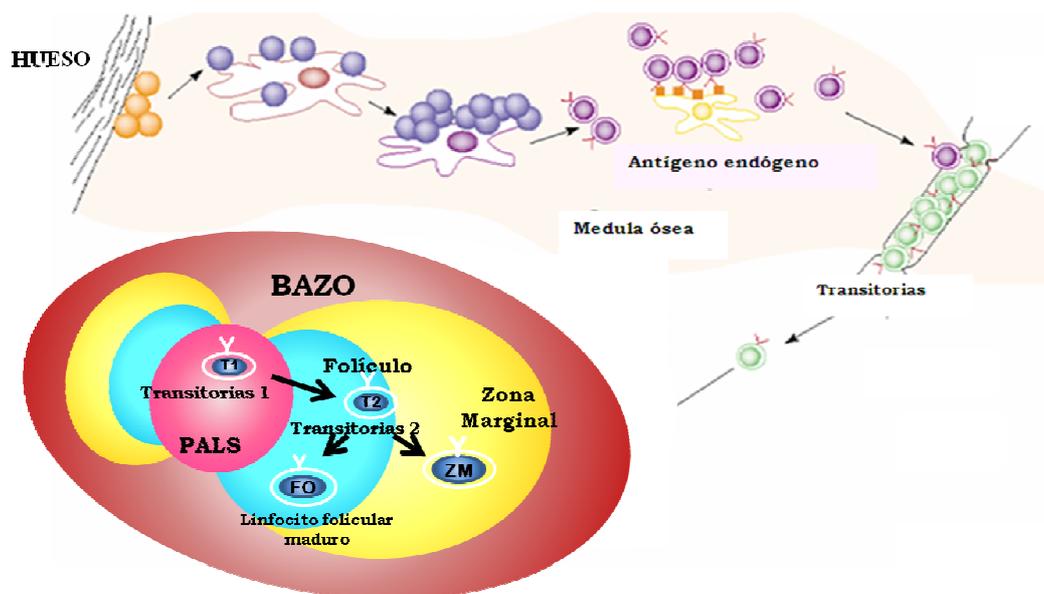


**Figura 2. Subpoblaciones de linfocitos B inmaduros.** Los linfocitos B transitorios fueron purificados por medio de citometría de flujo y fueron identificados de acuerdo al fenotipo que presentaban. Transitorios 1 (T1)  $B220^{+}CD93^{+}CD23^{-}IgM^{high}$ ; transitorios 2 (T2)  $B220^{+}CD93^{+}CD23^{+}IgM^{high}$ , transitorios 3 (T3)  $B220^{+}CD93^{+}CD23^{+}IgM^{low}$  (3).

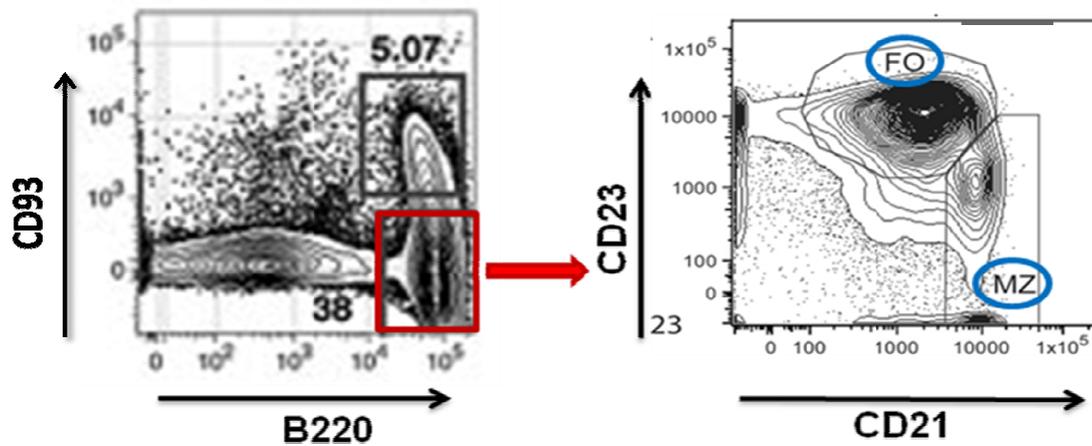
Los linfocitos B T1 migran de médula ósea a bazo en donde se sitúan principalmente en el exterior de la bolsa linfoide periarterial (PALS) y posteriormente se diferencian hacia los linfocitos B T2 y T3 que se sitúan en los folículos primarios (Figura 3) (4). En bazo los linfocitos B transitorios se diferencian a linfocitos B maduros que pueden ser, Foliculares (FO) con el siguiente fenotipo  $CD93^{-}CD21^{int}CD23^{high}CD24^{low}IgD^{high}IgM^{int}$  o de Zona Marginal (ZM) con el siguiente fenotipo  $CD93^{-}CD21^{high}CD23^{-}CD24^{high}IgM^{high}IgD^{low}$ . (Figura 4) (5).

Linfocitos B	CD19	CD93	B220	IgM	CD23	CD21
Transitorios 1	+	+	+	high	-	-
Transitorios 2	+	+	+	high	+	-
Transitorios 3	+	+	+	low	+	-
Foliculares	+	-	+	-	high	int
Zona Marginal	+	-	+	-	low	high

**Tabla 1.-** Fenotipos (moléculas presentes en la superficie celular, que se utiliza para la clasificación de células) de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B; transitorios 1, transitorios 2, transitorios 3, Foliculares y de Zona Marginal (5).



**Figura 3. Estadios de maduración del linfocito B.** Los linfocitos B T1 migran de médula ósea a bazo y se sitúan principalmente en el exterior de la bolsa linfoide periarterial y se diferencian a T2 y T3. Una vez en bazo se diferencian a linfocitos B maduros (FO o de ZM). (4).



**Figura 4. Subpoblaciones de linfocitos B maduros.** Los linfocitos B maduros B220<sup>+</sup> CD93<sup>-</sup> fueron identificados por citometría de flujo y las diferentes subpoblaciones de acuerdo al fenotipo que presentaban. Los linfocitos de Zona Marginal (ZM) presentan la expresión de CD21<sup>high</sup> CD23<sup>-</sup>, mientras que los linfocitos Foliculares (FO) expresan CD21<sup>int</sup> CD23<sup>high</sup> (6).

### Linfocitos B maduros

Durante el proceso de maduración del linfocito B, éste pasa por diversos puntos de selección con el fin de eliminar clones autorreactivos que puedan romper la tolerancia y contribuir al desarrollo de autoinmunidad.

Los linfocitos B maduros se distinguen de otros linfocitos por la síntesis y presentación en su membrana de moléculas de inmunoglobulina, que sirven como receptores de antígenos. La interacción del antígeno con el receptor del linfocito B (BCR) maduro, así como la interacción de éste con el linfocito T induce la activación y diferenciación del linfocito B. En este proceso, el linfocito B se divide en varias ocasiones y se diferencia en un periodo de 4 a 5 días, generando una población de células de memoria y otra de células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos (7,8).

En bazo se encuentran diferentes subpoblaciones de linfocitos B maduros, los B1 y los B2 (5). Los linfocitos B1 se localizan principalmente en la zona pleural y en el peritoneo, esta subpoblación a su vez se divide en linfocitos B1a y B1b. Los linfocitos B1a producen anticuerpos naturales que proporcionan protección innata contra las infecciones bacterianas,

mientras que los linfocitos B1b funcionan independientemente produciendo anticuerpos de vida larga que responden a polisacáridos y proporciona inmunidad adaptativa (7).

Los linfocitos B2 se dividen en linfocitos B Foliculares y los de Zona Marginal (5). Los linfocitos B Foliculares o “naive” al madurar adquieren la capacidad de recircular en bazo o en medula ósea y migran a través de la sangre y la linfa a las áreas de linfocitos B en bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer, en donde participan en la presentación de antígenos T-dependientes a las células T activadas y en la formación de los centros germinales, en los cuales se lleva a cabo la maduración de la afinidad, cambio de isotipo, generación de linfocitos B de memoria y células plasmáticas de vida larga. El cambio de isotipo se da cuando la molécula de CD40 expresada en forma constitutiva en el linfocito B (previamente activado a través de su BCR) interacciona con su ligando (CD40-L) expresado en los linfocitos T activados. La diferenciación de linfocito B a célula secretora de anticuerpos o célula plasmática es facilitada por la interacción de los receptores tipo Toll (TLR), pero sólo si existe la previa unión del BCR a su antígeno y el CD40 a su ligando (5).

Los linfocitos B de Zona Marginal son considerados como linfocitos de la respuesta innata, ya que pueden ser inducidos a diferenciarse en células plasmáticas de corta vida en ausencia de la activación por BCR. Los linfocitos B de Zona Marginal también pueden mediar el transporte a los folículos de bazo de los antígenos por medio de complejos inmunes por lo que pueden estar implicados en la respuesta a antígenos T dependiente y también participa en la respuesta a antígenos lipídicos (5).

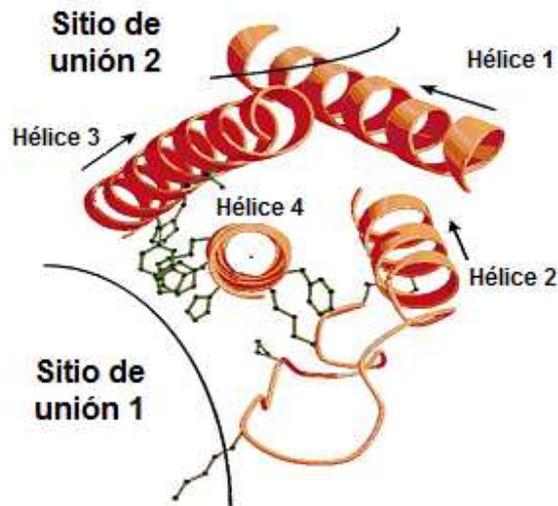
## **Prolactina**

La prolactina es una hormona polipeptídica que es sintetizada y secretada por células especializadas de la glándula hipofisiaria anterior. Su liberación es estimulada por serotonina, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo y es inhibida por dopamina y opiáceos (9). Actualmente se conocen más de 300 funciones de esta

hormona, las cuales se dividen dentro de cinco categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) crecimiento y desarrollo, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos e 5) inmunoregulación (10). La prolactina también es sintetizada y secretada por otras células como son los fibroblastos y células del epitelio mamario, linfocitos T y B, esplenocitos, entre otras (12).

En base a sus propiedades genéticas, estructurales y funcionales, la prolactina pertenece a la familia de la hormona del crecimiento y del lactógeno placentario, los cuales provienen de un gen ancestral común. El gen que codifica para prolactina se encuentra en el cromosoma 6, donde se encuentran otros genes que participan en la respuesta inmune, presenta un tamaño de 10 Kb y está conformado por cinco exones y cuatro intrones. La transcripción del gen de la prolactina es regulado por dos regiones promotoras independientes: el primer promotor situado en la región proximal dirige la expresión específica de la hipófisis, mientras que el otro promotor es responsable de la expresión extrahipofisiaria (9).

La prolactina es una proteína globular de una sola cadena de 199 aminoácidos (aa), formada por cuatro cadenas  $\alpha$ -hélice y dos sitios de unión para el receptor de prolactina. (Figura 5). Aunque la principal forma de prolactina reportada en hipófisis y suero tiene un peso molecular de 23 kDa se han descrito otras isoformas como la glicosilada (25 kDa), una pequeña de 16 kDa implicada en el proceso de angiogénesis, la macroprolactina que puede estar constituida por dímeros y/o polímeros de la misma hormona o por la unión con otras proteínas como los anticuerpos (150 kDa) (11).



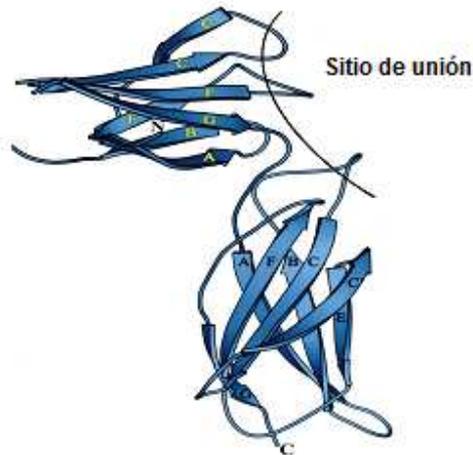
**Figura 5. Estructura tridimensional de la prolactina (PRL) (10).**

### **Receptor de prolactina**

El receptor de la prolactina (PRL-R) es una proteína transmembranal que pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas de tipo 1. En el humano su gen se encuentra localizado en el cromosoma 5 y por splicing genera tres isoformas del receptor: la isoforma corta, intermedia y larga (9). En el ratón, el gen del receptor de prolactina se localiza en el cromosoma 15 y se conocen cuatro isoformas una larga y tres cortas. Estas diferentes isoformas exhiben un dominio extracelular idéntico, con aproximadamente 200 aminoácidos (aa), el cual se divide en dos subdominios (cada uno de ~100 aa): el primero presenta dos puentes de disulfuro (Cys<sup>12</sup>-Cys<sup>22</sup>, Cys<sup>51</sup>-Cys<sup>62</sup>) y el segundo un motivo pentapéptido denominado WS (Trp-Ser-aa-Trp-Ser) (Figura 6) (9,10).

El dominio trans-membranal posee 24 aa, mientras el intracelular presenta diferentes tamaños y composición dependiendo de la isoforma del receptor. En esta porción existen dos regiones conservadas denominadas caja 1 y caja 2. La región próxima a la membrana

presenta una zona rica en prolina denominada caja 1, mientras que la caja 2 es una región menos conservada que se pierde en la isoforma corta (9, 10).



**Figura 6. Receptor de prolactina (10).**

El receptor de la prolactina se encuentra distribuido en diferentes células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos y linfocitos B y T. La unión de la prolactina a su receptor provoca su dimerización y activa la vía JAK2-STAT 1, 3 Y 5, MAPK (13).

### **Sistema inmune y prolactina**

La relación entre prolactina y el sistema inmune se evidenció en 1930 cuando Smith observó que el timo de las ratas sufría un proceso de atrofia después de realizarles una hipofisectomía (14). En 1983 Nagy y Berczi indujeron inmunodeficiencia en ratas tratadas con bromocriptina (agonista dopaminérgico e inhibidor de la secreción de PRL), la administración de PRL restableció la actividad inmunológica (15).

El sistema inmune es capaz de regular la secreción de prolactina (16), ya que citocinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  pueden actuar como reguladores endocrinos en la liberación de PRL hipofisiaria (17). Los timocitos y células mononucleares sintetizan prolactina de 23 kDa (18) o 60 kDa (19), estas proteínas tienen actividad biológica medida por bioensayos con células Nb2 (linfocitos de rata dependientes de prolactina). Los linfocitos T, B y células NK expresan receptor para prolactina (17). Otros resultados que apoyan la participación de la prolactina en la respuesta inmune es la inducción del factor de transcripción IRF-1 (factor regulador del interferon-1) en linfocitos T activados con prolactina. La prolactina aumenta la proliferación celular de esplenocitos, timocitos y células mononucleares al co-incubarse con concavalina A (17). También interviene en la expresión de las moléculas CD69 y CD154 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, ya que al activarlos con PMA e incubarlos con anticuerpos anti-PRL la expresión de estas moléculas disminuye (20). Así mismo, la expresión de CD69 y CD25 en linfocitos CD8<sup>+</sup> aumenta al co-incubarse con PRL y fitohemaglutinina (21). La PRL interviene en la secreción de citocinas. Los linfocitos T activados con PMA e incubados con anticuerpo anti-PRL presentan una disminución en la secreción de IL2 e IFN $\gamma$  (20). También se ha reportado que la prolactina incrementa la secreción de anticuerpos IgG e IgM en hibridomas (10) y aumenta la producción de autoanticuerpos (22).

Niveles altos de PRL se han asociado con enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren (SS), la tiroiditis de Hashimoto (HT) y la esclerosis múltiple (EM) (23). Probablemente debido a un incremento en la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el endocrino (24). Tanto la prolactina como los estrógenos son inmunomoduladores que afectan a la maduración, selección y secreción de anticuerpos. Su impacto puede basarse en la capacidad que tienen para permitir que los linfocitos B autorreactivos escapen de los mecanismos normales de tolerancia y un número suficiente se acumule para causar una enfermedad clínicamente evidente. Ambas hormonas pueden conducir a la supervivencia y la activación de los linfocitos B autorreactivos. La modulación diferencial del medio de

citocinas por las hormonas también puede afectar el desarrollo y la activación de determinadas subpoblaciones de linfocitos B maduros (25).

La prolactina interviene en el proceso de maduración de los linfocitos B en órganos linfoides periféricos. Ratones BALB/c tratados con PRL presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B maduros en bazo (Folicular y Zona Marginal) y una disminución en los linfocitos inmaduros (transitorios-1) (26). Por lo que nos parece interesante estudiar el efecto que puede tener la prolactina y su receptor *in vitro* en la maduración y función (producción de anticuerpo y citocinas) de los linfocitos B maduros.

## **JUSTIFICACIÓN**

Existe suficiente evidencia de la participación de la prolactina en el sistema inmune. La prolactina aumenta la proliferación de células mononucleadas activadas con mitógeno, interviene en la secreción de citocinas en los linfocitos T, en hibridomas favorece la secreción de anticuerpos, mientras que en linfocitos B *in vivo* incrementa el porcentaje de linfocitos B maduros. Por lo que resulta interesante estudiar si la prolactina *in vitro* puede participar en la función *in vitro* de los linfocitos B maduros a través de la producción de anticuerpos y secreción de citocinas y si favorece *in vitro* la maduración de los linfocitos B hacia Foliculares o de Zona Marginal.

## **HIPOTESIS**

El receptor de prolactina se encontrará presente en los linfocitos B maduros por lo que al incubarlos con prolactina incrementará la diferenciación y la función de los linfocitos B maduros (Foliculares y de Zona Marginal) *in vitro*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la prolactina *in vitro* sobre la función de los linfocitos B maduros y el efecto sobre la diferenciación hacia linfocitos B Foliculares o de Zona Marginal.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar el efecto de la prolactina *in vitro* sobre la función de los linfocitos B maduros a través de la medición de la producción de anticuerpos y citocinas en presencia o ausencia de la prolactina.
2. Determinar la presencia del receptor de prolactina en los linfocitos B maduros (Foliculares y de Zona Marginal).
3. Determinar la diferenciación de los linfocitos B maduros *in vitro* hacia Foliculares o de Zona Marginal en presencia o ausencia de prolactina

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Anticuerpos**

Para realizar la citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti B220-FITC (clona CD45R), anti CD93-PE (clona AA4.1), anti CD23-Biotinilado (clona B3B4), anti CD-21-APC (clona 7G6) de la marca eBioscience, el anticuerpo biotinilado fue detectado con streptavidina-Cy5 de la marca BD Bioscience. Para estimular a los linfocitos B se utilizaron los anticuerpos: anti-CD40 (clona FGK45) y anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> de la marca Jackson Immunoresearch.

### **Animales**

Se utilizaron ratones hembras de 9 semanas de la cepa C57BL/6 (Harlan) provenientes de Estados Unidos. Los cuales se alojaron en cajas de policarbonato de piso sólido con micro aislador. Se les dio alimento esterilizado que contenía no menos de: 18 % de proteína cruda, 6 % de grasa cruda y no más de 3 % de minerales. El agua fue potable y esterilizada por autoclave. La administración de agua y alimento fue a libre acceso.

Se les proporcionaron los cuidados y la atención veterinaria especificada en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### **Nivel de bioseguridad**

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

## **Hormona**

Se utilizó prolactina recombinante de ratón donada por el Dr. Parlow (National Hormone and Peptide Program, NIH, USA).

## **Obtención de células de bazo**

Para realizar la parte experimental primero se obtuvieron las células de bazo. Los animales se sacrificaron utilizando éter etílico (eutanasia). Se obtuvo el bazo, se colocó en una caja Petri y se inyectó solución salina, el bazo se pasó por un filtro en el cual se maceró con el émbolo de la jeringa, se lavó con solución salina (Pisa, México) y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y a las células se les agregó 3 mL del regulador de lisado (Sigma Chemical) durante 1 min 30 segundos, se centrifugaron a 1200 rpm 10 min, las células se resuspendieron en regulador para FACS (Anexo) y se contaron utilizando la cámara de Neubauer y azul tripano (Bio Whittaker) para determinar viabilidad.

## **Purificación de linfocitos B**

Los linfocitos B se purificaron por selección negativa. Células provenientes de bazo ( $10 \times 10^6$  cel) se incubaron con 10  $\mu$ L de anticuerpo anti-CD43 (1y-48) conjugado a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Germany) y 90  $\mu$ L de PBS-BSA 0.5 % EDTA 2mM a 4 °C por 15 min, se lavaron y se pasaron por una columna de separación MACS LD (Miltenyi Biotec, Germany), la pureza se verificó utilizando anticuerpo anti CD19-PE por inmunofluorescencia (citometría de flujo).

### **Purificación de linfocitos B maduros**

Los linfocitos B se incubaron con anticuerpo anti AA4-PE y por selección negativa se purificaron los linfocitos B maduros. Para la separación de las subpoblaciones de los linfocitos B maduros (Foliculares y de Zona Marginal), los linfocitos B se incubaron con anticuerpo anti AA4-PE, anti CD21-APC y anti CD23-Cy5 durante 20 min a 4 °C en oscuridad, se lavaron con PBS-BSA 0.5 %-EDTA 2mM y se purificaron por citometría de flujo utilizando el FACSAria (BD).

### **Determinación de anticuerpos en presencia o ausencia de Prolactina**

La determinación de anticuerpos IgG e IgM se realizó por el método de ELISA. La placa se sensibilizó con anticuerpo anti-IgG o anti-IgM de ratón fracción F(ab)<sub>2</sub> (Biosurce), se incubó a 4 °C toda la noche y se lavó 2 veces con PBS-Tween (Anexo), se bloqueó con 200 µL de PBS-BSA-Tween (Anexo), se incubó a 37 °C 1 h y se lavó 2 veces. Se adicionaron 100 µL del estándar (IgG o IgM de ratón [Zymed-Invitrogen]) a distintas concentraciones (125, 62.5, 32.25, 15.6, 7.8, y 0 ng/mL) y 100 µL de los sobrenadantes problemas diluidos 1:4000, la placa se incubó a 37 °C 1 hora y se lavó 6 veces. Se colocaron 100 µL del conjugado (Ig's de conejo anti-IgG o anti-IgM de ratón unido a fosfatasa alcalina [Zymed-Invitrogen]) se incubó a 37 °C 45 min y se lavó 5 veces con PBS-Tween (Anexo) y 2 veces con regulador de bicarbonatos (Anexo); finalmente se adicionaron 100 µL del sustrato para fosfatasa alcalina (Anexo) y se leyó a los 20 min a 405 nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000).

### **Determinación de la producción de citocinas en presencia o ausencia de Prolactina**

La concentración de citocinas se realizó utilizando "Citometric Bead Array kit" (CBA kit; BD Biosciences) para determinar las siguientes citocinas: IL-4, IL-5, IL-2, TNF, IFN-γ. Se

preparó una curva estándar (5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.12, 39, 19.5 ng/mL). A 16.5  $\mu$ L de la muestra se le agregó 16.5  $\mu$ L de la mezcla de perlas para las diferentes citocinas y 16.5  $\mu$ L de reactivo de detección ficoeritrina, se incubó 2 h a temperatura ambiente, se lavó con 1 mL de solución de lavado, se centrifugó 1500 rpm 5 min y se resuspendieron en 150  $\mu$ L de solución de lavado. Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo FACSCalibur.

### **Determinación de la presencia del receptor de prolactina en linfocitos B maduros (Foliculares y de Zona Marginal)**

Para determinar la presencia del receptor de prolactina se procedió a la extracción de RNA de linfocitos B. Los linfocitos B maduros y sus diferentes subpoblaciones se resuspendieron en reactivo de Trizol (Invitrogen), 1 mL por cada millón de células, se incubaron en hielo durante 5 min, se les adicionó 220  $\mu$ L de cloroformo grado biología molecular (Sigma Chemical), se homogeneizó en vórtex durante 1 min, se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min, después se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio, se agregó 500  $\mu$ L de isopropanol (JT Baker) se incubó a -20 °C durante 30 min y se centrifugó a 11000 rpm 15 min, el exceso de isopropanol se eliminó y al botón de RNA se le adicionó 1 mL de etanol (Sigma Chemical) al 75 %, se centrifugó a 10000 rpm/10 min, se eliminó todo el etanol hasta dejar el botón de RNA seco.

### **cDNA**

El RNA obtenido se convirtió en cDNA para determinar la expresión del receptor de PRL por PCR tiempo real. A 0.5  $\mu$ g de oligo dT (Invitrogen) se le adicionó el volumen de agua inyectable estéril para un volumen final de 12  $\mu$ L esta reacción se colocó en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) a 65 °C durante 10 min, se adicionó 7  $\mu$ L de una mezcla de reacción (4  $\mu$ L de regulador de la primera cadena 5X, 2  $\mu$ L de DDT 0.1 M y

1  $\mu\text{L}$  de dNTP a 10 mM) y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima Superscript (Invitrogen), se corrieron las muestras en el termociclador con el siguiente programa:

37°C	4 minutos
42°C	1 hora
80°C	10 minutos
4°C	1 hora

### PCR punto final

Para PCR punto final se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de cDNA de la concentración de 1  $\mu\text{g}$ , se agregaron 17.4  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (2  $\mu\text{L}$  de regulador 10X (Invitrogen), 0.5  $\mu\text{L}$  del iniciador del receptor de PRL de ratón sentido, 0.5  $\mu\text{L}$  de iniciador del receptor de PRL de ratón antisentido, 0.4  $\mu\text{L}$  dNTP 10mM y 13  $\mu\text{L}$  de agua inyectable estéril) y 0.6  $\mu\text{L}$  de la enzima TaqPolimerasa (Invitrogen), las muestras se colocaron en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

94°C	2 minutos		Repetir 34 veces
94°C	45 segundos		
59°C	1 minuto		
72°C	30 segundos		
72°C	7 minutos		
4°C	indefinido		

## PCR tiempo real

El PCR para todas las isoformas del receptor de prolactina se realizó empleando el kit LightCycler TaqMan Master (Roche) de acuerdo a las especificaciones del fabricante emplearon sondas de hidrólisis y primers diseñados por Roche, el volumen final de la reacción fue de 10  $\mu$ L. Como gen constitutivo se empleó  $\beta$ -actina. El análisis de los genes se realizó empleando la fórmula  $2^{\Delta\Delta CT}$ . Los primers que se utilizaron son los siguientes:

Receptor de PRL de ratón (5' a 3') GAGGAGGCTCTGGTTCAACA

Receptor de PRL de ratón (3' A 5') CAGTAAATGCCACGAACGAA

B-actina de ratón (5' a 3') GTGGTACGACCAGAGGCATAC

B-actina de ratón (3' A 5') AAGGCCAACCGTGAAAAG

Las muestras se corrieron en un termociclador LightCycler II (Roche), mediante el siguiente programa:

-Preincubación	95°C	10 minutos
-Amplificación:	}	Desnaturalización 95°C 10 segundos
		Alineamiento 59°C 20 segundos
		Extensión 72°C 1 segundo *Captura de fluorescencia

## Determinación de la diferenciación de los linfocitos B maduros, en presencia o ausencia de prolactina.

Se incubaron  $1 \times 10^6$  linfocitos B en una placa, bajo diferentes condiciones: medio de cultivo (AIMV), PRL (50 ng/ml), y como estímulos anticuerpo anti-IgM (20  $\mu$ g/mL), PRL más anticuerpo anti-IgM, anticuerpo anti-CD40 (10  $\mu$ g/mL) y anticuerpo anti-CD40 más PRL,

durante 24 horas, después de las cuales las muestras se tiñeron y leyeron por citometría de flujo con el FACSCalibur.

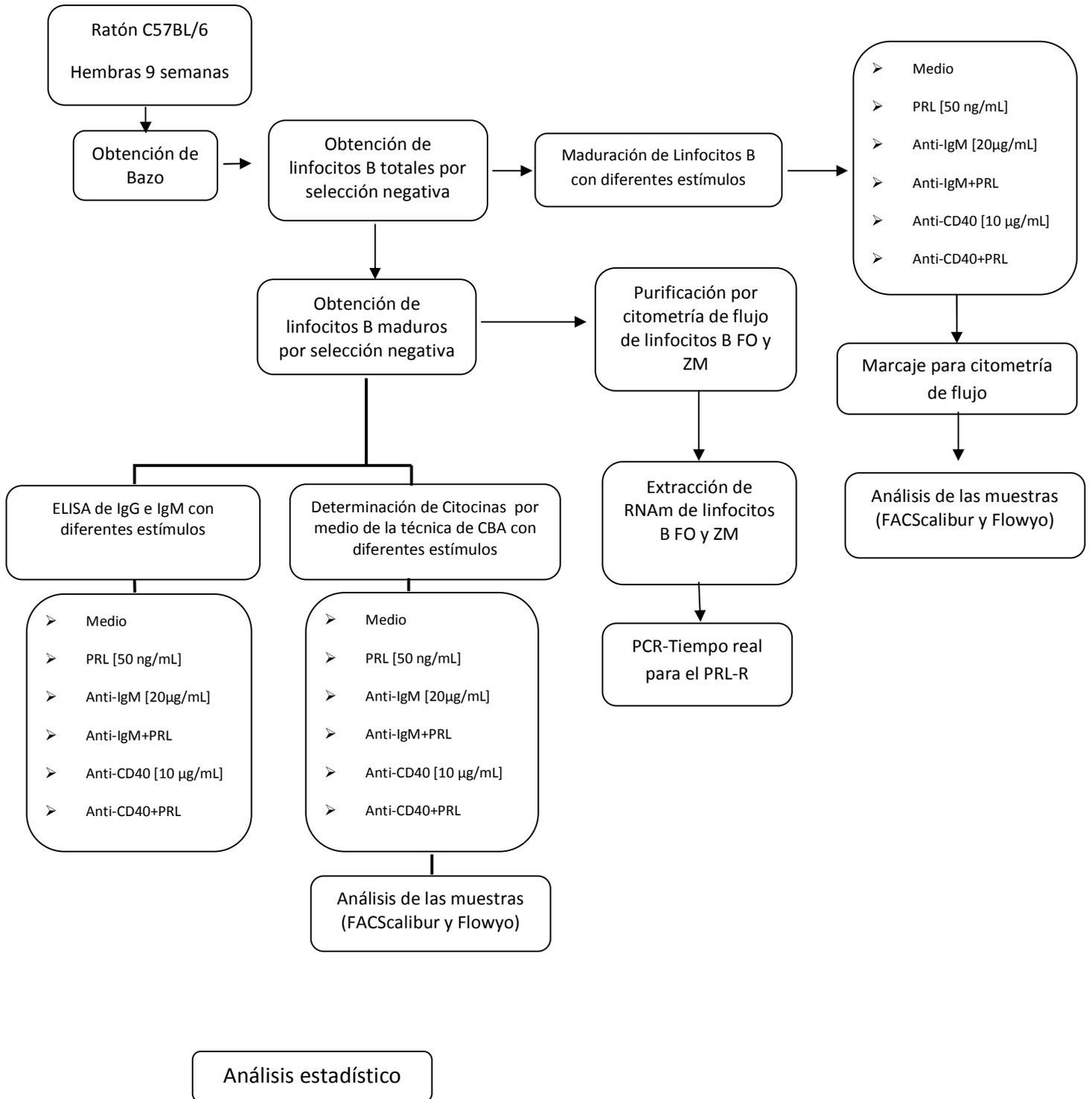
### **Marcaje para citometría de flujo**

Después de la incubación de los linfocitos B con diferentes condiciones, se tomaron 500,000 células, se lavaron con regulador de FACS (Anexo), se colocó 50 µL de anticuerpo anti: B220-FITC, CD93-PE, CD23-biotinilado, se incubaron a 4 °C 20 min en oscuridad, se lavaron con regulador de FACS (Anexo) y se centrifugó a 1500 rpm 5 min, se adicionó CD21-APC y streptavidina-Cy5 e incubó a 4 °C 20 min en oscuridad, se lavaron y fijaron las células con paraformaldeído al 2 % a 4 °C durante 5 min. Las células se resuspendieron en 300 µL de regulador FACS (Anexo), se leyeron con el FACSCalibur con el software de BD Biosciences. Los resultados se analizaron utilizando el programa Flowjo versión 7.5.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se describieron de acuerdo a la distribución de los datos (promedio y desviación estándar). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba normalidad Shapiro Wilk. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante la prueba de t pareada. Las diferencias entre grupo se determinaron utilizando la prueba ANOVA. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ , el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de computo SPSS 15.

## DIAGRAMA DE FLUJO

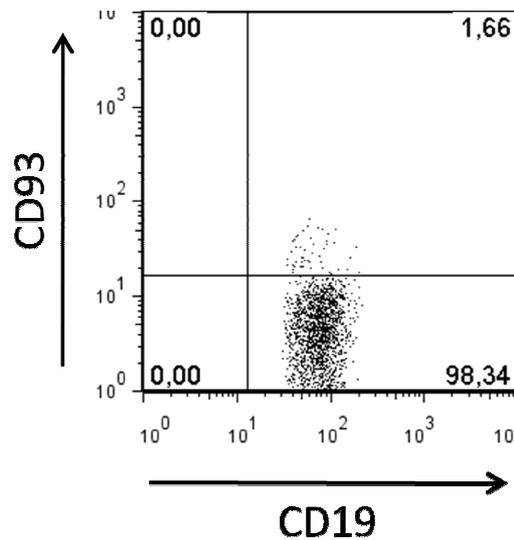


## RESULTADOS

### Evaluación de la función de los linfocitos B maduros

#### Purificación de linfocitos B maduros

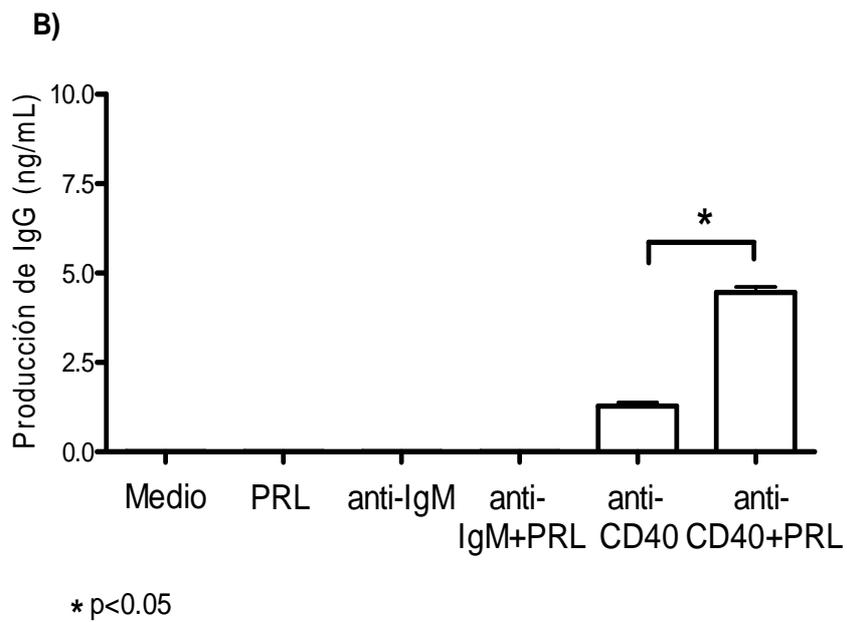
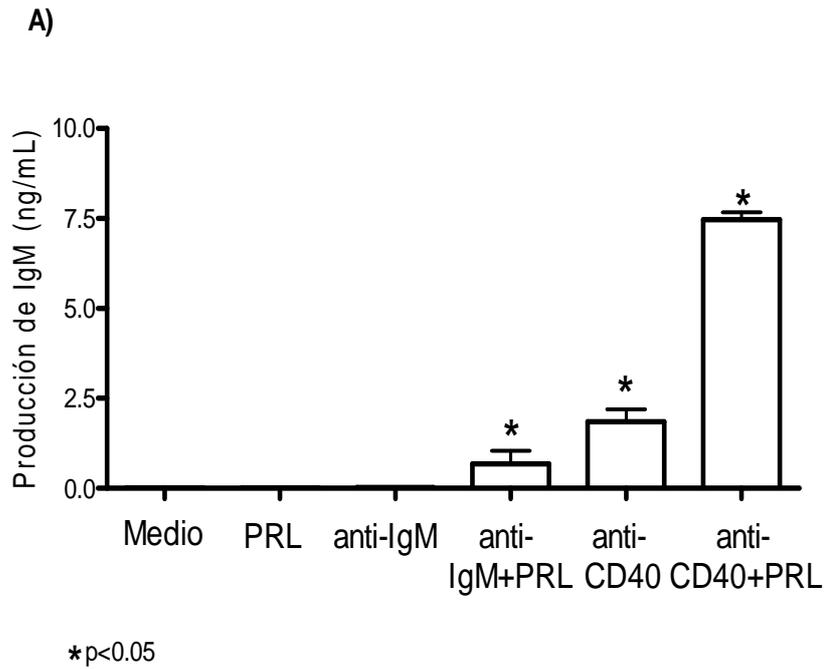
Mediante selección negativa se purificaron los linfocitos B provenientes de ratones C57BL/6 de 9 semanas de edad, teniendo una pureza mayor del 95% verificada por citometría de flujo. (Figura 7)



**Figura 7. Pureza de linfocitos B.** Linfocitos B fueron purificados por selección negativa, una porción se marcó con los anticuerpos anti CD19-PE y anti CD93-FITC para determinar su pureza mediante citometría de flujo ya que son marcadores para linfocitos B.

### **Producción de anticuerpos en linfocitos B maduros en presencia o ausencia de prolactina.**

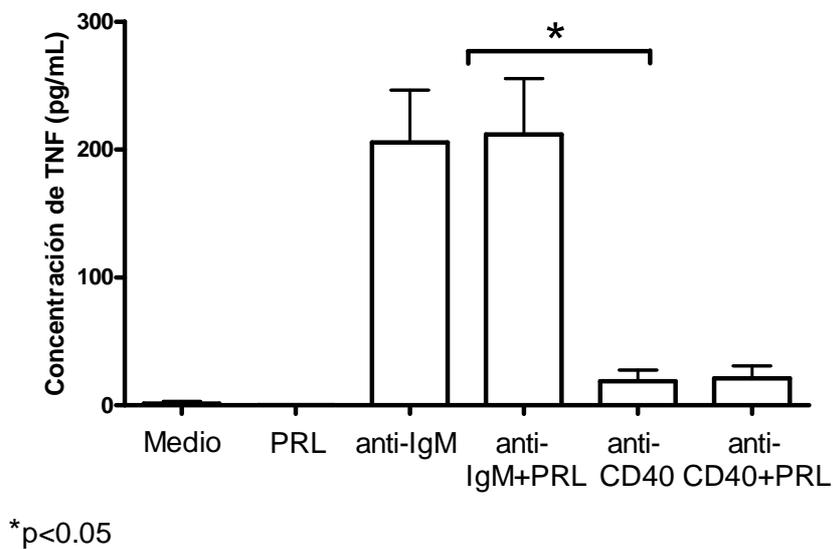
La determinación de anticuerpos totales de la clase IgM e IgG se realizó utilizando la técnica de ELISA en el sobrenadante de los linfocitos B maduros que se incubaron con diferentes estímulos para ver si existe algún cambio entre los incubados con prolactina sola o co-incubada; medio de cultivo (AIMV), PRL (50 ng/ml), anticuerpo anti-IgM (20  $\mu$ g/mL), PRL más anticuerpo anti-IgM, anticuerpo anti-CD40 (10  $\mu$ g/mL) y anticuerpo anti-CD40 más PRL durante 7 días. Nosotros no encontramos anticuerpos de ningún isotipo en los sobrenadantes de los linfocitos B incubados con medio, PRL o anticuerpo anti-IgM. Sin embargo, en los incubados con anticuerpo anti-IgM más PRL se detectaron anticuerpos de la clase IgM ( $0.6 \pm 0.3$  ng/mL). Cuando los linfocitos B fueron incubados con anticuerpo anti-CD40 se detectaron anticuerpos de ambos isotipos IgM ( $1.8 \pm 0.3$  ng/mL) e IgG ( $1.2 \pm 0.1$  ng/mL), esta concentración se vio incrementada casi cuatro veces en el isotipo IgM ( $7.4 \pm 0.2$  ng/mL) e IgG ( $4.4 \pm$  ng/mL) cuando los linfocitos B se co-incubaron con anticuerpo anti-CD40 y PRL, todos con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), como se puede observar en la Figura 8.



**Figura 8. Producción de anticuerpos (IgM e IgG).** Por medio de la técnica de ELISA se determinó la producción de anticuerpos IgG e IgM en linfocitos B maduros. A) Producción de IgM en linfocitos B con diferentes estímulos; B) producción de IgG en linfocitos B con diferentes estímulos \*p<0.05.

### Producción de citocinas en linfocitos B maduros en presencia o ausencia de PRL

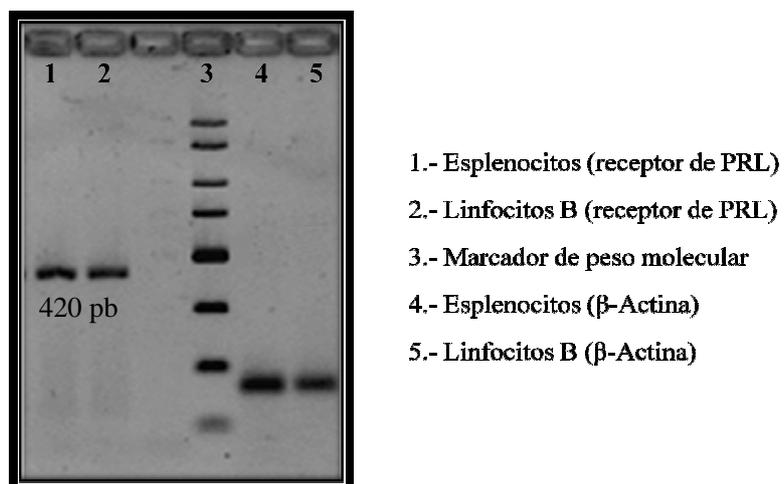
La determinación de citocinas (IL-4, IL-5, IL-2, TNF, IFN- $\gamma$ ) se realizó en sobrenadantes de linfocitos B maduros incubados con diferentes estímulos (medio, PRL [50 ng/mL], anticuerpo anti-IgM [20 $\mu$ g/mL], anticuerpo anti-IgM más PRL, anticuerpo anti-CD40 [10  $\mu$ g/mL] y anticuerpo anti-CD40 más PRL) durante 48 h utilizando la técnica de CBA. De las diferentes citocinas estudiadas solamente se detectó TNF. La mayor concentración de TNF fue detectada al estimular con anticuerpo anti-IgM (205.6  $\pm$  28.8 pg/mL), al co-incubar con PRL no se observó un cambio en esta concentración (211.5  $\pm$  29 pg/mL). En contraste, la concentración de TNF disminuyó cuando los linfocitos B maduros se incubaron con anticuerpo anti-CD40 (18.6  $\pm$  6.1 pg/mL) o anticuerpo anti-CD40 más PRL (21  $\pm$  6.8 pg/mL), esta disminución fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) al comparar con los sobrenadantes incubados con anticuerpo anti-IgM. No se encontró TNF en los linfocitos incubados solamente con PRL o medio (Figura 9).



**Figura 9. Producción de TNF- $\alpha$  en linfocitos B.** Por medio de la técnica de CBA se determinó la producción de citocinas en los linfocitos B maduros cultivados con diferentes estímulos ( $p < 0.05$ ).

**Determinación de la presencia del receptor de prolactina en linfocitos B maduros (foliculares y de zona marginal)**

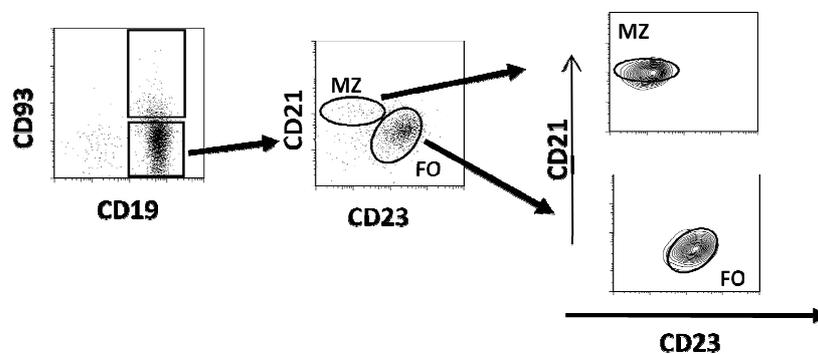
La presencia del RNAm del receptor de prolactina (PRL) en esplenocitos y linfocitos B se confirmó a través de la técnica de PCR punto final, empleando primers para la porción extracelular del receptor. La Figura 10 muestra el transcrito del receptor de prolactina (420 pb), se utilizó  $\beta$ -actina como control positivo.



**Figura 10. Receptor de prolactina.** A partir de RNAm de esplenocitos y linfocitos B de ratones C57BL/6 de 9 semana de edad, se realizó el cDNA y el PCR punto final para el receptor de prolactina.

## Expresión del receptor de PRL en subpoblaciones de linfocitos B maduros

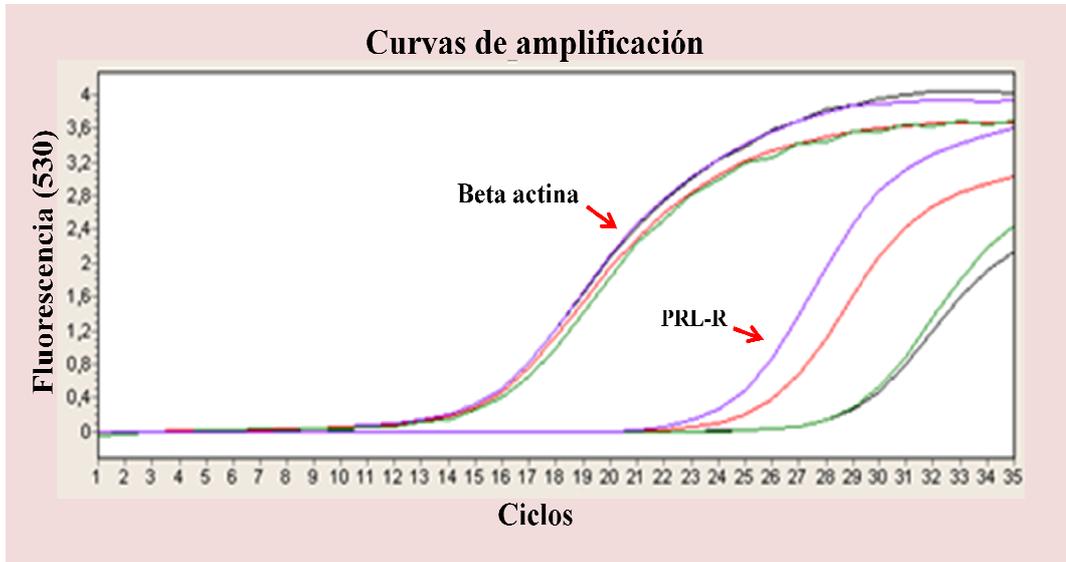
Utilizando citometría de flujo se realizó la separación de las distintas subpoblaciones de linfocitos B maduros (Foliculares y Zona Marginal) teniendo una pureza mayor del 97 % en cada subpoblación, como se muestra en la (Figura 11). Para la purificación de las distintas poblaciones se utilizaron 8 ratones y se realizaron cuatro diferentes purificaciones.



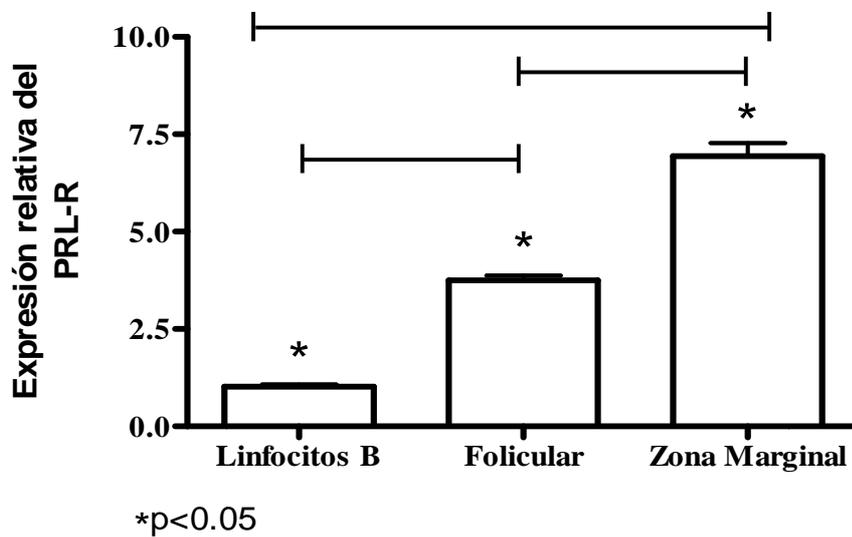
**Figura 11. Purificación de las subpoblaciones de linfocitos B.** Linfocitos B con una pureza mayor al 97 % proveniente de ratones C57BL/6 de 9 semanas de edad se marcaron con los siguientes anticuerpos: anti-CD93, CD19, CD23 y CD21. Utilizando citometría de flujo se purificaron los linfocitos B de Zona Marginal y los Foliculares.

Para cuantificar la expresión del RNAm del receptor de PRL se utilizó la técnica de PCR tiempo real. Encontrando, que tanto los linfocitos B foliculares como los de zona marginal tienen el transcrito del receptor de PRL pero en diferente grado. Los linfocitos B de zona marginal presentaron aproximadamente el doble de la expresión relativa del RNAm del receptor de PRL ( $6.9 \pm 0.58$ ) al compararse con los linfocitos B foliculares ( $3.74 \pm 0.22$ ), como se observa en la (Figura 12).

**A)**



**B)**



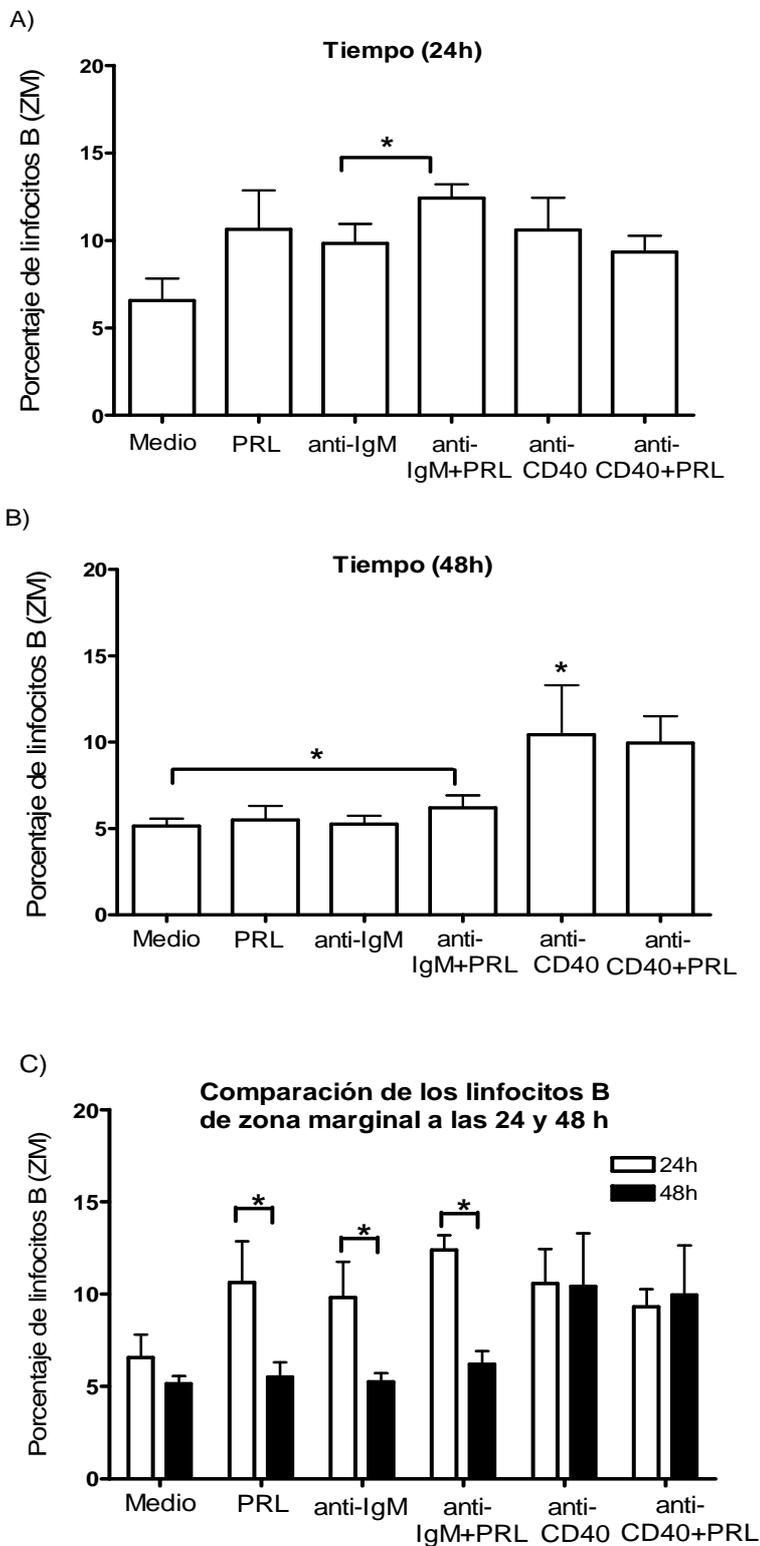
**Figura 12. Expresión relativa del receptor de prolactina.** Mediante PCR tiempo real se determinó la expresión relativa del RNAm del receptor de prolactina utilizando primers que amplificaran la porción extra-celular. A) Curvas de amplificación obtenidas a partir de PCR tiempo real. B) Expresión del receptor de prolactina en linfocitos B totales, foliculares y de zona marginal \*p<0.05.

### **Diferenciación de los linfocitos B maduros en presencia o ausencia de prolactina.**

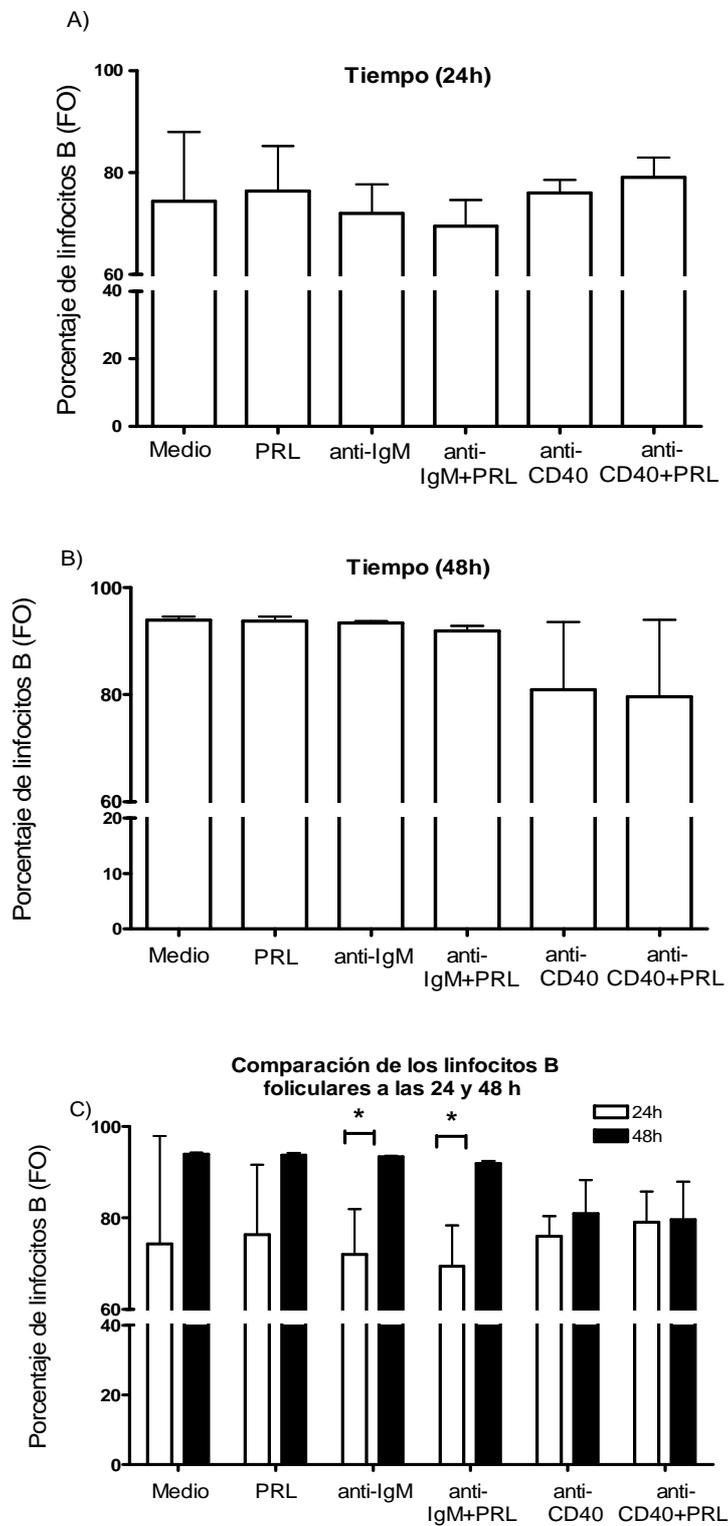
Para determinar la diferenciación de linfocitos B maduros, éstos se incubaron con diferentes estímulos (medio, PRL [50 ng/mL], anticuerpo anti-IgM [20 µg/mL], anticuerpo anti-IgM más PRL, anticuerpo anti-CD40 [10 µg/mL] y anticuerpo anti-CD40 más PRL) durante 24 y 48 h. Como se muestra en la Figura 13A, el porcentaje de linfocitos B de Zona Marginal a las 24 h solamente incremento de una forma significativa cuando los linfocitos B se incubaron con anticuerpo anti-IgM más PRL ( $12.4 \pm 0.8$  %) al comparar con los que se incubaron con anticuerpo anti-IgM ( $9.8 \pm 1.9$  %). Mientras que a las 48 h (Figura 13B) se observó que los linfocitos B incubados con anticuerpo anti-CD40 ( $10.4 \pm 1.6$  %) y anticuerpo anti-CD40 más PRL ( $10 \pm 1.5$  %) el porcentaje de linfocitos B de Zona Marginal fue mayor que con los demás estímulos. Sin embargo, entre los incubados con anticuerpo anti-CD40 y anticuerpo anti-CD40 más PRL, no existió ninguna diferencia. Cuando se comparó el porcentaje de linfocitos B de Zona Marginal con cada estímulo con respecto al tiempo (Figura 13C) se observó que los incubados con anti-CD40 ( $10.5 \pm 1$  % [24 h],  $10.4 \pm 1.6$  % [48 h] y anti-CD40 más PRL ( $9.3 \pm 0.9$  % [24 h],  $10 \pm 1.5$  % [48 h]) el porcentaje de linfocitos permaneció igual. Mientras que en los incubados con PRL ( $10.6 \pm 2.2$  % [24 h],  $5.5 \pm 0.8$  % [48 h]), anti-IgM ( $9.8 \pm 1.9$  % [24 h],  $5.2 \pm 0.5$  % [48 h]) o anti-IgM más PRL ( $12.4 \pm 0.8$  [24 h],  $6.2 \pm 0.7$  % [48 h]) se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos B de Zona Marginal a las 48 h.

En cuanto a los linfocitos Foliculares a las 24 h no se encontró diferencia significativa con ninguno de los estímulos (Figura 13.1A). Sin embargo, en los linfocitos Foliculares a las 48 h se encontró una disminución, sin ser estadísticamente significativa, en los incubados con anticuerpo anti-CD40 ( $80.9 \pm 7.2$  %) y anticuerpo anti-CD40 más PRL ( $79.6 \pm 8.3$  %) en comparación con los demás estímulos. (Figura 13.1B) Al compararse el porcentaje de linfocitos B Foliculares con cada estímulo con respecto al tiempo se encontró que entre los incubados con PRL ( $76.3 \pm 8.8$  % [24 h],  $93.7 \pm 0.4$  [48 h], anti-CD40 ( $75.9 \pm 2.5$  % [24 h],  $80.9 \pm 7.2$  % [48 h]) y CD40 más PRL ( $79.0 \pm 2.5$  % [24 h],  $79.6 \pm 8.3$  % [48 h]) no había ninguna diferencia significativa, en cambio en los incubados con anticuerpo anti-IgM ( $71.9$

$\pm 5.7 \%$  [24 h],  $93.3 \pm 0.2 \%$  [48 h]), y anticuerpo anti-IgM más PRL ( $69.4 \pm 5.1 \%$  [24 h],  $91.1 \pm 0.5 \%$  [48 h]), se observó un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos Foliculares a las 48 h. (Figura 13.1C)



**Figura 13. Diferenciación de linfocitos B maduros de zona marginal.** Se purificaron linfocitos B totales y se incubaron en diferentes condiciones, posteriormente fueron marcados para citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de linfocitos B diferenciadas hacia linfocitos B maduros. A) linfocitos B de Zona Marginal a las 24 h, B) linfocitos de Zona Marginal a las 48 h y C) comparación de linfocitos de Zona Marginal a las 24 y 48 h \* $p < 0.05$ . Fueron analizados con el programa Flowjo versión 7.5.



**Figura 13.1 Diferenciación de linfocitos B maduros foliculares.** Se purificaron linfocitos B totales y se incubaron en diferentes condiciones, posteriormente fueron marcados para citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de linfocitos B diferenciados hacia linfocitos B Foliculares. A) linfocitos Foliculares a las 24 h de incubación, B) linfocitos Foliculares a las 48 h de incubación y C) comparación de los linfocitos Foliculares a las 24 y 48 h de incubación \* $p < 0.05$ . Fueron analizados con el programa Flowjo versión 7.5.

## DISCUSIÓN

La respuesta inmune presenta diferentes mecanismos de regulación entre los que se encuentran los propios a través de factores de comunicación como las moléculas de superficie (CD40, CD40L, CD28, CTLA-4, etc.) y las citocinas, o bien los externos como el sistema endocrino (27). El sistema endocrino puede ser regulado a través de citocinas ya que se ha demostrado que las células de la hipófisis expresan receptores para citocinas que pueden regular la secreción de hormonas como prolactina (PRL), hormona del crecimiento, ACTH (hormona del crecimiento) entre otras, a su vez el sistema endócrino puede regular al sistema inmune, ya que las células del sistema inmune expresan receptores para diferentes hormonas como la PRL (17). La expresión de los receptores varía entre los distintos tipos celulares estableciendo una comunicación directa entre el sistema inmune y el endocrino que se manifiesta en los trabajos realizados por Nagy y Berczi que proporcionan las primeras evidencias de la intervención de la prolactina en el sistema inmune (15).

Se ha reportado que la PRL puede incrementar la producción de anticuerpos en células mononucleares de tanto de personas sanas (28) como en pacientes con lupus eritematoso sistémico (29). Nuestros resultados confirman lo anterior. Pero a diferencia a los estudios previos donde se activan células mononucleares con un mitógeno más PRL, nuestro sistema fue más limpio, ya que solamente se incubaron linfocitos B maduros con diferentes estímulos, en este sistema el estímulo de BCR (anticuerpo anti-IgM) no induce la producción de anticuerpos. Sin embargo, al co-incubar con PRL se producen anticuerpos del isotipo IgM, pero el estímulo que da la PRL más anticuerpo anti-IgM no es suficiente para que se dé el cambio de isotipo ya que no se detectaron anticuerpos de la clase IgG. En cambio, cuando las células B se incuban con anticuerpo anti-CD40 que es necesario para el cambio de isotipo (30), más PRL se observa un incremento en la producción de anticuerpos de los isotipos IgM e IgG, por lo que la PRL puede incrementar la producción de anticuerpos y favorecer el cambio de isotipo, siempre y cuando se dé con el estímulo adecuado.

Existen estudios que demuestran que la PRL es importante en la secreción de distintas citocinas como IL2, IFN $\gamma$ , TNF, IL4 e IL1 pero estos estudios se han realizado en células mononucleares o linfocitos T (28,31-33). Por otro lado se sabe que los linfocitos B tienen la capacidad de secretar citocinas (34). En nuestros resultados sólo encontramos un incremento en TNF cuando los linfocitos B se incubaron con anticuerpo anti-IgM y que la PRL más un estímulo (anticuerpo anti-IgM o anti-CD40) no es capaz de incrementar la secreción de ninguna de las citocinas estudiadas (IL-4, IL-5, IL-2, TNF, IFN- $\gamma$ ), sería interesante determinar si la PRL interviene en la secreción de IL-6 en los linfocitos B, ya que esta citocina es importante en la secreción de anticuerpos y la PRL incremento la producción de anticuerpos.

Estudios previos demostraron la presencia el receptor de PRL en linfocitos B y T (35), nosotros confirmamos esta presencia en esplenocitos y linfocitos B provenientes de ratones C57BL/6. En bazo se han reportado distintas subpoblaciones de linfocitos B maduros (Foliculares [FO] y Zona Marginal [ZM]) que se pueden diferenciar por sus características fenotípicas y funcionales (5). Nosotros encontramos que tanto los linfocitos B Foliculares como los de Zona Marginal expresan el RNAm del receptor de PRL pero en distinta proporción. Los linfocitos B Zona Marginal expresan mayor cantidad del RNAm de receptor de PRL que los Foliculares. Es interesante especular cual es la función del receptor de PRL y la PRL en estas subpoblaciones ya que mientras los linfocitos B Zona Marginal son parte de la inmunidad innata y responden a antígenos independientes de células T, los linfocitos B Foliculares cumplen con funciones de la inmunidad adaptativa (5).

Una vez establecida la presencia del receptor de PRL en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B maduros y la expresión de éste en diferente grado, se determinó si la PRL *in vitro* podía o no afectar la diferenciación de los linfocitos B hacia Zona Marginal y/o Folicular. Se ha reportado que la PRL afecta la maduración y diferenciación de linfocitos B y T (36). En una línea celular de linfocitos pro-B (transfectada con receptor de PRL) la PRL induce la diferenciación hacia linfocitos pre-B (37), mientras que en ratones la PRL presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B maduros en bazo (26). Nuestros resultados no mostraron un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos B

Foliculares o de Zona Marginal debido a la PRL, solamente se observó un incremento dependiente de la PRL cuando se incubó con anti-IgM más PRL en la subpoblación de linfocitos B Zona Marginal. Sin embargo, este aumento no se observó a las 48 h por lo que la PRL no fue capaz de mantener el aumento de esta subpoblación. La diferencia que encontramos con lo reportado previamente se puede deber a los distintos sistemas utilizados. Ya que mientras en un sistema *in vivo* la PRL favorece el incremento de los linfocitos B maduros esto no se observa en un sistema *in vitro* (linfocitos B puros) a pesar que se simula la activación por antígeno (anti-IgM) o por moléculas coestimuladoras (anti-CD40), por lo que podría ser necesario otras señales para que la PRL favorezca la maduración de las distintas subpoblaciones de linfocitos B maduros. Por otro lado, se observó que el porcentaje de linfocitos B Zona Marginal disminuye con el tiempo y solamente en los que se incubaron con anti-CD40 o anti-CD40 más PRL el porcentaje de linfocitos B Zona Marginal se mantuvo, esto se debe a que en estudios previos se ha demostrado que el estímulo con CD40 es fundamental para la maduración y mantenimiento de los linfocitos B (38). Este estudio es importante ya que da la pauta para estudiar el efecto de la prolactina sobre linfocitos B maduros de ratones que desarrollan enfermedades autoinmunes vinculadas a un aumento de ésta hormona, como es el caso del lupus eritematoso sistémico.

## CONCLUSIONES

- Con el estímulo adecuado (anticuerpo anti-CD40) la prolactina incrementa la producción de anticuerpos y favorece el cambio de isotipo.
- Los linfocitos B de Zona Marginal y los Foliculares, expresan el mRNA del receptor de prolactina
- Los linfocitos B de Zona Marginal expresan más mensajero del receptor de prolactina que los linfocitos B Foliculares
- La prolactina no afecta la secreción de IL-4, IL-5, IL-2, TNF, IFN- $\gamma$  en linfocitos B maduros
- La prolactina no afecta la maduración de los linfocitos B maduros *in vitro*

## **PERSPECTIVAS**

Nuestros resultados mostraron que las diferentes subpoblaciones de linfocitos B maduros (Foliculares, Zona Marginal) expresan el receptor de prolactina en diferente grado, además que la prolactina solamente favoreció la producción de anticuerpos y el cambio de isotipo con el estímulo adecuado, pero no se encontró que afectara la diferenciación y producción de citocinas en estos linfocitos B. Por lo que será interesante estudiar el efecto de la prolactina en los linfocitos B (diferenciación, secreción de citocinas y producción de anticuerpos) en ratones que desarrollan enfermedades autoinmunes, como es el caso de lupus eritematoso sistémico, ya que se ha reportado la asociación que existe entre la prolactina y el desarrollo de la enfermedad y probablemente en estos ratones si se pueda encontrar diferencias en la secreción de citocinas y diferenciación de linfocitos B.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.-Abbas A, Litchman A. 2004. *Inmunología celular y molecular*. 5th ed. Elsevier. Madrid. 129-202.
- 2.-Wang H, Clarke SH. 2004. Regulation of B cell development by antibody specificity. *Curr Opin Immunol*. 16:246-250.
- 3.-Colleman R, Matew T, Allman D. 2007. Generation of peripheral B cells occurs via two spatially and temporally distinct pathways. *Blood*. 109:2521-2528.
- 4.-Chung J. B, Silverman M, Monroe J G. 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 24:342-348.
- 5.-Allman D, Pillai S. 2008. Peripheral B subsets. *Curr Opin Immunol*. 20:149-157.
- 6.-Quinn WJ, Noorchashm N, Crowley JE, Reed AJ, Noorchashm H, Naji A, Cancro MP. 2006. Impaired transitional B cell production and selection in the nonobese diabetic mouse. *Immunol*, 176:7159-7164.
- 7.-LeBien T. W, Tedder T. F. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood Journal*.112:1570-1580.
- 8.-Goldsby R, Kindt T. Osborne. 2000. *Immunology*. 4th ed. Freeman and Company. New York. 39-40.
- 9.-Freeman M, Anycska B, Lerant A, and Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 80:1523-1587.
- 10.-Bole-Feysot, Goffin V, Edery M, Binart N, and Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 19:225-268.
- 11.-Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*. 29:1-41.

- 12.-Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev.* 17:639-669.
- 13.-Yu-Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res.* 57:435-455.
- 14.-Smith P. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anatom Rec.* 47:119.
- 15.-Nagy E, Berczi I, Wren GE, Asa SL, Kovacs K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology.* 6:231-243.
- 16.-Matera L. 1996. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunol.* 4:171-180.
- 17.-Spangelo B. L, Macleod R. M. 1990. The role immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol Metab.* 1:408-412.
- 18.-Matera L, Cutufia M., Geuna M., Contarini M., Buttiglieri S., Galin S., Fazzari A., Cavaliere C. 1997. Prolactin is an autocrine growth factor for the Jurkat human T-leukemic cell line. *J Neuroimmunol.* 79: 12-21.
- 19.-Larrea F, Martinez C. A., Cabrera V. 1997. A bioactive 60 kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J. Clin Endocrinol Metab.* 82:3664-3669.
- 20.-Chávez R. K, Legorreta H. M.V., Cervera C. H., Sánchez L., Jara L. J., Zenteno E., Blanco F. F. 2005. Prolactin effect on CD69 and CD154 expression by CD4<sup>+</sup> cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Rheumatol.* 23:769-777.
- 21.-Takizawa K, Kitani S, Takeuchi F, Yamamoto K. 2005. Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocr J.* 52:635-641

- 22.-McMurray R. W. 2001. Bromocriptine in rheumatic and autoimmune disease. *Seminars. Arthritis Rheum.* 31(1):21-32.
- 23.-Orbach H, Shoenfeld Y. 2007. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 6:537-542
- 24.-De Bellis A, Bizarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. 2005. Prolactina and autoimmunity. *Pituitary.* 8:25-30.
- 25.-Peeva E, Zouali M. 2005. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B lymphocytes. *Immunol.* 101:123-143.
- 26.-Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. 2003. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest.* 111:275-283.
- 27.- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2008. *Janeway's Immunobiology.* 7th ed. New York: Garland Science. 379-416.
- 28.- Chávez Rueda K, Hernández J, Zenteno E, Leños-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F. 2005. 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.* 116:182-191.
- 29.- Gutiérrez MA, Molina JF, Jara LJ, García C, Gutiérrez-Ureña S, Cuéllar ML, Gharavi A, Espinoza LR. 1996. Prolactin-induced immunoglobulin and autoantibody production by peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and normal individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* 109:229-235.
- 30.- Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. 2004. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 22:307-328.
- 31.- Xu D, Lin L, Lin X, Huang Z, Lei Z. 2010. Immunoregulation of autocrine prolactin: suppressing the expression of costimulatory molecules and cytokines in T lymphocytes by prolactin receptor knockdown. *Cell Immunol.* 263:71-78.

32.- Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, Luhm J. 2004. Prolactin trigger pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur Cytokine Netw.* 15:99-104.

33.-Gerlo S, Verdood P, Hooghe-Peters EL, Kooijman R. 2005. Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines. *J Neuroimmunol.* 162:190-193.

34.- Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokines production by effector B and T cells. *Nature immunol.* 475:482.

35.- Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. 1993. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J Immunol.* 150:5673-5681.

36.- Cejkova P, Fojtikova M, Cerna M. 2009. Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmun Rev.* 9:23-27.

37.-. Morales P, Carretero MV, Geronimo H, Copín SG, Gaspar ML, Marcos MA, Martín-Pérez J. 1999. Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell Growth Differ.* 10:583-590.

38.- Mackey MF, R.J. B, Noelle RJ. 1996. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cell. *J Leuk Biol.* 63:418-428.

## **ANEXO**

### **Preparación de reactivos**

- **PBS 10X**

i.	NaCl	40.0g
ii.	KCl	1.0g
iii.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.2g
iv.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2g
v.	Agua destilada	500 mL

- **PBS 1X**

i.	PBS 10X	100 mL
ii.	Agua destilada	900 mL

- **PBS Tween 0.5%**

**(Solución de lavado ELISA)**

i.	PBS 1X	1000 mL
ii.	Tween	0.5 mL

- **PBS BSA 2% Tween 0.5%**  
(solución de bloqueo ELISA)

i.	PBS-Tween	100 mL
ii.	BSA 2%	2g

- **Regulador de Bicarbonatos**

i.	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.795g
ii.	NaHCO <sub>3</sub>	1.465g
iii.	Agua destilada	500 mL

- **Fosfatasa Alcalina**

i.	Tabletas de fosfatasa	2 tabletas
ii.	Regulador de bicarbonatos	10mL
iii.	MgCl <sub>2</sub>	20μL

- **Regulador para FACS**  
(solución de lavado)

i.	PBS 1X	200mL
ii.	SFB (suero fetal bovino)	1mL
iii.	Azida de sodio 0.005%	1mL

Ajustar a pH 7.4

- **Sheat Fluid 10X**  
**(regulador para clímetro)**

i.	NaCl	81.2 g
ii.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.6 g
iii.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	23.5 g
iv.	LiCl	4.3 g
v.	EDTA	3.6 g
vi.	KCl	2.8 g
vii.	Agua mQ	1000 mL

Ajustar a pH 7.4

- **Sheat fluid 1X**

i.	Sheat fluid 10X	100 mL
ii.	Agua mQ	900 mL