



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

**MODULACIÓN DEL PERFIL DE CITOCINAS  
DE CÉLULAS T CD4+ ESTIMULADAS  
CON PROLACTINA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**B I Ó L O G O**

PRESENTA:  
**JIMENEZ MILPAS REBECA**

DIRECTOR DE TESIS  
Dra. MA. VICTORIA LEGORRETA HAQUET

ASESOR INTERNO  
Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MEXICO, D.F. 15 DE MARZO 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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. María Victoria Legorreta Haquet y del Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

Este trabajo fue financiado en parte con el apoyo del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social con los números de registro 2005-3603-046 y FIS/IMSS/PROT/G10/834. Además del apoyo del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número 113815.

## AGRADECIMIENTOS:

*A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.*

*A mi directora de tesis la Dra. María Victoria Legorreta Haquet por brindarme su apoyo, sus conocimientos, su valioso tiempo y paciencia durante el desarrollo de este proyecto de investigación.*

*A mi asesor, el Dr. Edelmiro Santiago Osorio por su gran apoyo, sin los cuales no hubiera sido posible este trabajo.*

*A mis sinodales: la Dra. María de Lourdes Mora García, Biol. José M Vicente Hernández Vásquez y Biol. Itzen Aguiñiga Sánchez por su asesoría en la elaboración de este escrito.*

*A la facultad de estudios superiores Zaragoza y cada uno de mis maestros que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.*

*Al Dr. Francisco Blanco Favela, la Dra. Karina Chávez Rueda y el M en C. Luis Chávez Sánchez por sus enseñanzas y observaciones que contribuyeron a presentar un buen trabajo de investigación.*

## DEDICATORIAS:

*Dedico esta tesis con todo mi cariño:*

*En primer lugar a mis padres Irma Milpas Arteaga y Luis Jiménez Piedras quienes son los pilares fundamentales en mi vida ya que me han apoyado y motivado en mi formación académica, los que me dieron consejos, regaños, alegrías de las cuales estoy muy segura que lo han hecho con todo el amor del mundo ya que me ha permitido ser una persona de bien.*

*A mis abuelitos, tíos, primos y sobrinos por estar siempre conmigo y brindarme su apoyo en los momentos difíciles.*

*A mis amigos más cercanos: Gabriela, Rocío, Luz, Ivonne, Perla, Rebeca, Nahum, Alejandra, Adrián, Marlene y Cintia ya que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que compartimos aventuras, experiencias y triunfos, gracias a cada uno por hacer que mi estancia en la facultad fuera divertida.*

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Índice</b>	<b>i</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen</b>	<b>iv</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>1</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>12</b>
<b>Justificación</b>	<b>12</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>12</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>13</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>14</b>
<b>Resultados</b>	<b>20</b>
<b>Discusión</b>	<b>29</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>31</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>32</b>
<b>Anexo 1 (hoja de consentimiento informado)</b>	<b>39</b>
<b>Apéndice</b>	<b>40</b>

## ABREVIATURAS.

<b>TCR</b>	Receptor de linfocito T (T cell receptor).
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin).
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation).
<b>CBA</b>	Matriz de cuentas por citometría (Citometric Bead Array).
<b>Treg</b>	Células T reguladoras (Regulatory T cell).
<b>Te</b>	Células T efectoras (Effector T cell).
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).
<b>FACS</b>	Separación celular activada por fluorescencia (Fluorescence activated cell sorter).
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid).
<b>NK</b>	Células asesinas naturales (natural killer).
<b>PRL</b>	Prolactina (prolactin).
<b>PRL-R</b>	Receptor de prolactina (Prolactin receptor).
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid).
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino (Fetal bovine serum).
<b>IL-2</b>	Interleucina 2.
<b>IL-10</b>	Interleucina 10.
<b>IL-6</b>	Interleucina 6.
<b>IL-4</b>	Interleucina 4.
<b>IL-17</b>	Interleucina 17.
<b>IFN</b>	Interferón.
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor).
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor beta).
<b>CD3</b>	Glicoproteína de superficie asociada al receptor de células T (TCR).
<b>CD28</b>	Receptor de las moléculas de coestimulación B7.
<b>APC</b>	Células presentadoras de antígeno (antigen presenting cell)
<b>LAK</b>	Células "killer" activadas por linfocinas (limphokine-activated killer cells).
<b>IRF-1</b>	Factor regulador de interferón-1 (Interferon regulatory factor 1).



<b>iNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico inducible.
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento (Growth Hormone).
<b>ConA</b>	Concanavalina A (concanavalin A).
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex).
<b>V-CAM</b>	Proteína de adhesión de células vasculares (Vascular cell adhesion protein).
<b>cDNA</b>	ADN complementario (complementary DNA).
<b>Gn-RH</b>	Hormona liberadora de gonadotropina (Gonadotropin-releasing hormone).
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (granulocyte macrophage colony stimulating factor )
<b>JAK-2</b>	Cinasas janus -2 (Janus Kinase-2).
<b>STAT-1, 3 Y 5</b>	Transductor de la señal y activador de la transcripción 1 ,3 y5 (Signal Transducer and Activator of Transcription).
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógeno (Mitogen-activated protein kinase).
<b>RNAm</b>	ARN mensajero (Messenger RNA).
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (insulin-like growth factor1).

## RESUMEN.

Existen evidencias de la participación de prolactina (PRL) en la respuesta inmune interviniendo en la proliferación y activación de los linfocitos T, así como en la secreción de citocinas. Sin embargo los mecanismos a través de los cuales participan en la activación y regulación de las células T aún se desconocen. Las células T reguladores (Treg, CD4+CD25+CD127-FOXP3+) ejercen un efecto inhibitor tanto de la activación como de la función de las células T efectoras (Te, CD4+CD25-CD127+) y constituyen un importante mecanismo de tolerancia periférica, dado que su eliminación conduce a enfermedades autoinmunes, tales como lupus y encefalitis experimental autoinmune.

El objetivo de este trabajo fue demostrar que la prolactina participa en la regulación de las células TCD4+ a través de la modulación del perfil de citocinas. Para lo cual, a partir de células mononucleares de sangre periférica, se separaron por la técnica de citometría de flujo las subpoblaciones de células TCD4+: células Treg. (CD4+CD25+CD127-FOXP3+) y células Te (CD4+CD25-CD127+). A través de PCR en tiempo real se cuantificó el RNA mensajero (RNAm) del receptor de PRL (PRL-R) en estas células. Por otro lado se evaluó la actividad funcional mediante ensayos de proliferación y cuantificación de citocinas en respuesta al estímulo con antiCD3/CD28 en presencia o ausencia de PRL. El RNAm del PRL-R se encontró de manera constitutiva en las células T reguladoras; en contraste con la población efectora donde no detectamos su expresión.

Se realizaron 6 ensayos de proliferación celular, cada uno por triplicado en presencia o ausencia de PRL y se observó que PRL interviene en la proliferación de las células Te tendiendo a incrementar aunque no de manera significativa la proliferación de las mismas. Además, encontramos que PRL afectó la regulación mediada por células Treg, ya que la adición de PRL al cocultivo Te/Treg fue capaz de contrarrestar el efecto supresor de las células Treg. Analizamos también si PRL tiene alguna función en la modulación del perfil de citocinas de los cultivos de las células Treg y Te. Y encontramos que PRL no ejerce ningún efecto sobre la concentración detectada de IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17; mientras que TGF- $\beta$ , IL-2 e IFN- $\gamma$  tienden a incrementar en presencia de PRL. Respecto a la concentración de TNF, esta incrementó al adicionar PRL al cocultivo Te/Treg. Estos resultados sugieren que PRL favoreció la secreción de TNF en el cocultivo Te/Treg.

## MARCO TEÓRICO.

### PROLACTINA.

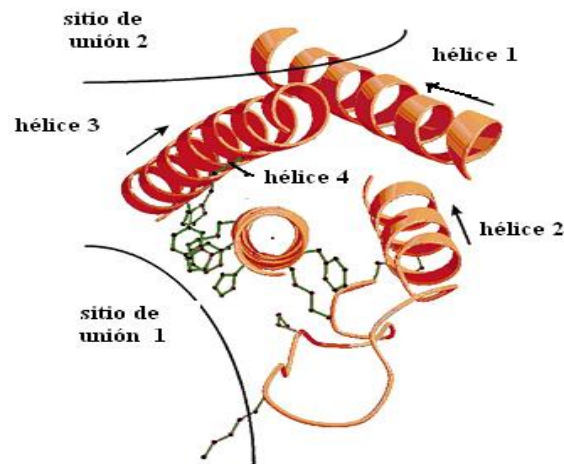
La prolactina (PRL) es una hormona lactogénica sintetizada y secretada por células especializadas de la hipófisis anterior denominadas lactotropos, así como por células extrahipofisarias como las de glándula mamaria, placenta, útero y células del sistema inmune [1,2]. Actualmente se conocen más de 300 funciones biológicas de la PRL, las cuales pueden dividirse en las siguientes categorías: 1) reproducción, 2) endocrinología y metabolismo, 3) osmorregulación, 4) desarrollo y crecimiento e 5) inmunorregulación [2, 3]. Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Acciones biológicas de la prolactina [4].

Órgano blanco.	Efectos.
Glándula mamaria.	Regula el desarrollo y crecimiento celular, aumenta la síntesis de proteínas y carbohidratos de la leche, estimula la lactogénesis, regula el tránsito de la IgA a través del epitelio celular.
Hipotálamo.	Estimula el recambio de dopamina, disminuye la secreción de GnRH.
Páncreas.	Estimula la proliferación, aumenta la actividad de las células $\beta$ para la secreción de insulina.
Próstata.	Estimula la proliferación, aumenta IGF-1 y sus receptores y los receptores para andrógenos.
Riñón, intestino, placenta.	Regula el equilibrio de agua y electrolitos.
Sistema Inmune:	
Células NK.	Contribuye a la proliferación, la diferenciación y la respuesta LAK, estimula la síntesis de IFN- $\gamma$ .
Granulocitos.	Estimula la expresión del gen IRF-1 y la síntesis de la iNOS.
Linfocitos.	Estimula la inmunidad celular, la proliferación, la síntesis de IFN- $\gamma$ , de IL-2 y sus receptores. Inhibe la apoptosis, regula la síntesis de la INOS y estimula la expresión del gen de IRF-1.
Monocitos.	Induce la diferenciación y estimula la presentación de antígeno, favorece la expresión de GM-CSF.

En base a sus propiedades genéticas, estructurales y funcionales la PRL pertenece a la misma familia que la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario, los cuales provienen de un mismo gen ancestral. El gen que codifica para PRL en el ser humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y está compuesto por cinco exones y cuatro intrones con un tamaño aproximado de 10 kb [2,5].

La prolactina es una proteína globular de una sola cadena con 199 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 23 kDa, formada por cuatro cadenas  $\alpha$ -hélice y dos sitios de unión para el receptor de prolactina (figura 1), contiene seis cisteínas que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares (Cys4-Cys11, Cys58-Cys174, y Cys191-Cys199) [3].

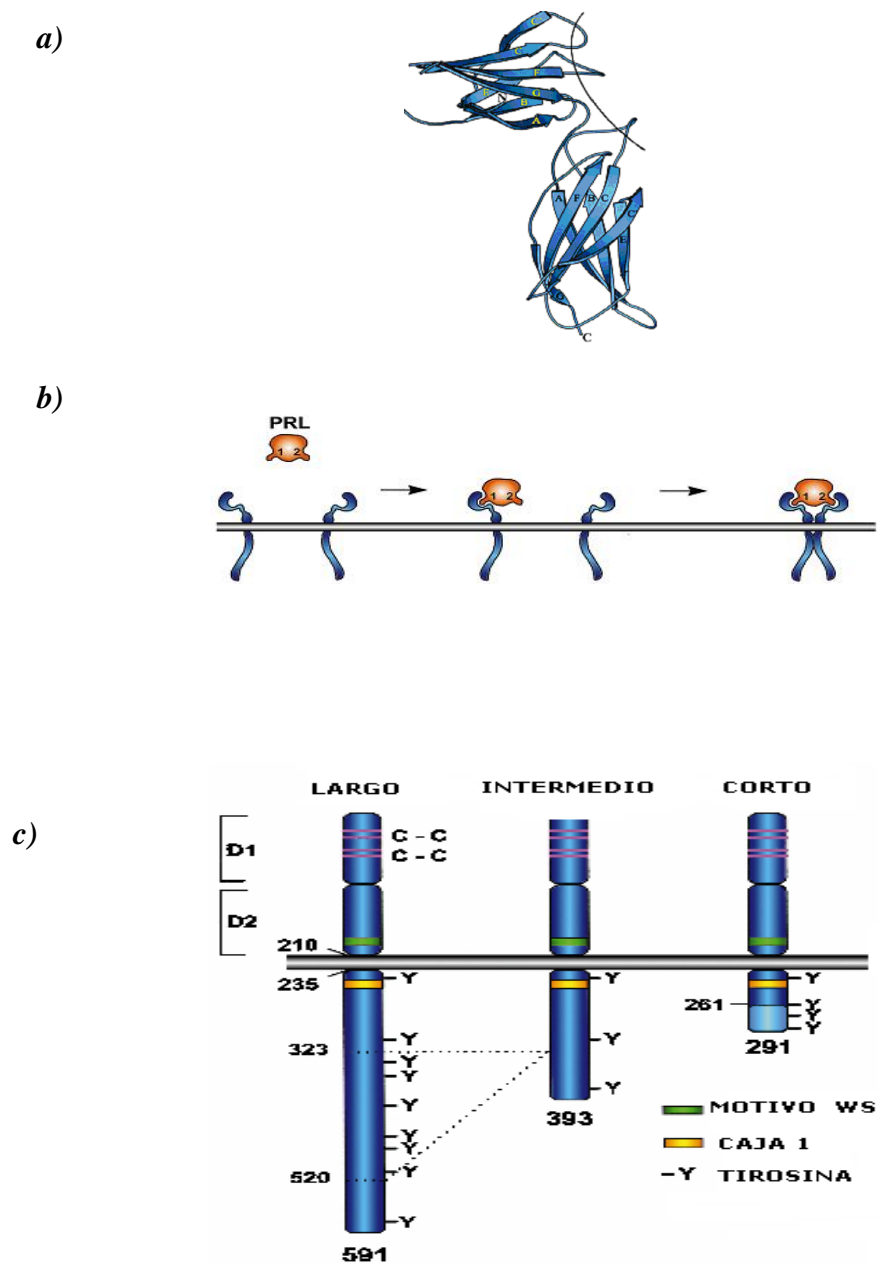


**Figura 1. Estructura terciaria de la prolactina.** Presenta cuatro dominios alfa hélices y dos sitios de unión al receptor [3].

## RECEPTOR DE PROLACTINA.

El gen del receptor de PRL (PRL-R), se encuentra en el cromosoma 5 y a diferencia del de prolactina que codifica para una sola proteína, el gen del receptor codifica para tres diferentes proteínas. Estas isoformas difieren en el tamaño y composición en la porción intracelular del receptor: corto, mediano y largo en rata y humanos [6]. Las diferentes isoformas exhiben un dominio extracelular idéntico, con aproximadamente 200 aa y tienen analogía con la fibronectina tipo III. Se divide en dos subdominios (cada uno de ~100 aa): el primero presenta dos puentes disulfuro (Cys<sup>12</sup>- Cys<sup>22</sup>, Cys<sup>51</sup>- Cys<sup>62</sup>) y el segundo un motivo penta péptido denominado WS (Trp-Ser-aa-Trp-Ser) [2,7]. El dominio transmembranal tiene 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 prolinas denominada caja 1; mientras que la caja 2 es una región menos conservada que se pierde en la isoforma corta.

La estructura terciaria del receptor determinada por cristalografía muestra que los dominios extracelulares contienen siete cadenas  $\beta$  plegadas en antiparalelo como se muestra en la figura 2 [2,3].



**Figura 2. Estructura del receptor de prolactina.** a) Estructura terciaria del receptor de prolactina, presenta un sitio de unión y estructura de beta plegada en antiparalelo b) Dimerización del receptor de prolactina. c) Representación esquemática de las tres isoformas del receptor de prolactina de ratón y humano El dominio extracelular idéntico dividido en dos sub-dominios, la porción intracitoplasmática difiere en tamaño y composición

Se ha demostrado la expresión del receptor de prolactina en células del cerebro, retina, cartílago, piel, pulmón, corazón, páncreas, hígado, bazo, timo, tracto intestinal, riñón, sistema reproductivo, linfocitos (T y B), macrófagos, etc. [2,3].

Estudios comparativos de la secuencia de receptores de membrana condujeron a la identificación de una superfamilia de receptores que se denominó familia de receptores para citocinas clase 1 (2,3,8), en la cual están incluidos el receptor de PRL, hormona de crecimiento (GH), leptina y algunas interleucinas como la Interleucina-2, la Interleucina-4 y la Interleucina-6 entre otros [4].

La unión PRL con PRL-R induce la fosforilación de tirosinas (Tyr) de distintas proteínas intracelulares incluyendo al receptor y activa la vía JAK-2, STAT-1, STAT-3 Y STAT-5 y MAPK [8,9].

## **PROLACTINA Y SISTEMA INMUNE.**

El papel de la PRL en la modulación del sistema inmune se descubrió en la década de 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas sufría un proceso de atrofia después de realizarles hipofisectomía [10]. En 1978 Nagy y Berci, publicaron su trabajo acerca de la inmunodeficiencia en ratas hipofisectomizadas, donde la administración de PRL, hormona de crecimiento y lactógeno placentario reestableció la actividad inmunológica [11]. En 1983 se realizaron experimentos similares, utilizando bromocriptina (agonista dopaminérgico) para inhibir selectivamente la secreción de PRL y encontraron resultados similares al trabajo anterior; disminución en la respuesta inmune tanto celular como humoral, que se recuperó al adicionar prolactina [12]. Además se ha encontrado que el sistema inmune es capaz de regular la secreción de prolactina [13]. Las citocinas IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  pueden actuar como reguladores endócrinos en la liberación de PRL hipofisiaria [14,15].

La utilización de un anticuerpo contra PRL ha puesto de manifiesto que también el sistema inmune es sitio blanco de los efectos de PRL, ya que el bloqueo con el anticuerpo inhibe específicamente la proliferación de células linfoides en presencia, tanto de mitógenos

específicos para linfocitos T y B, como de citocinas tales como IL-2 e IL-4, que actúan como factores de crecimiento [16]. La adición de PRL exógena evita la acción inhibitoria del anticuerpo en cultivos de linfocitos, además la adición de prolactina combinada con IL-2, fitohemaglutinina o concanavalina A (ConA) estimula la proliferación de linfocitos T y B en cultivo [17]. También estimula la síntesis de la IL-2 y su receptor en esplenocitos y timocitos, además de colaborar en las acciones de la IL-2 e IL-12 estimulando la síntesis de IFN- $\gamma$  en los linfocitos T [4]. Otros estudios han sugerido que PRL contribuye a la actividad hematopoyética y el desarrollo y mantenimiento de la médula ósea [7].

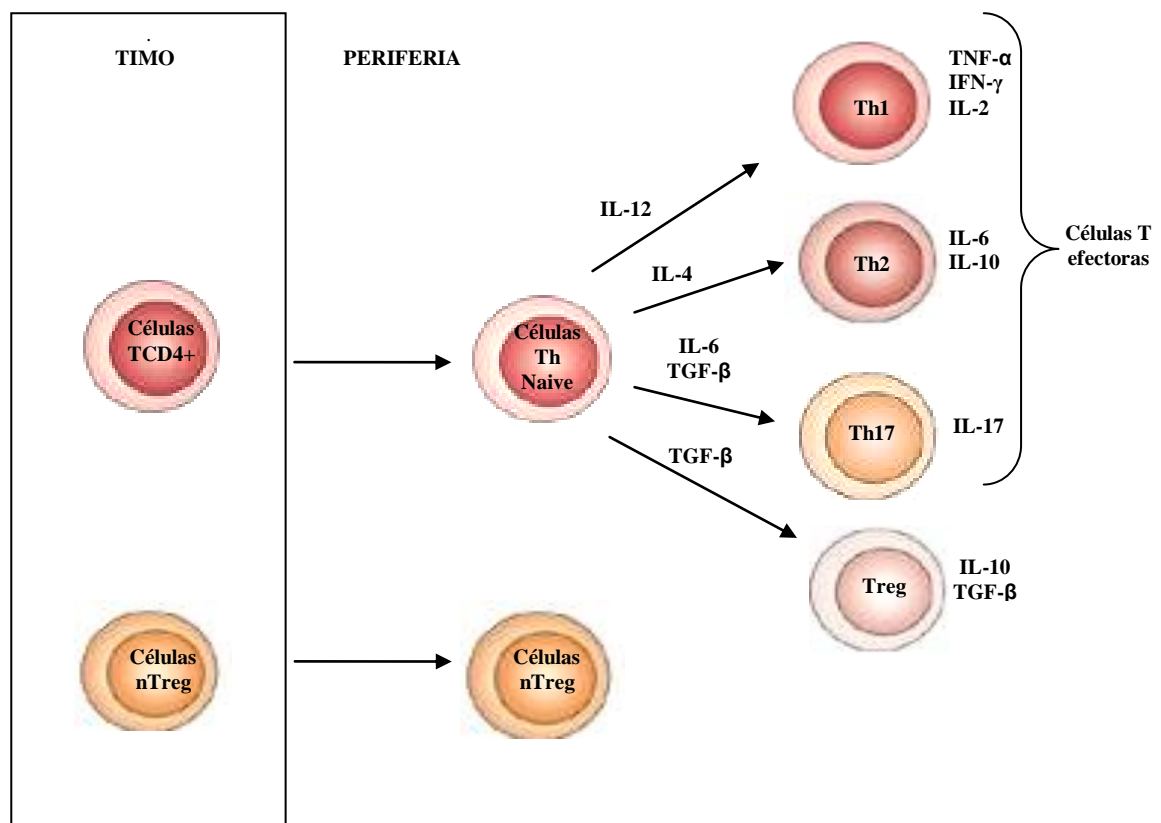
Carreño y colaboradores demostraron la presencia del receptor de PRL en timocitos y progenitores de linfocitos T [18], también se ha reportado en linfocitos B [2,3]. Los timocitos y células mononucleadas (CMN) sintetizan PRL con peso molecular de 23 kDa [13] o de 60 kDa [19], esta proteína presenta actividad biológica medida por bioensayo con células Nb2 [14]. Además se ha demostrado que PRL induce la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores linfoides de células T, mientras que el uso de los anticuerpos anti PRL y anti receptor de PRL incrementan el número de células doble positivas (CD4+CD8+), demostrando que PRL participa en la maduración de las células T *in vitro* [18].

## **LINFOCITOS T.**

Las células T se originan en la médula ósea y migran hacia el timo donde sufren procesos de desarrollo y diferenciación como: la eliminación de clonas autorreactivas y división en subpoblaciones con diferente capacidad funcional. La eliminación de clonas autorreactivas se lleva a cabo en dos fases principales; 1) La de selección positiva que es particularmente crítica en el desarrollo de los linfocitos T  $\alpha\beta$  que reconocen al antígeno asociado a las moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC), lo que garantiza que la célula T sea capaz de responder; 2) Y el de selección negativa donde los linfocitos T con receptores altamente afines son eliminados y se previenen reacciones autoinmunes. Las células T se diferencian en varios subtipos: a) Células vírgenes, que son aquellos linfocitos T que no han estado en contacto con el antígeno, b) células T cooperadoras o TCD4+, que se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmune coordinada mediante la interacción con el complejo principal

de histocompatibilidad clase II (MHC II), c) células T reguladoras, que eliminan las células T autoreactivas que hubiesen escapado del proceso de selección negativa en el timo y d) células T citotóxicas o TCD8+ que se encargan de las funciones efectoras de la inmunidad celular mediante la interacción con el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) [20].

Como se muestra en la figura 3 las células T cooperadoras o T CD4+ se diferencian dependiendo del microambiente de citocinas que producen: en células T reguladoras y T efectoras y estas últimas se diferencia en células TCD4+ tipo 1(Th1), tipo 2 (Th2) ó Th17 [21].



**Figura 3.** Los distintos tipos de Linfocitos T CD4 y las interleucinas que producen [22].



## **LINFOCITOS Th1.**

Los linfocitos Th1 se caracterizan por secretar principalmente TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2. El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria y a la vez inmunomoduladora producida por macrófagos, monocitos, linfocitos, queratinocitos y fibroblastos en respuesta a la inflamación, desempeña un papel importante en la activación y migración de leucocitos, restringe las células T autorreactivas a través de la regulación negativa del receptor de células T (TCR) y la inducción de apoptosis de las células T en sangre periférica [23]. El IFN- $\gamma$  es producido por linfocitos CD4+, linfocitos CD8+ y células NK. La producción de IFN- $\gamma$  es controlada por citocinas secretadas por células presentadoras de antígeno (APC) especialmente por IL-12 e IL-18. La función de IFN- $\gamma$  está centrada en la intervención del macrófago en la inflamación y en la inmunidad adquirida durante un proceso infeccioso [24]. Mientras que IL-2 es secretada casi exclusivamente por los linfocitos T CD4+ y CD8+, actúa de manera autócrina y parácrina y tiene como efecto fundamental la expansión clonal post reconocimiento de los linfocitos T. Estimula la proliferación de los linfocitos T activados por antígenos o lectinas y la progresión de la fase G1 del ciclo celular llevando al crecimiento y multiplicación. En mayores niveles de concentración puede activar la proliferación de linfocitos T nativos e inducir la expresión de otras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-4, IFN- $\gamma$ . Además actúa como un factor de diferenciación para las células T [25].

## **LINFOCITOS Th2.**

Las células Th2 secretan principalmente IL-6, IL-10 e IL-4. La IL-6 es una citocina pleiotrópica en respuesta a la infección, trauma y otras condiciones de estrés. Se expresa en monocitos y macrófagos, es rápidamente inducida por virus y endotoxinas bacterianas, así como citocinas asociadas con la inflamación como la IL-1, TNF- $\alpha$ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e interferones. Cuenta con una señal reguladora clave en el desarrollo de las células Th17, mientras que simultáneamente bloquea la diferenciación de las células CD4+ a células T reguladoras [26]. La IL-10 se caracteriza por ser inmunosupresora por excelencia, inhibe la síntesis de muchas otras citocinas entre las que podemos citar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12. En los linfocitos T, influye en el desarrollo de timocitos y células Te

inhibe la capacidad de las células presentadoras de antígenos para inducir la diferenciación de las células Th1. Es producida por las células Th2, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T CD8 +, células T reguladoras, células Th1 y células Th17 [27,28].

La IL-4 muestra una amplia gama de actividades biológicas, en términos generales, puede ser descrita como la principal citocina involucrada en la patogénesis de las respuestas alérgicas, al mismo tiempo, disminuye los cambios inflamatorios agudos. El papel crucial de la IL-4 se encuentra en su efecto sobre el desarrollo Th2, la expresión de la proteína de adhesión celular vascular (V-CAM), la promoción de la trans migración de eosinófilos en los pulmones, la inhibición de la apoptosis de los linfocitos T y la hipersecreción de moco [29,30].

### **LINFOCITOS Th17.**

Las células Th17 secretan IL-17, actualmente se conocen 6 moléculas diferentes que se nombran desde IL-17A a IL-17F. La IL-17A es la más importante y por eso es a la que se denomina genéricamente como IL-17. El receptor para la IL-17A está presente en una amplia variedad de células y tejidos del sistema inmune. La IL-17A actúa sobre un amplio panel de células y las estimula a secretar potentes mediadores de la inflamación como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, prostaglandina E2, quimiocinas, y metaloproteasas. Es esencial en el reclutamiento, activación y migración de otras células del sistema inmune [31].

### **LINFOCITOS Treg.**

Las células Treg naturales son células T CD4+ que surgen durante el desarrollo de las células T en el Timo, constituyen entre el 1 y 10% de la población total de linfocitos en sangre periférica y constitutivamente expresan una amplia variedad de marcadores de superficie como la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25), CTLA-4, baja expresión de CD45RB, CD62L, GITR, LAG-3, CD127 y el factor de transcripción “forkhead” Foxp3 [32, 33,34].

Foxp3 se destacó originalmente debido a que fueron encontradas en él mutaciones como la causa de dos severos síndromes multiorgánicos autoinmunes en humanos: El síndrome de desregulación alérgica autoinmune ligada al cromosoma X (XLAAD) y en el síndrome de

inmunodesregulación poliendocrinopática enteropática ligada al cromosoma X (IPEX). Los ratones Scurfy que presentan una mutación en el gen de Foxp3 padecen un desorden linfoproliferativo fatal y mueren dentro de las primeras cuatro semanas de vida. La eliminación específica de Foxp3 en células T resulta en un síndrome linfoproliferativo autoinmune idéntico al observado en ratones deficientes de Foxp3 [35].

Foxp3 es considerado el marcador de Treg más confiable. El análisis de distribución en tejidos muestra que Foxp3 está primordialmente presente en tejido linfoide y su expresión está altamente restringida a células T CD4  $\alpha\beta$ , aunque algunas CD8 expresan también Foxp3 [35]. Foxp3 no solo controla el desarrollo sino también la función de los linfocitos Treg naturales. La expresión de Foxp3 es específica en Treg de ratón. Sin embargo, la expresión en humanos es menos restrictiva [36,37].

Los linfocitos Treg naturales expresan constitutivamente CD25 y suprimen la respuesta inmune vía interacciones célula-célula después de ser activadas a través de su TCR. La intensidad de expresión de CD25 y CTLA-4 correlacionan con la capacidad supresora de las diferentes clonas de células T [38], las células Treg exhiben algunos rasgos característicos como la anergia por falta de un eficiente flujo de calcio y no proliferan ni producen IL-2 o citocinas proinflamatorias en respuesta al estímulo vía TCR [39].

La cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25), es una proteína transmembranal tipo1 que está presente en células T y B activadas, en algunos timocitos y precursores mieloides [40]. En humanos, el nivel de expresión de CD25 puede discriminar entre linfocitos Treg naturales y linfocitos T activados que también expresan CD25. Los linfocitos Treg naturales se encuentran confinados en las células con alto nivel de expresión de CD25, denominadas CD25Hi [36].

Algunos subtipos de células T reg secretan TGF- $\beta$  e IL10. El TGF- $\beta$  suprime el crecimiento y diferenciación de muchos linajes de células inmunes incluyendo células T y B, actúa de manera autócrina y parácrina también como un quimioatrayente para fibroblastos, monocitos y neutrófilos e inhibe la activación del sistema inmune por presentación antigénica o de

interleucinas. *In vivo* aumenta las funciones efectoras y de memoria de los linfocitos T CD4+, inhibe la secreción de IgG e IgM y suprime la hematopoyesis dependiente de IL-3. También controla la proliferación y maduración en células B y tiene un papel regulador crítico en la expresión de IgA [28,41].

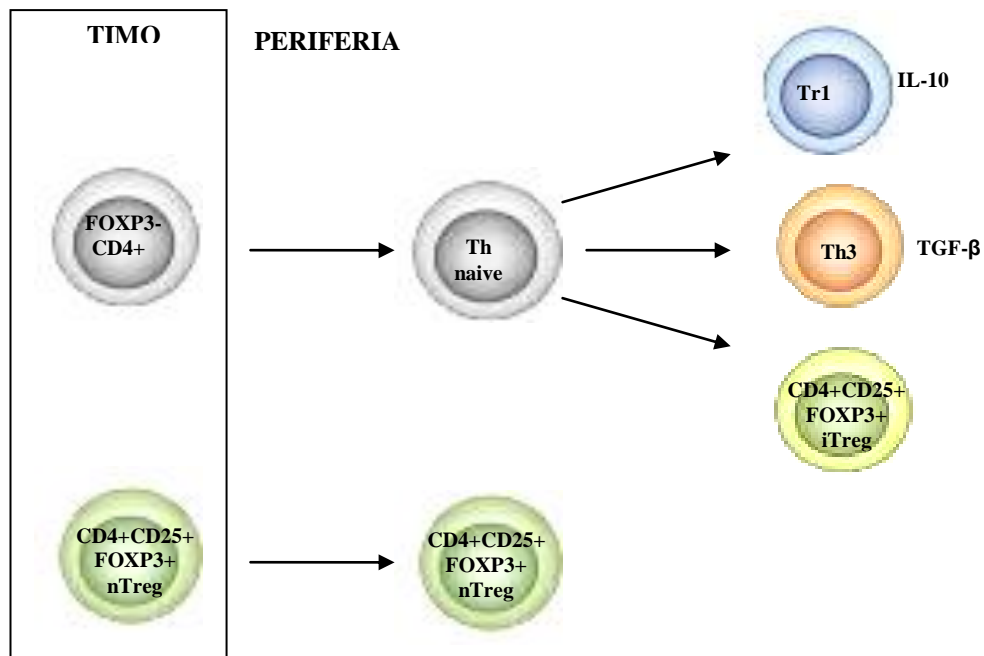
Por otro lado la IL-10 es inmunosupresora por excelencia, inhibe la síntesis de muchas otras citocinas entre las que podemos citar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12. En los linfocitos T, influye en el desarrollo de timocitos y células T. Además inhibe la capacidad de las células presentadoras de antígenos para inducir la diferenciación de las células Th1. Es producida por las células Th2, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T CD8+, células T reguladoras, células Th1 y células Th17 [27,28].

La tolerancia inmunológica requiere un equilibrio controlado que se presenta entre el mantenimiento de la tolerancia periférica a los autoantígenos y la preservación del potencial para iniciar la respuesta inmunitaria protectora contra los agentes infecciosos y suprimir las células T autorreactivas que escapan al proceso de selección negativa en el timo.

Las células T reguladoras (Treg) son una población especializada para mantener el equilibrio en el sistema [42-44]. Las células Treg se caracterizan por ser potentes inhibidoras tanto *in vitro* como *in vivo* de la actividad y expansión de células T [32].

### **SUBPOBLACIONES DE Treg.**

Se han identificado diferentes subpoblaciones de células Treg y se han clasificado de acuerdo a su origen y marcadores celulares en: a) células Treg naturales y b) células Treg inducibles (figura 4) [32].



**Figura 4** Diferentes subtipos de células T reguladoras. [22]

Las células Treg inducibles, se generan en periferia a partir de las células T naive estimuladas con bajas dosis de antígeno o por citocinas inmunosupresoras como TGF- $\beta$ . Existen al menos 3 poblaciones de células Treg inducibles: a) Células Treg CD4+CD25+ inducidas en periferia, b) Células Treg tipo 1 (Tr1), c) Células Treg tipo 3 (Th3). Las células Treg inducidas en periferia expresan el fenotipo clásico CD4+CD25+, mismo que adquieren en periferia. Por otro lado las células Treg que no expresan el fenotipo CD4+CD25+ son más bien definidas en base al perfil de citocinas que secretan, encontrando a los linfocitos Tr1 que no expresan Foxp3, migran hacia sitios de inflamación y suprimen tanto la respuesta de células T como la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas proinflamatorias por las células presentadoras de antígeno. Las células Th3 que producen altas concentraciones de TGF- $\beta$  e inhiben el desarrollo de autoinmunidad en distintos modelos animales y pueden suprimir la activación de las clonas Th1 y Th2. Sin embargo, TGF- $\beta$ , citocina mediadora de Th3 puede convertir células T naive en Treg CD4+CD25+ presumiblemente por inducción de la expresión de Foxp3 [34, 45,46].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Actualmente se sabe que los linfocitos Treg tienen efecto supresor. Sin embargo, no existe información acerca de la participación de la prolactina en la función de estos linfocitos, por lo que es importante investigar si PRL participa en el proceso de regulación mediado por Treg.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Durante la respuesta inmune existen distintos mecanismos para mantener la tolerancia en la periferia, entre ellos se encuentra el mediado por las células T reguladoras (Treg). Estas células tienen la capacidad de suprimir a las células T efectoras (Te), ya sea por contacto celular o por secreción de citocinas. Por otro lado distintos reportes muestran la importancia de la prolactina (PRL) en el sistema inmune al inducir proliferación y diferenciación de los precursores de los linfocitos T e intervenir en la secreción de citocinas de los linfocitos T activados. Sin embargo, no se tienen suficientes datos para establecer la participación de esta hormona en el proceso de regulación mediado por linfocitos T CD4+. Por lo que es necesario investigar si la PRL es capaz de modificar la secreción de citocinas de las células Treg y Te activadas en cultivos estimulados con PRL.

## **HIPÓTESIS.**

Dado que la PRL participa en la respuesta inmune, entonces consideramos que también intervendrá en la regulación dada por células TCD4+ a través de la modulación del perfil de citocinas.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Demostrar que la PRL participa en la regulación de las células TCD4+ a través de la modulación del perfil de citocinas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Determinar la presencia del RNA mensajero del receptor de PRL en células Treg (CD4+CD25+CD127-) y Te (CD4+CD25-CD127+) de personas sanas.
2. Determinar si PRL modifica la función de las células Treg a través de ensayos de proliferación celular.
3. Comparar el patrón de secreción de citocinas en sobrenadantes de cultivos de células Treg y Te en presencia o ausencia de PRL.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Diseño del estudio:**

Experimental, transversal.

### **Población en estudio:**

Hasta el momento no hay datos disponibles en la literatura que permitan calcular el tamaño de la muestra, por lo que el protocolo se establece como un estudio piloto con 6 mujeres sanas.

### **Criterios de inclusión:**

1. Mujeres sanas.
2. Edad de 18 a 45 años
3. No embarazadas
4. Sin ningún tratamiento farmacológico en los últimos 15 días.
5. Sin galactorrea.
6. Con periodos menstruales regulares.

### **Criterios de exclusión:**

1. Negativa a firmar consentimiento informado. (anexo1)

### **Criterios de eliminación:**

1. Sujetos en los que no se logró obtener el número de células suficiente (mínimo necesario trescientas mil células T reguladoras para cumplir con las expectativas de nuestro modelo).



**Método:**

La muestra sanguínea se tomo de vía venosa previa asepsia y antisepsia, se obtuvo un volumen de 30 mL de sangre en tubos que contienen 10.8 mg de K2 EDTA.

**Hormona:**

Se utilizó prolactina hipofisiaria humana donada por el Natinal Hormone & Pituitary Program (USA).

**Anticuerpos:**

Se utilizaron anticuerpos antiCD4-APC (OKT4), antiCD25 PE-Cy5 (BC96), antiFoxp3-PE (PCH101) y antiCD127 FITC (eBioRDR5) de la marca eBioscience (San Diego California USA). AntiCD28 purificado (CD28.2) y antiCD3 purificado (HIT3a) de la marca BD Bioscience (Sn José California USA).

**Separación de células:**

La sangre se diluyó en solución salina [0.9%] en una relación 1:3, se adicionaron 3 mL de Lymphoprep (Nycomed) por cada 7 mL de sangre diluida, se centrifugó a 2000 rpm/30 min. Las células mononucleadas (CMN) se colectaron de la interfase, se lavaron dos veces con solución salina y una con medio AIMV (Gibco) [apéndice]; la viabilidad celular se determinó con azul tripano y se utilizaron las células con viabilidad superior al 90%.

**Purificación de células Treg:**

Se realizó un pre enriquecimiento de linfocitos T CD4+ por selección negativa utilizando “CD4+ T cell isolation kit II” (Miltenyi Biotec, Germany). Partimos de células mononucleares en un volumen de 100 µl de regulador fosfatos (PBS 0.01M pH 7.2, BSA 0.5% y EDTA 2 mM) [apéndice] más 30 µl de una mezcla de anticuerpos biotinilados (antiCD8, CD14, CD16,

CD19, CD36, CD56, CD123, CD235a y TCR $\gamma/\delta$ ), se incubaron durante 10 min a 4°C, transcurridos estos, se lavaron, y centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante completamente, agregamos 75  $\mu$ L de regulador PBS+BSA+EDTA [apéndice] más 30  $\mu$ L de perlas magnéticas antibiotina, homogeneizamos e incubamos durante 15 min a 4°C. Lavamos con regulador, centrifugamos durante 10 min a 1500 rpm. Las células lavadas se resuspendieron en 500 $\mu$ L de regulador y se pasaron por una columna de separación MACS MS+ (Miltenyi Biotec). Los linfocitos T CD4+ obtenidos se marcaron con anticuerpos antiCD4-APC, antiCD25-PE y antiCD127 FITC, se incubaron 20 min a 4°C y mediante citometría de flujo (FACSaria, BD Biosciences) se separaron las células T efectoras (Te CD4+ CD25-CD127+) y T reguladoras (Treg CD4+ CD25+CD127-).

### Ensayos de proliferación celular:

Los ensayos de proliferación se realizaron por triplicado en placas de 96 pozos (Nunc Denmark). Las células T efectoras (Te, CD4+CD25-CD127+) y T reguladoras (Treg, CD4+CD25+CD127-) se cultivaron utilizando medio (AIM-V de Gibco) [apéndice] en presencia o ausencia de PRL [50 ng/mL] con y sin estímulo (antiCD3 [2.5 $\mu$ g/ml]/CD28 [1  $\mu$ g/ml]). A cada pozo se adicionaron 50  $\mu$ L de la suspensión de células correspondiente (Te 4X10<sup>5</sup> células/ml, Treg 2X10<sup>5</sup> células/ml) en las siguientes condiciones de cultivo:

○ Medio	Te	Treg	Te/Treg
○ Medio+ anti CD3/CD28	Te	Treg	Te/Treg
○ Medio+PRL	Te	Treg	Te/Treg
○ Medio+ anti CD3/CD28+PRL	Te	Treg	Te/Treg

Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C/120 h con 5% de CO<sub>2</sub>. Dieciocho horas antes de cosechar, se marcaron con 1 $\mu$ Ci de [Td-<sup>3</sup>H] (Amersham Pharmacia Biotech) por pozo. Las células se cosecharon en un cosechador múltiple (Cell Harvester, Brandel M-24R) en papel filtro (Whatman). El papel se colocó en viales con 2 mL de líquido de centelleo (EcoLumen, ICN). La

proliferación celular se determinó por incorporación de timidita tritiada y se leyó en un contador de radiación beta (Packard 1900 TR).

### **Extracción de RNA:**

A partir de  $5 \times 10^5$  células se extrajo RNA. Se adicionó 1 mL de Trizol (isotiocianato de guanidina/fenol (Invitrogen), a fin de lisar las células, después de 5 min de incubación a 4 °C se adicionaron 220  $\mu$ L de cloroformo, se incubó durante 5 min a 4°C y se centrifugó 15 min a 11000 rpm a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio, se adicionó 500  $\mu$ L de isopropanol, se homogenizó y se dejó reposar toda la noche a 4°C. Se centrifugó 10 min a 11000 rpm a 4 °C, se quitó el exceso de isopropanol y se adicionó etanol al 75 %. Se centrifugó 5 min a 6000 rpm a 4°C. Se quitó el exceso de etanol, se seco, se diluyó en agua libre de RNAsas (1:50) y se cuantificó.

### **RT-PCR:**

1  $\mu$ g de RNA más 0.5  $\mu$ g de Oligo dT en un volumen final de 11  $\mu$ L, se incubaron durante 10 min a 70 °C, se adicionaron 9  $\mu$ L de la mezcla de reacción (5 $\mu$ L de amortiguador 5X, 1  $\mu$ L de dNTP (10 mM), 2  $\mu$ L de DTT (0.1M) y 1  $\mu$ L de Superscript II (200 U/ $\mu$ L). La mezcla se incubó 4 min a 37°C, 60 min a 42°C y 10 min a 80°C, a fin de obtener cDNA.

### **PCR Tiempo Real:**

Se utilizó el kit de detección LightCycler® TaqMan® Master para identificar y cuantificar secuencias de cDNA con las sondas de detección apropiadas.

Los iniciadores que se utilizaron fueron:

Receptor PRL humano (5' a 3') CTT TCC ACA TGA ACC CTG AAG

Receptor PRL humano (3' a 5') GCA GAT GCC ACA TTT TCC TT

$\beta$  actina (5' a 3') CCA ACC GCG AGAAGATGA

$\beta$  actina (3' a 5') CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG

El protocolo de detección fue el siguiente:

- Preincubación de 10 min. a 95 °C
- Amplificación 

{	Desnaturalización	10 s a 95 °C
	Alineamiento	30 s a 59 °C
	Extensión	1 s a 72 °C
- Enfriamiento 30 s a 40 °C

### **Identificación de citocinas en sobrenadante de cultivo por CBA:**

De los cultivos de células Te y Treg en las condiciones propuestas para los ensayos de proliferación antes descritos, se colectaron los sobrenadantes a las 48 h de cultivo, a fin de determinar el perfil de expresión de citocinas (Th1/Th2/Th17). Se preparó el estándar de citocinas a una concentración de 500pg/mL, por otro lado se realizó la mezcla adicionando 10µL de cada frasco de seis tipos de perlas (A1-A6) de tamaño uniforme con diferentes intensidades de fluorescencia. Se etiquetaron los tubos para realizar la curva y las pruebas, se adicionaron 50µL de la mezcla de perlas de captura, 50µL de reactivo de detección unido a ficoeritrina (PE) y 50µL de la muestra, se incubaron durante 3h a temperatura ambiente protegidas de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron con 300µL de buffer de lavado 1X, se centrifugaron a 1500rpm por 5 min. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

### **Identificación de TGF-β en sobrenadante de cultivo por ELISA:**

De los cultivos de linfocitos Te y Treg en las condiciones propuestas para los ensayos de proliferación antes descritos, se colectaron los sobrenadantes a las 48 h de cultivo a fin de determinar el perfil de expresión de TGF-β por la metodología de ELISA. Se agregaron 50 µL de diluyente de ensayo a cada pozo, se agregaron 50 µL de la muestra activa, se incubó por 2 horas. Se hicieron 4 lavados con buffer, se agregó 100 µL de conjugado a cada pozo se incubó por 2 horas. Se hicieron 4 lavados con buffer. Se agregó 100 µL de solución de sustrato a cada pozo y se incubó por 30 min protegiéndolo de la luz, posteriormente se le agregó a cada

pozo 100  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para detener la reacción. Se determinó la densidad óptica de cada pozo utilizando un lector de Elisa programado a 450 nm.

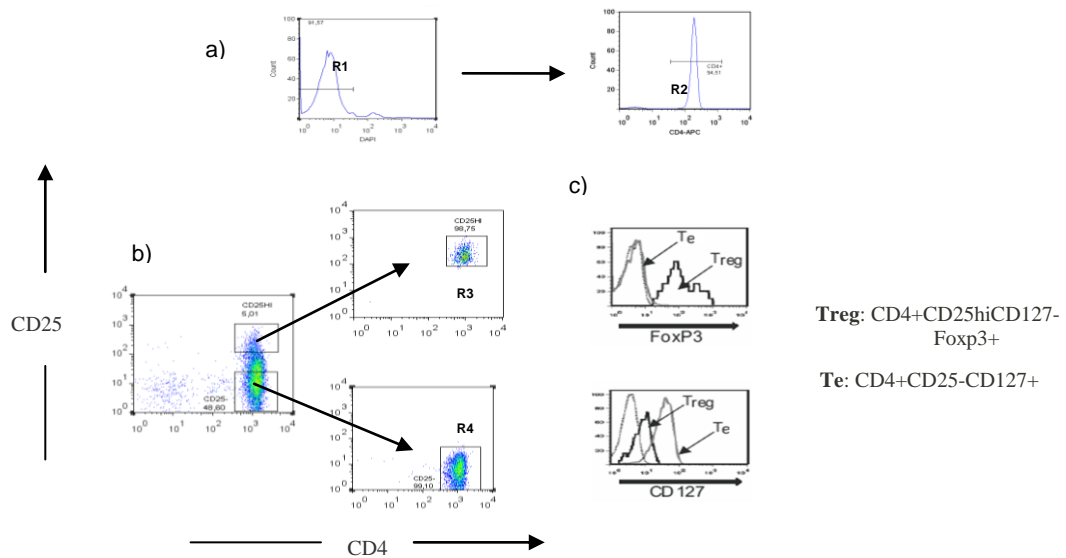
#### **Análisis estadístico:**

Los resultados se describieron de acuerdo a la distribución de los datos (media  $\pm$  error estándar). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad Shapiro Wilk. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante prueba de T de student. Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0.05$ . El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS 14.0 para Windows.

## RESULTADOS.

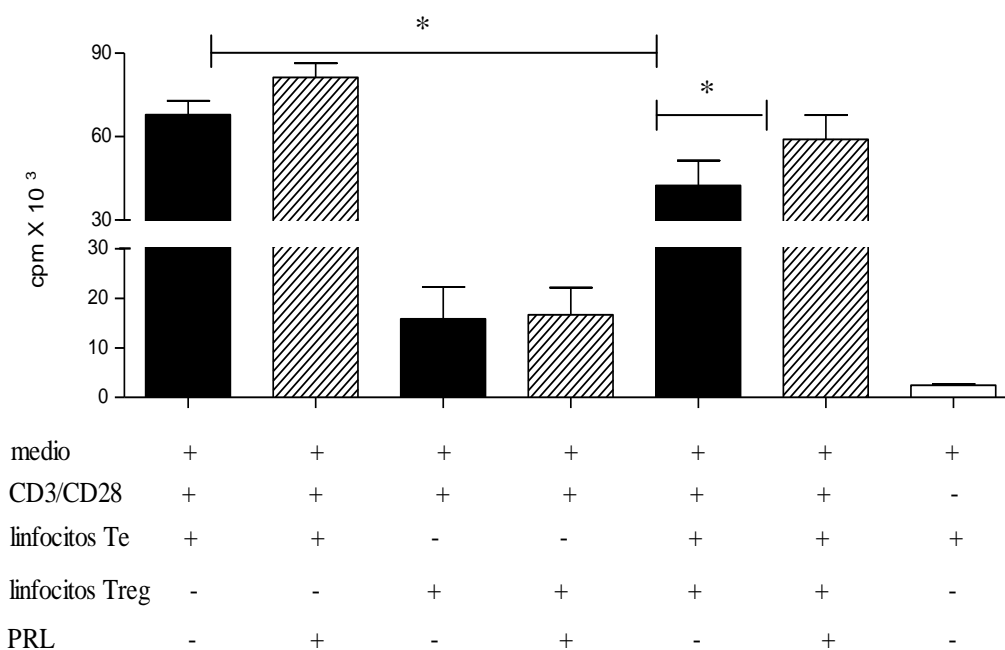
A partir de células mononucleares de sangre periférica se purificaron por selección negativa las células T CD4+ teniendo una pureza de 94.5 %, dichas células se marcaron con los siguientes anticuerpos: antiCD4, antiCD25, antiCD127, antiFoxP3 y con DAPI para purificar las poblaciones de células T efectoras (Te CD4+CD25-CD127+) y T reguladoras (Treg CD4+CD25+CD127-) por citometría de flujo.

A partir de la región 1 (R1) de células DAPI – (células viables), se obtiene la R2 que corresponde a los linfocitos T CD4+ con una pureza superior al 90% (Figura 5a). La figura 5b muestra la distribución de las células teñidas con antiCD4 y antiCD25 antes de la separación citométrica. En la figura 5c se muestra las R3 y R4 que corresponden respectivamente a las células T reguladoras (CD4+CD25+CD127-) y T efectoras (CD4+CD25-CD127+) después de la separación citométrica. La pureza obtenida en ambas poblaciones fue superior al 98%. Además, se utilizó una muestra de estas poblaciones para determinar la expresión de Foxp3. Las células Treg obtenidas son Foxp3+ como se aprecia en la figura 5c.



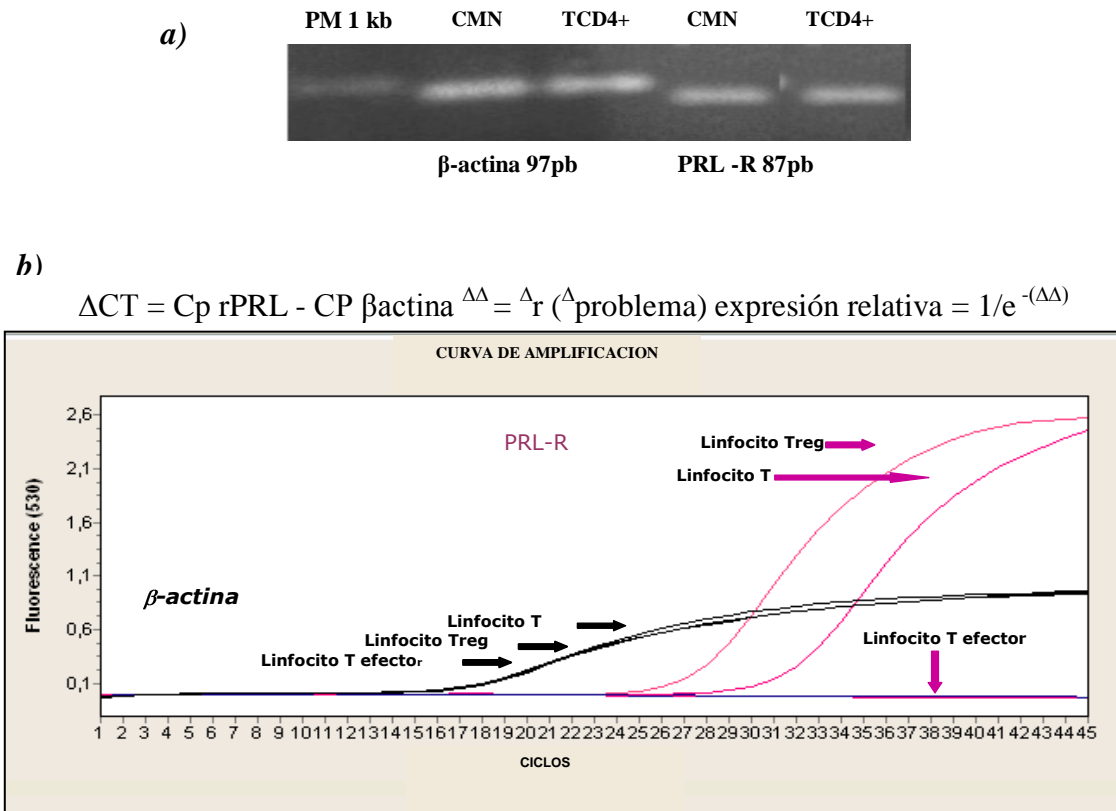
**Figura 5 -Purificación por fenotipo de las células CD4+CD25+CD127-FoxP3 (Treg) y CD4+CD25-CD127+ (Te).** Se purificaron los linfocitos T CD4+ de sangre periférica proveniente de mujeres sanas por selección negativa, para posteriormente purificar por citometría de flujo las subpoblaciones de linfocitos Treg y Te utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD4, CD25 y CD127 y FoxP3. 5a) A partir de las células DAPI- (R1) se seleccionó la región de linfocitos CD4+ (R2). 5b) Grafico de las células antes de la separación. 5c) Células después de la separación citométrica con el fenotipo correspondiente a Treg y T efectoras.

En la figura 6 se muestra la media  $\pm$  el error estándar de 6 ensayos independientes de proliferación de células Treg y Te en presencia o ausencia de prolactina, realizados cada uno por triplicado. Las células Te estimuladas con anticuerpos antiCD3 y CD28 proliferan de manera convencional. La adición de PRL al cultivo incrementa su proliferación aunque dicho incremento no es estadísticamente significativo. Por otro lado se confirmó la capacidad proliferativa limitada de las células Treg y al adicionarle PRL al cultivo no proliferan. Para demostrar el efecto supresor, las células Treg se cocultivaron con células T efectoras en una relación 1:2 y se estimularon con anticuerpos antiCD3 y antiCD28. Observamos una inhibición del 35.8 % en la proliferación celular con respecto a las células Te estimuladas con significancia estadística ( $p < 0.05$ ), al adicionar PRL a este cocultivo (Treg: Te) las células Te recuperaron su capacidad proliferativa respecto al cocultivo sin PRL ( $p < 0.05$ ).



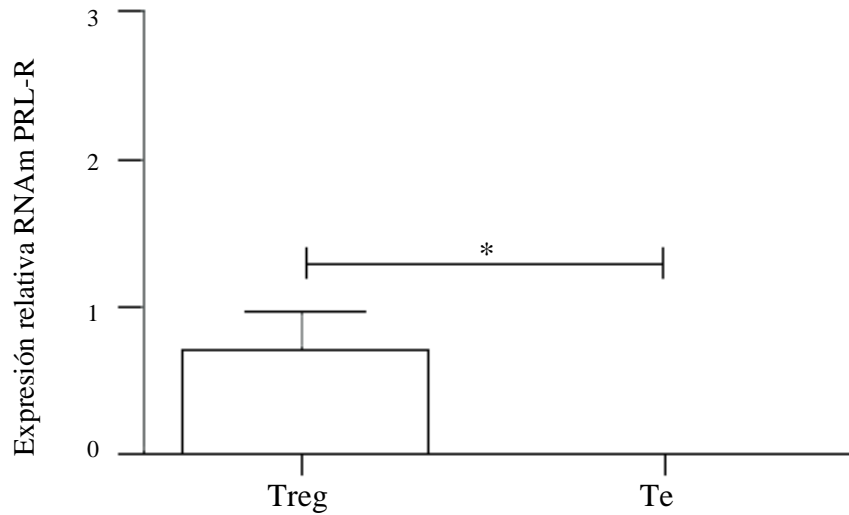
**Figura 6. Ensayos de proliferación de células Treg y Te en presencia o ausencia de prolactina.** Las células T efectoras (Te, CD4+CD25-CD127+) y T reguladoras (Treg, CD4+CD25+CD127-Foxp3+) se cultivaron en presencia o ausencia de prolactina estimulándolas con anticuerpos antiCD3 y CD28. La proliferación celular se evaluó a través de la incorporación de Timidina tritiada [TdH<sup>3</sup>] a las 120 horas de cultivo y se reportó como cpm. ANOVA \* $p < 0.05$ .

La expresión del RNAm del receptor de PRL se determinó en las células Treg y Te *ex vivo* a través de la técnica de PCR tiempo real. En la figura 7a se muestra la amplificación tanto de  $\beta$ -actina como del receptor de prolactina en células mononucleares y células T CD4+. Observamos en ambas poblaciones la banda de  $\beta$ -actina con un peso molecular esperado de 97 pb y el receptor de prolactina con un peso molecular de 87 pb. En la figura 7b se observan las curvas de amplificación obtenidas por PCR tiempo real con el programa Light cycler 4.0 para  $\beta$ -actina (control) y para el mensajero del PRL-R en las 3 poblaciones celulares estudiadas. 1) células T CD4+, 2) T reguladoras y c) T efectoras. En la figura 7c se muestra la gráfica de expresión relativa del RNAm del PRL-R. Donde demostramos que las células T reguladoras expresan dicho receptor de manera constitutiva a diferencia de las células T efectoras.



**Figura 7. Expresión de RNAm del receptor de prolactina en linfocitos T CD4+, T CD4+CD25+CD127- Foxp3+ y T CD4+CD25-CD127+.** 7a) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio mostrando la banda de expresión de  $\beta$  actina (97pb) y PRL-R (87pb) en células mononucleares y células T CD4+. 7b) Curvas de amplificación obtenidas con el programa Light cycler 4.0 para  $\beta$ -actina (control) y para el RNA mensajero del PRL-R en células T totales, T reguladoras y T efectoras (se graficaron los ciclos de amplificación contra la intensidad de fluorescencia)





**Figura 8. Expresión relativa del RNAm del receptor de prolactina (PRL-R) en células T ef (CD4+CD25-CD127+) y T reg. (CD4+CD25+CD127-) ex vivo.** Comparación de la expresión relativa del RNAm de prolactina entre las células Te y Treg en estado basal. t de student\*p<0.05

Las subpoblaciones de células Treg y Te fueron cultivadas en las distintas condiciones de nuestro modelo (Tabla 1), transcurridas 48 h se colectaron los sobrenadantes de cada condición de cultivo y se determinó el perfil de expresión de citocinas (Th1/Th2/Th17) utilizando la técnica de CBA (Cytometric Bead Array) y TGFβ por ELISA.

Tabla 1.- Condiciones de cultivo

<b>POZO</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>CONDICIÓN</b>							
CD3/CD28		+	+	+	+	+	+
PRL		-	+	-	+	-	+
Linfocitos Treg		-	-	+	+	+	+
Linfocitos Te		+	+	-	-	+	+

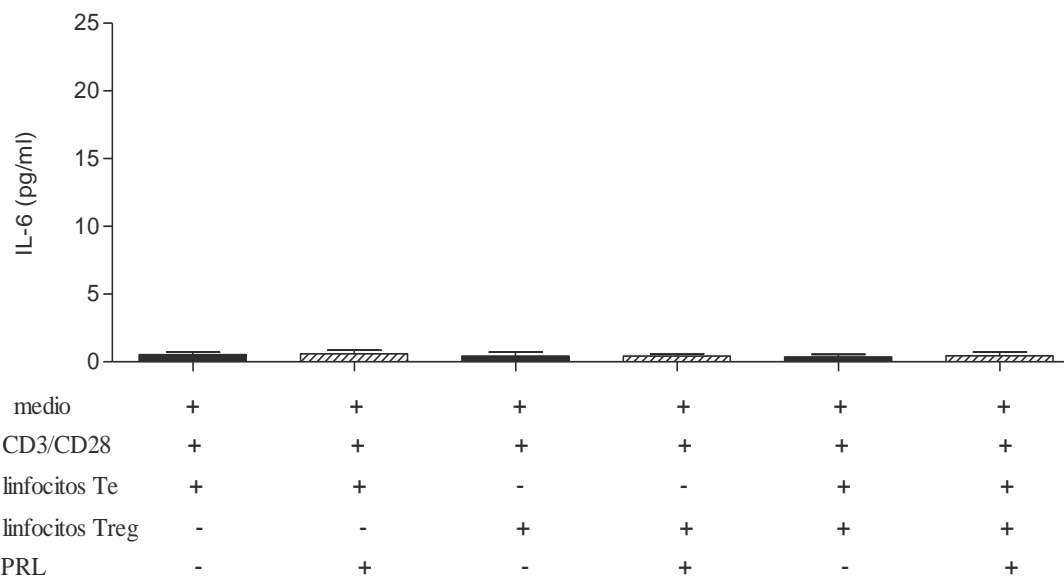
No encontramos diferencias en el patrón de secreción de IL-6, IL-10, IL-4 e IL-17 como se muestra en las figuras 9 y 10.

La figura 11a. No existe una diferencia significativa en la secreción de IL-2 cuando las células Te se incubaron con antiCD3/CD28 ( $14.75 \pm 4.6$  pg/mL) comparado con antiCD3/CD28 mas PRL ( $16.90 \pm 5.96$  pg/ mL) o cuando las células Te se cocultivaron con Treg en las mismas condiciones ( $15.56 \pm 6.53, 14.86 \pm 5.82$  pg/mL).

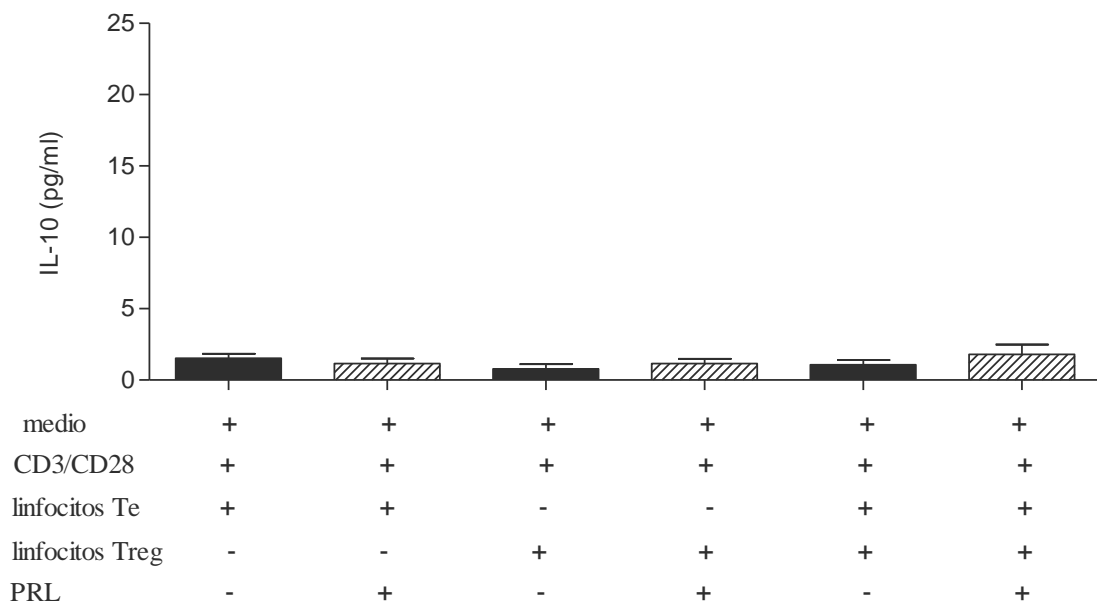
Respecto a TGF- $\beta$ , únicamente se detectó en los cocultivos de células Te: Treg ( $12.2 \pm 6$  pg/mL) y dicha concentración tiende a incrementar cuando a este cocultivo se le adiciona PRL ( $17 \pm 4.1$  pg/mL). Figura 11b.

La figura 12a muestra presencia de PRL aumenta la secreción de TNF en el cocultivo de células Treg/Te ( $4.432 \pm 0.7573$  vs  $6.504 \pm 0.3918$  pg/mL). En la figura 12b observamos que la concentración de IFN- $\gamma$  tiende a incrementar en presencia de PRL, (Te  $31.2 \pm 2.9$  pg/mL vs Te/PRL  $36.9 \pm 10$  pg/mL), aunque no encontramos diferencia estadísticamente significativa. Los cultivos de Treg y Treg/PRL tampoco presentan diferencia estadística ( $5.30 \pm 3.09$  pg/mL vs  $9.11 \pm 0.1694$  pg/mL). En el cocultivo de Treg: Te disminuyó la concentración de IFN- $\gamma$  respecto al cultivo de células Te ( $31.2 \pm 2.9$  vs  $23.60 \pm 8.05$ ). Sin embargo, al agregarle PRL a dicho cocultivo la concentración de IFN- $\gamma$  incrementa a más del doble (Te: Treg  $23.60 \pm 8.05$  pg/mL vs Te: Treg/PRL  $51.4 \pm 14.84$  pg/mL).

9a)

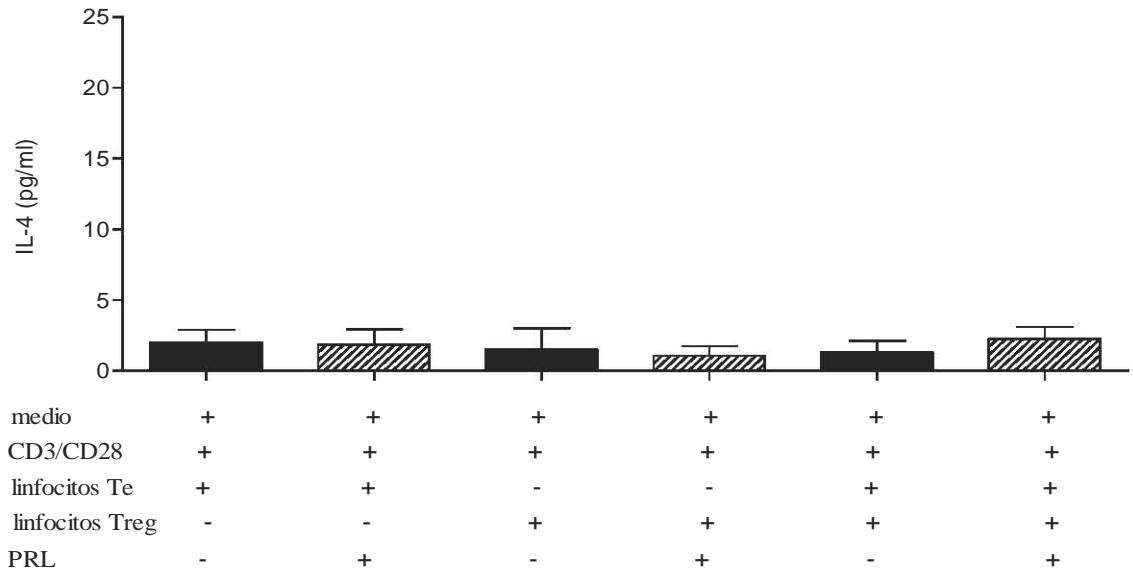


9b)

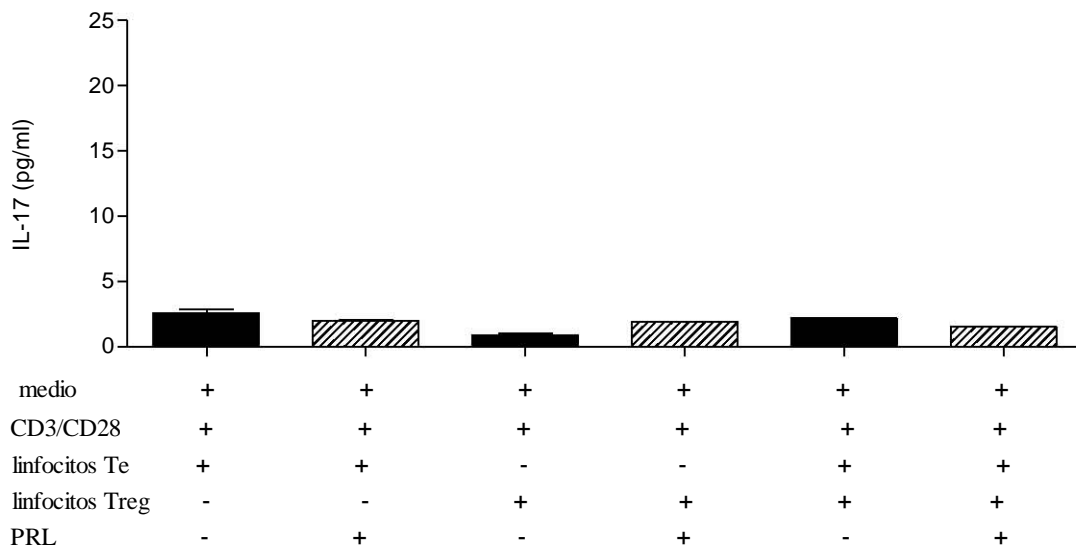


**Figura 9 Participación de la PRL en el perfil de secreción de citocinas Th1/Th2/Th17.** Se colectaron los sobrenadantes a las 48h de cultivo de linfocitos T efectores (CD4+CD25-CD127+) y Treg. (CD4+CD25+CD127-Foxp3) a fin de determinar el perfil de expresión de IL-6 e IL-10 utilizando la técnica de CBA (Cytometric bead array).

10a)

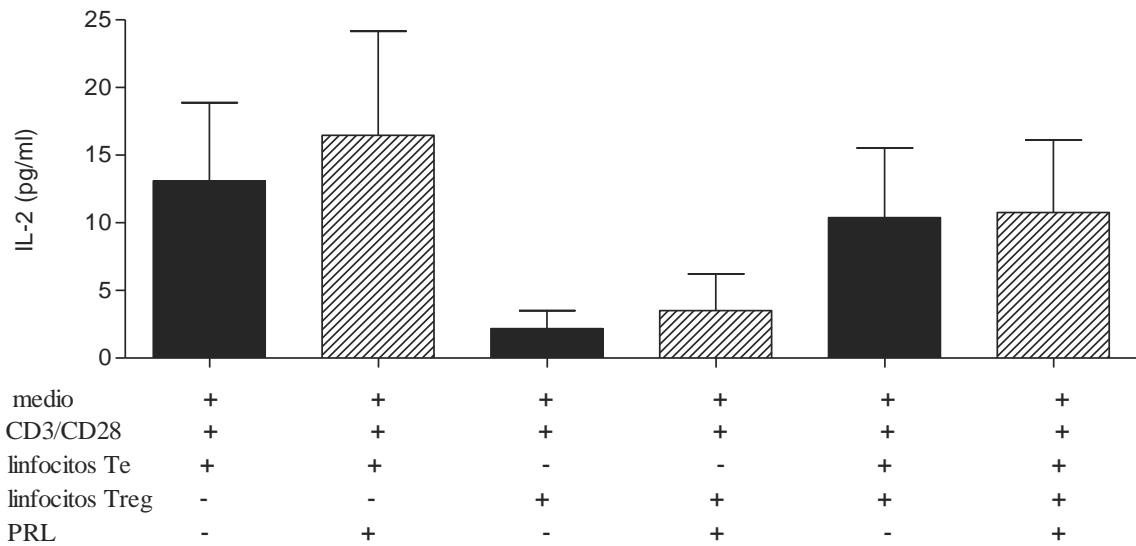


10b)

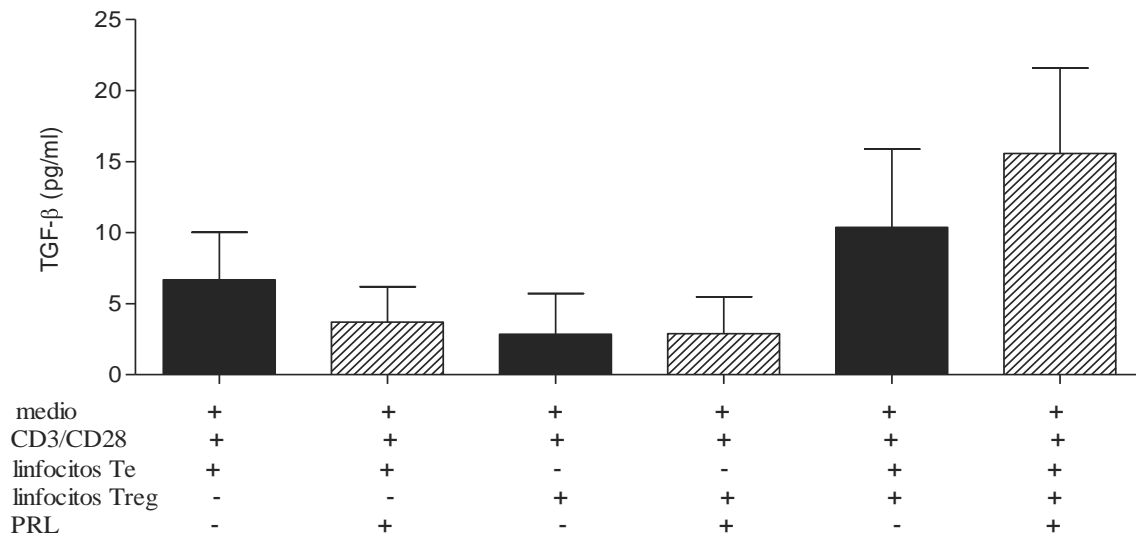


**Figura 10. Participación de la PRL en el perfil de secreción de citocinas Th1/Th2/Th17.** Se colectaron los sobrenadantes a las 48h de cultivo de linfocitos T efectores (CD4+CD25-CD127+) y Treg. (CD4+CD25+CD127-Foxp3) a fin de determinar el perfil de expresión de IL-4 e IL-17 utilizando la técnica de CBA (Cytometric bead array).

11a)

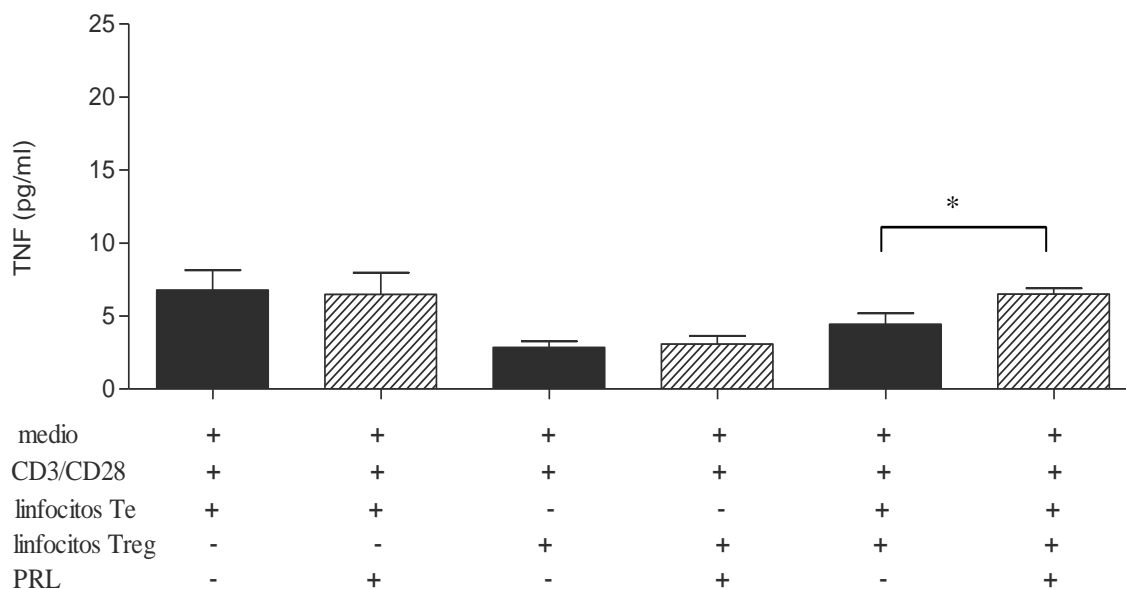


11b)

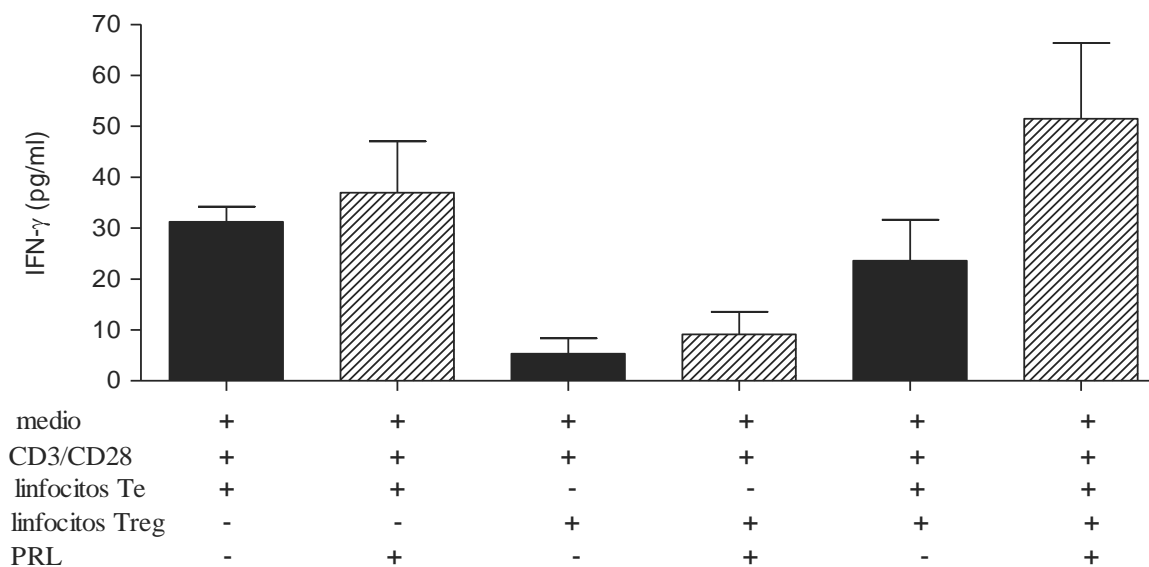


**Figura 12 Participación de la PRL en el perfil de secreción de citocinas Th1/Th2/Th17.** Se colectaron los sobrenadantes a las 48h de cultivo de linfocitos T efectores (CD4+CD25-CD127+) y Treg. (CD4+CD25+CD127-Foxp3) a fin de determinar el perfil de expresión de IL-2 y TGF- $\beta$  utilizando la técnica de CBA (Cytometric bead array) y ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).

12a)



12b)



**Figura 11. Participación de la PRL en el perfil de secreción de citocinas Th1/Th2/Th17.** Se colectaron los sobrenadantes a las 48h de cultivo de linfocitos T efectores (CD4+CD25-CD127+) y Treg. (CD4+CD25+CD127-Foxp3) a fin de determinar el perfil de expresión de TNF e IFN- $\gamma$  utilizando la técnica de CBA (Cytometric bead array). ANOVA \*P<0.05

## **DISCUSION DE RESULTADOS.**

En estudios previos se ha mostrado que PRL interviene en la proliferación y activación de células T, así como en la secreción de citocinas [47]. Sin embargo, no existen reportes acerca del efecto de PRL en los linfocitos T reguladores. Por lo que realizamos ensayos funcionales y observamos que prolactina interviene en la proliferación celular de los linfocitos T efectores tendiendo a incrementar, aunque no de manera significativa, la proliferación de los mismos en el cultivo de células activadas en presencia de prolactina. Por otro lado, la PRL afecta la regulación mediada por Treg, ya que como observamos en la figura 6, la adición de PRL al cocultivo Te: Treg es capaz de contrarrestar el efecto supresor ejercido por las células Treg y restablecer la capacidad de proliferación de las células efectoras. Por lo tanto podríamos pensar que PRL estaría actuando sobre las células T reguladoras inhibiendo alguno de sus mecanismos de supresión, o bien, sobre las células T efectoras ejerciendo un efecto protector en ellas, lo que les ayudaría a mantener su capacidad proliferativa aún en condiciones de supresión; Supuestos que sería adecuado evaluar en trabajos posteriores a fin de establecer el mecanismo de acción de PRL sobre el efecto supresor de la células Treg. Dichos resultados ayudarían a explicar la relación entre los estados hiperprolactinéimicos y el desarrollo o progresión de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple o lupus eritematoso sistémico [48, 49,50], donde pareciera haber una deficiencia funcional de las células T reguladoras [51, 52,53].

Por otro lado, se ha reportado la expresión de PRL y PRL-R en diversos sitios extrahipofisarios [3, 54,55]. No obstante, en este trabajo se demostró una diferencia sustancial entre las subpoblaciones de linfocitos Treg y Te respecto a la expresión del PRL-R, al encontrar que el RNAm del PRL-R está de manera constitutiva únicamente en la población de células Treg, a diferencia de las células Te donde no está presente. Esto podría indicar que la PRL está involucrada en eventos funcionales tempranos de células Treg.

El hallazgo del RNAm del PRL-R en esta población de células Treg sugiere el hecho de que PRL está vinculado en la regulación de la respuesta mediada por estas células.

Sabiendo que la PRL es considerada no sólo como una hormona, sino también como una citocina [5], analizamos si la PRL tiene alguna función en la modulación del perfil de secreción de citocinas Th1, Th2 y Th17. Y observamos que PRL no ejerce ningún efecto sobre la secreción de IL-6, IL-4, IL-17 y IL-10 en las condiciones de cultivo planteadas.

En nuestros resultados solo detectamos TGF- $\beta$  en los cocultivos de células Treg: Te activadas y observamos una tendencia a incrementar dicha concentración cuando se agrega PRL al cocultivo, pero sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Nuestros resultados sugieren que PRL favorece la secreción de TNF e IFN- $\gamma$  en el cocultivo de células Treg: Te al adicionar PRL. Y esto corresponde a la recuperación de la capacidad de proliferación de las células Te en las mismas condiciones de cultivo. Lo que concuerda con reportes previos (Valencia X, 2006) donde el incremento de TNF en el cultivo celular disminuye la función reguladora de las células Treg [56]. También se ha reportado que IFN- $\gamma$  inhibe la generación de la célula Treg *in vivo* [57].

Nuestros resultados sugieren que la PRL ejerce su función moduladora de la regulación favoreciendo la secreción de TNF e inhibiendo así la función supresora de Treg.



## CONCLUSIONES:

1. La expresión del RNA mensajero del PRL-R es constitutiva en las células Treg.
2. La PRL inhibe la regulación mediada por las células Treg.
3. La PRL favorece la secreción de TNF en el cocultivo Te:Treg.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

1. Bachelot A, and Binart N. 2007. Reproductive role of prolactin. *Reproduction*. 133:361–369.
2. Freeman M, Kanycska B, Lerant A, and Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiology*. 80:1523-1587.
3. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, and Kelly P.A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinology*. 19:225-268.
4. Méndez I, Cariño C, Díaz L. 2005. Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects. *Investigación Clínica*. 57:447-56.
5. Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, and Kelly P.A. 2005. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocrinology*. 26:400–422.
6. Nira Ben-Jonathan, Christopher R, and Elizabeth W. 2008. What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans?. *Endocrine*. 29:1–41.
7. Swaminathan G, Varghese B and Fuchs SY. 2008. Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast Cancer. *Mammary Gland Biology Neoplasia*. 13:81 91.
8. Keith W. Kelleyb, Douglas A. Weigentc, and Ron Kooijmand. 2007. Protein Hormones and Immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*. 21:384–392.
9. Yu-Lee L. 2009. Prolactin Modulation of immune and Inflammatory responses. *Recent Progress in Hormone Research*. 5:435-454.

10. Smith PE. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anatomical Record*. 47:119-129.
11. Nagy E, Berci I. 1978. Immunodeficiency in hipophysectomized rats. *Acta Endocrinology*. 89:530-537.
12. Nagy E, Berci I, Wren GE, Asa SL, Kovaks K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology*. 6:231-243.
13. Matera Lina. 1997. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *NeuroImmuno Modulation*. 4:171-180.
14. Spangelo BL, MacLeod RM. 1990. The role immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1:408-412.
15. Theas MS, De Laurentis A, Lasaga M, Pisera D, Duvilanski BH, Seilcovich A. 1998. Effect of lipopolysaccharide on tumor necrosis factor and prolactin release from rat anterior pituitary cells. *Endocrine*. 8:241-245.
16. Hartmann DP, Holaday JW, Bernton EW. 1989. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *The FASEB Journal*. 3:2194–202.
17. Montgomery DW, Zukoski CF, Shah GN, Buckley AR, Pacholczyk T, Russell DH. 1987. Concanavalin A–stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin–like bioactivity and immunoreactivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 145:692–8.
18. Carreño PC, Sacedón R, Jiménez E, Vicente A, Zapata AG. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *Journal Neuroimmunology*. 160:135-145.

19. Larrea F, Martínez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer Varela J, Queipo G, Cariño C. and Alarcón Segovia D. A. 1997. 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. *Clinical Endocrinology and Metabolism*. 82:3664-9.
20. Abbas AK. Lichtman AH. And Pober J. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B: Saunders Company. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania 494.
21. Afzali B, G. Lombardi, R. I. Lechler and G. M. Lord. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Immunology*. 48:32-46.
22. Curotto MA and Lafaille JJ. 2009. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*. 30:626-635.
23. Ramcés Falfán Valencia. 2002. Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 15 .48-53.
24. Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T and Hume D A. 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 75:163–189.
25. Doms H and. Abbas, A, K. 2010. Revisiting the role of IL-2 in autoimmunity. *European Journal of Immunology*. 40:1538–1540.
26. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. 2009. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Immunoregulation in Vascular Biology*. 102:215–222.
27. Craig L. M and Casey T. W. 2008. Diversity in the contribution of IL-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunology Rev*. 226:219–233.

28. Sanjabi S, Zenewics L.A, Kamatiaki M, Flavell R.A. 2009. Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in Immunity and Autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology*. 9:447–453.
29. Kips JC. 2001 Cytokines in asthma. *The European Respiratory Journal*. Supplement. 34:24-33.
30. Steinke JW. 2004 Anti-interleukin-4 therapy. *Immunology and allergy clinics of North America*. 24:599-614.
31. Martinez G, J, Nurieva R I, Yang X, O, and Chen Dong. 2008. Regulation and Function of Proinflammatory TH17 Cells. *New York Academy of Sciences*. 1143:188–211.
32. Sakaguchi S, Wing K and Miyara M. 2007. Regulatory T cells a brief history and perspective. *Immunology*. 37:116–123.
33. Milojevic D, Khoa Nguyen D, Wara D and Mellins E. D. 2008. Regulatory T cells and their role in rheumatic diseases: a potential target for novel therapeutic development. *Pediatric Rheumatology*. 20:1-20.
34. Le NT and Chao N. 2007. Regulating regulatory T cells. *Bone Marrow Transplantation*. 39:1-9.
35. Corthay A, 2009. How do Regulatory T cells Work? *Scand Journal of Immunology* 70:326-336.
36. Damoiseaux J. 2006 .Regulatory T cells: back to the future. *The Netherlands Journal of medicine*. 64:4-9.

37. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T and Ono M. 2008. Regulatory T cells and Immune Tolerance Cell. 133:775-787.
38. Mottet C, Golshayan D. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. Swiss Medical Weekly. 137:625–634.
39. Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y. 2006. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. Cell. 126:253-6.
40. Kenneth Murphy, Paul Travers, Mark Walport. Janeway's immunobiology 7th edition. Garland Science. 2008.
41. Zaragoza O P, Martínez A L, Madrid V M. 2001. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. Salud Pública México. 43:340-351.
42. Toda A and Piccirillo C. 2006. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. J Leukocyte Biology. 80:458–470.
43. Song Guo Zheng. 2008. The Critical Role of TGF- $\beta$ 1 in the development of induced Foxp3+ regulatory T cells. Clinical and Experimental Medicine. 1:192-202.
44. Wing K, Fehervari Z and, Sakaguchi S. 2006. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. International Immunology. 18:991-1000.
45. Hori S, Nomura T and Sakaguchi S. 2003 Control of Regulatory T cell development by transcription factor Foxp3. Science. 299:1057-1061.
46. Beissert S, Schwarz A and Schwarz T. 2006. Regulatory T cells. Investigative Dermatology. 126:15-24.

47. Chavez-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. *Clinical Immunology*. 116:182-191.
48. Jara LJ, Medina G, Saavedra MA, Vera-Lastra O, Navarro C. 2009. Prolactin and Autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 40:50-59.
49. Jara LJ, Benitez G, Medina G. 2008. Prolactin, dendritic cells, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 7:251-5.
50. Nociti V, Frisullo G, Tartaglione T, Patanella AK, Iorio R, Tonali PA, Batocchi AP. 2009. Multiple sclerosis attacks triggered by hyperprolactinemia. *Journal of neuro-oncology*. 98:407-9.
51. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. 2003. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*. 3:273-6.
52. Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. 2006. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 117:289-300.
53. Mudd PA, Teague BN, Farris AD. 2006. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Immunology*. 64:211-8.
54. Clevenger CV, Freier DO, and Kline JB. 1998. Prolactin receptor signal transduction in cell of the immune system. *Journal of Endocrinology*. 157:187-197.
55. Dardenne M, Leite de Morales MC, Kelly PA, and Gagnerault MC. 1994. Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytofluorometry. *Endocrinology*. 134:2108-14.

56. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. 108:253-61.

57. Caretto D, Katzman SD, Villarino AV, Gallo E, Abbas AK. 2010. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *Journal of Immunology*.184:30-4.



## **ANEXO 1**

### **HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

#### **CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION.**

Título del estudio:

**“MODULACIÓN DEL PERFIL DE CITOCINAS DE CÉLULAS T CD4+ ESTIMULADAS CON PROLACTINA”**

#### **OBJETIVO:**

Demostrar la participación de la prolactina en la producción de citocinas de las células T CD4+.

Sí consiento en participar sucederá lo siguiente:

Responderé a preguntas sobre mi historia clínica, que durarán aproximadamente 15 minutos.

Me extraerán sangre (30 ml aproximadamente) del brazo con una aguja, para hacer análisis de prolactina y otros.

#### **RIESGOS:**

La toma de muestra es la habitual (la aguja a veces produce una molestia que dura menos de un minuto, en ocasiones se produce un hematoma, pero esto ocurre con muy poca frecuencia), no se harán otros procedimientos más que la toma de sangre, por lo que no presenta mayor riesgo.

#### **CONFIDENCIALIDAD:**

Toda la información obtenida en este estudio será considerada confidencial y será usada solo a efectos de la investigación.

#### **DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR:**

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte en él.

#### **CONSENTIMIENTO:**

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

NOMBRE \_\_\_\_\_ FIRMA \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_

## APÉNDICE.

### Medio AIM-V Enriquecido (GIBCO BRL)

Glutamina 0.2M	1mL
Piruvato de sodio 100mM	1mL
Antibióticos100x	
Penicilina 10000U	1mL
Estreptomina 10ng/mL	1mL
Medio AIM-V	96mL

### PBS Tween 0.5% (Solución de lavado ELISA)

PBS 1X	1000 mL
Tween	0.5 mL

### **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** 1M ( ⊕ )

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40.33g
Agua destilada	300mL

### **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** 1M ( ⊕ )

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	52.25g
Agua destilada	250mL

### **REGULADOR DE FOSFATOS** 1M (⊕)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M	300mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	250mL

Mezclar los volúmenes (3:2) y ajustar el pH a 7.4 con la solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M restante.

### **PBS 10x:** (NaCl 1.5M,FOSFATOS 0.1M) (⊕)

NaCl	87.66g
Regulador de fosfatos 1M	100 mL
Agua destilada	aforar a 1L

Pesar el NaCl y disolverlo en aproximadamente 800 mL de agua destilada, agregar 100 mL de Regulador de fosfatos, ajustar a pH 7.4 y aforar a 1L con agua destilada.

**PBS 1X (⊖)**

Hacer una dilución 1:10 del PBS 10X con agua destilada. Ajustar el pH a 7.4

**PBS-BSA10%**

BSA	5g
PBS 1X	aforar a 50mL

**PBS-BSA 0.5%-EDTA2mM**

BSA	2000 $\mu$ L
EDTA 500mM	200 $\mu$ L
PBS 1X	aforar a 50mL

**PBS-p-FORMALDEHÍDO 1% (⊖)**

p-FORMALDEHÍDO	1 g
PBS 1X	aforar 100mL

Calentar previamente el PBS hasta aproximadamente 56 °C, agregar el p-formaldehído, ajustar el pH a-7.4 y aforar a 100 mL

**SHEAT FLUID 10X ( ⊖ )**

NaCl	81.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.6g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	23.5g
KCl	2.8g
EDTA Na <sub>2</sub>	3.6g
LiCl	4.3g
Agua destilada	aforar a 1L

**Pesar cada una de las sales, disolver en agua destilada y mezclar, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1L.**

(⊖) Todas las soluciones se filtran al vacío en membranas de 0.22  $\mu$ m (msi micron separatis inc).