



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

“Expresión del receptor de prolactina en linfocitos B de médula ósea en ratones que desarrollan una enfermedad similar a lupus”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA:
ROCIO FLORES FERNANDEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: Rodolfo Pastelin Palacios
VOCAL: Profesor: Constantino III Roberto López Macías
SECRETARIO: Profesor: Adriana Karina Chávez Rueda
1er. SUPLENTE: Profesor: Enrique Ortega Soto
2º SUPLENTE: Profesor: Julio César Martínez Álvarez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (150766) y del Fondo de Investigación en Salud (IMSS/PROT/609/767)

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Adriana Karina Chávez Rueda

SUSTENTANTE:

Rocío Flores Fernández

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Karina Chávez Rueda por la oportunidad que me ha brindado para trabajar con ella. Por dedicarme su tiempo, paciencia y conocimiento para la realización de mi tesis. Y por ser mi ejemplo de mujer trabajadora, inteligente y triunfadora.

Al Dr. Francisco Blanco por sus sugerencias y comentarios para la mejora de mi trabajo.

A la Dra. Victoria y al Dr. Luis por el apoyo y enseñanzas brindadas.

A la Dra. Lourdes Arriaga por el conocimiento y tiempo brindado en el citómetro.

Al Dr. Rafael Hernández González por su colaboración en el mantenimiento de las cepas de ratones usadas.

A los miembros de mi jurado: Dr. Rodolfo Pastelin y Dr. Constantino III López Macías por los comentarios acertados que hicieron para la mejora de este trabajo.

A mis profesores de la Facultad de Química: Dr. José Sullivan y Dr. Mario Moreno por enseñarme el maravilloso mundo de la inmunología.

A mis compañeros del laboratorio de inmunología: Lalo, Esteban, Edgar, Liliana por brindarme su amistad.

A mis amigos: Monse, Karina, Andrea, Karen, Monserrat, Lupe, Shadani por compartir conmigo tantas experiencias a lo largo de la carrera.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi familia: a mis padres y hermano por ser mi mayor sostén y permitirme cumplir esta meta.

A mi papá porque en todo momento he contado con sus sabias y alentadoras palabras que me han permitido llegar a la culminación de mi carrera. Porque en todo momento me ha apoyado y por ser la persona que más admiro.

A mi mamá que siempre se ha mantenido apoyándome. Por sus palabras que siempre me han permitido seguir adelante a pesar de las circunstancias.

A mi hermano Ramón que aun a pesar de las diferencias que hemos tenido, siempre he contado con su apoyo y cariño.

El haber logrado culminar esta meta, fue gracias a que siempre hemos permanecido juntos. Todo el gran esfuerzo y sacrificios, se ven ahora reflejados en la finalización de este trabajo. Muchas gracias por todo.

INDICE	pág.
Índice de figuras	i
Abreviaturas	ii
Resumen	1
Introducción	2
Justificación e Hipótesis	16
Objetivos	17
Material y métodos	18
Diagrama de flujo	24
Resultados	25
Discusión	32
Conclusiones	36
Perspectivas	37
Referencias	38
Anexo	44

INDICE DE FIGURAS

Figura		pág.
Figura 1	Ontogenia del linfocito B	2
Figura 2	Recombinación de los genes de la inmunoglobulina	3
Figura 3	Mecanismos de tolerancia	5
Figura 4	Procesamiento del gen de la PRL	9
Figura 5	Estructura tridimensional de la PRL	10
Figura 6	Inducción de hiperprolactinemia	10
Figura 7	Receptor de PRL	12
Figura 8	Unión de la PRL a su receptor	12
Figura 9	Efectos de la PRL en los linfocitos B	15
Figura 10	Expresión del receptor de PRL en linfocitos B	25
Figura 11	Purificación de los estadios de maduración del linfocito B	26
Figura 12	Expresión del receptor de PRL en la cepa control	27
Figura 13	Expresión del receptor de PRL en cepas que desarrollan lupus	28
Figura 14	Manifestaciones de LES en ratones con hiperprolactinemia	30
Figura 15	Expresión del receptor de PRL en hiperprolactinemia	31

ABREVIATURAS

BCR	Receptor de linfocito B
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CD	Molécula de diferenciación
DNA	Acido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FACS	Citometría de flujo (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FO	Linfocito B folicular
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
Ig's	Inmunoglobulinas
IgH	Cadena pesada de la inmunoglobulina
IgL	Cadena ligera de la inmunoglobulina
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferón gama
Kb	Kilobase
LES	Lupus eritematoso sistémico
MZ	Linfocito B de zona marginal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PRL	Prolactina
Pro-B	Linfocito pro-B
Pre-B	Linfocito pre-B
Pre-BCR	Receptor de linfocito pre-B
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
SLC	Cadena subrogada
TNF	Factor de necrosis tumoral
T1	Linfocito B transitorio 1
T2	Linfocito B transitorio 2
T3	Linfocito B transitorio 3

RESUMEN

Introducción. La ontogenia del linfocito B inicia en médula ósea y finaliza en bazo. A lo largo de este proceso existen mecanismos de tolerancia encargados de la eliminación de clonas auto-reactivas. La falla en estos mecanismos contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES). LES afecta predominantemente a mujeres en edad reproductiva, este predominio hacia el sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de las hormonas, como la prolactina (PRL). En ensayos clínicos se han descrito que concentraciones séricas altas de PRL correlacionan con mayor actividad de la enfermedad. Para entender mejor la patología de LES se han utilizado distintas cepas de ratones (NZB/NZW, MRL, MRL/lpr). A los cuales al inducirles un estado de hiperprolactinemia exacerbaban la enfermedad, además se ha observado que en las distintas poblaciones de linfocitos B de bazo se expresa el receptor de PRL, siendo mayor en los linfocitos B T1 (más inmaduros) y menor en los maduros.

Objetivo. Determinar la expresión del receptor de PRL en los distintos estadios del linfocito B de médula ósea de las cepas C57BL/6, MRL/lpr y MRL, antes y después de inducir un estado de hiperprolactinemia.

Material y Métodos. Se emplearon ratones de 9 semanas de edad de las siguientes cepas: C57BL/6, MRL y MRL/lpr, se trataron durante 6 semanas con metoclopramida para inducir hiperprolactinemia. Se determinó la expresión del receptor de PRL en los distintos estadios de los linfocitos B de médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros), a nivel de mRNA mediante PCR tiempo real y a nivel de proteína mediante citometría de flujo.

Resultados y Discusión. Los estadios de maduración del linfocito B de médula ósea (pro-B, pre-B, inmaduros) expresan el receptor de PRL a nivel de mRNA y de proteína. El estadio de menor diferenciación de los linfocitos B (pro-B) es el que expresa mayor cantidad del receptor de PRL. Con hiperprolactinemia la expresión del receptor de PRL se incrementó solo en los linfocitos pro-B de las cepas que desarrollan lupus, siendo más evidente en la cepa MRL/lpr. **Conclusión.** Estos resultados sugieren una participación de la PRL y de su receptor en el proceso de maduración de los linfocitos B, que podría asociarse a la aparición de la enfermedad.

INTRODUCCION

Maduración de los linfocitos B

La ontogenia del linfocito B comienza en médula ósea, en donde las células madres hematopoyéticas pasan por diferentes estadios hasta llegar a linfocitos B inmaduros los cuales salen a la periferia y llegan a bazo donde terminan su maduración (figura 1). Los distintos estadios de maduración del linfocito B se pueden diferenciar por la expresión de moléculas de superficie (fenotipo) y por la recombinación de genes de las inmunoglobulinas (Ig's), cadena pesada (IgH) y ligera (IgL) (Kindt y col., 2007).

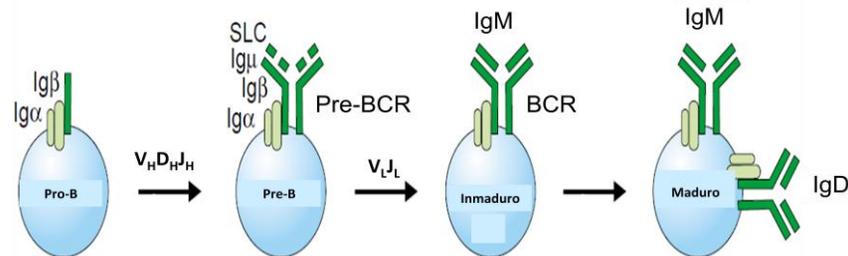


Figura 1. Ontogenia del linfocito B. A lo largo del proceso de maduración de los linfocitos B se dan los distintos re-arreglos de las cadenas de inmunoglobulina IgH y IgL para dar origen al BCR. (Kurosaki, 2002).

El locus de las cadenas ligeras (κ y λ) y pesada se encuentran en distintos cromosomas. En el ratón el locus para la cadena ligera λ se encuentran en el cromosoma 16, para κ en el 6 y en el 12 para la cadena pesada. Durante la maduración del linfocito B se lleva a cabo el re-arreglo de genes para dar origen a las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (Murphy y col., 2008). Estas cadenas están formadas por regiones variables y constantes. La región variable de las cadenas ligeras (κ y λ) están formadas por las familia de genes V y J, mientras la región variable de la cadena pesada está compuesta por las familias V, D y J. El re-arreglo de genes de la región variable ocurren en una secuencia ordenada durante la maduración del linfocito B en médula ósea, este proceso es mediado por las proteínas RAG-1 y RAG-2 (del Inglés recombinase activating gene 1 and 2), que tienen actividad de recombinasa (Kindt y col., 2007; Murphy y col., 2008) (figura 2).

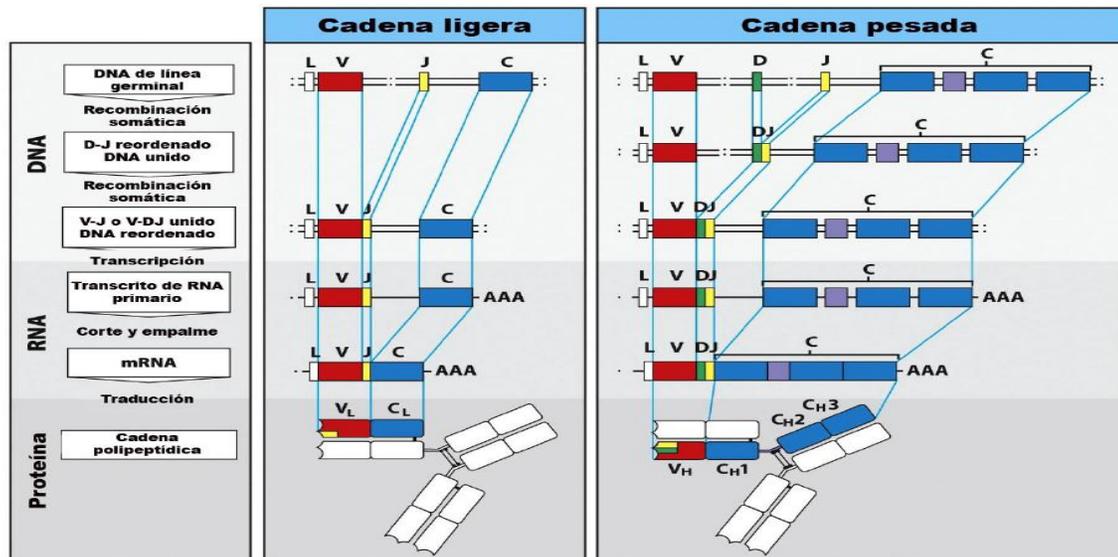


Figura 2. Recombinación de los genes de la inmunoglobulina. Re-arreglos de los segmentos génicos VDJ en la cadena IgH y de los segmentos génicos VJ en la cadena IgL para la formación del receptor de linfocito B (BCR) (Murphy y col., 2008).

La maduración del linfocito B inicia con el estadio de maduración denominado pro-B, en el cual se lleva a cabo la recombinación de la región variable de la cadena pesada (IgH), la primera recombinación es entre los segmentos génicos D_H y J_H (D_HJ_H) en ambos alelos, seguida de la recombinación del fragmento V_H con D_HJ_H en un solo alelo, posteriormente se une la parte constante (μ) por un mecanismo de “splicing” alternativo (Kurosaki, 2002). Cuando IgH ha sido exitosamente expresada, se asocia con las proteínas de señalización $Ig\alpha$ (CD79a) e $Ig\beta$ (CD79b) y la cadena ligera subrogada ($\lambda 5$ y V_{pre-B}), generando el receptor de antígeno del linfocito pre-B (pre-BCR) que marca la última fase del linfocito pro-B. Este estadio de maduración se caracteriza por presentar un fenotipo $B220^+CD93^+IgM^-CD43^+CD25^-CD22^-CD23^-$ (Martensson y col., 2007; Martensson y col., 2010). El segundo estadio de maduración del linfocito B, se denomina pre-B, el cual expresa en su superficie el pre-BCR que junto con el receptor de IL-7 inducen la proliferación de los linfocitos pre-B para aumentar el número de células que tienen éxito en la recombinación de los segmentos génicos de IgH. Además, la señalización del pre-BCR es importante para comenzar la recombinación de los segmentos génicos de la cadena ligera (IgL), la recombinación se da entre los segmentos V_L y J_L (V_LJ_L), paso importante para continuar con la diferenciación del linfocito B (Herzong y col., 2009; Martensson y

col., 2007). Los linfocitos pre-B presentan el siguiente fenotipo B220⁺CD93⁺IgM⁻CD43⁻CD25⁺CD22⁺CD23⁻ (Martensson y col., 2010). Al recombinarse exitosamente la cadena IgL se une a la cadena IgH (cadena μ) más Ig α e Ig β para formar el BCR (isotipo IgM) que se expresa en la superficie celular, lo cual da origen al último estadio de maduración del linfocito B en médula ósea, conocido como linfocito B inmaduro. El cual se caracteriza por el siguiente fenotipo B220⁺CD93⁺IgM⁺CD43⁻CD25⁻CD22⁺CD23⁻ (Hardy y Hayakawa, 2001; Kurosaki, 2002).

Los linfocitos B inmaduros salen a la periferia y migran a bazo para terminar su maduración convirtiéndose en linfocitos B maduros (foliculares o de zona marginal). Para diferenciar a los linfocitos B inmaduros que se encuentran en médula ósea de los que viajan hacia bazo se ha utilizado el término de linfocito B transitorio (T), estos se diferencian de los maduros por tener una vida media corta y expresar el marcador AA4 (CD93). Existen al menos tres distintos estadios de linfocitos B transitorios, los T1 (B220⁺CD93⁺IgM^{hi}CD23⁻), los T2 (B220⁺CD93⁺IgM^{hi}CD23⁺) y los T3 (B220⁺CD93⁺IgM^{low}CD23⁺) (Allman y Pillai, 2008; Thomas y col., 2006;)

Mecanismos de tolerancia.

A lo largo del proceso de ontogenia del linfocito B, existen diversos puntos de control que tienen como finalidad mantener la tolerancia. Siendo esta el conjunto de mecanismos que se encargan de la eliminación de las clonas auto-reactivas. Se clasifica en tolerancia central y periférica; la primera ocurre en órganos linfoides primarios, mientras que la segunda en órganos linfoides secundarios (Kindt y col., 2007).

Los mecanismos de tolerancia son determinados por la afinidad del BCR por el antígeno, así como por la señalización del BCR, ocurren tanto a nivel de médula ósea como en órganos linfoides secundarios (Basten y Silveira, 2010). Estos mecanismos son: edición del receptor (cambiando la especificidad del fragmento

variable de la cadena IgH o IgL, reemplazando las cadenas auto-reactivas), delección clonal (eliminación de clones auto-reactivos por apoptosis) y anergia (no respuesta de las clones auto-reactivas) (Basten y Silveira, 2010; Pillai y col., 2011; Tussiwand y col., 2009). (figura 3).

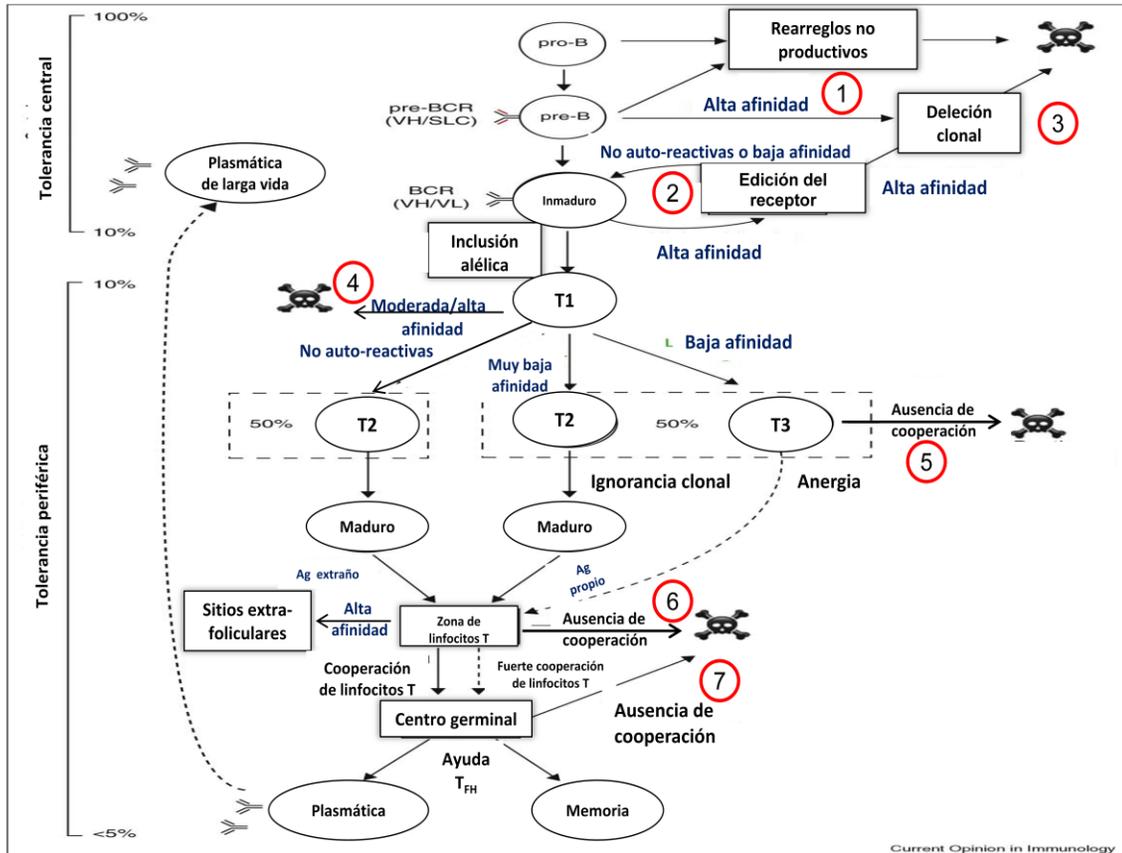


Figura 3. Mecanismos de tolerancia. El 90% de los linfocitos B auto-reactivos son eliminados en médula ósea (tolerancia central), el 10% restante es eliminado en órganos linfoides secundarios (tolerancia periférica). 1) Linfocitos pre-B que expresan pre-BCR auto-reactivo son eliminados por delección clonal. 2) Linfocitos B inmaduros que expresan BCR con alta afinidad por auto-antígenos experimentan edición del receptor para disminuir su auto-reactividad. 3) Linfocitos B inmaduros que continúan expresando BCR auto reactivo son eliminados por delección clonal. 4) Linfocitos B T1 que reconocen auto-antígenos con moderada o alta afinidad experimentan delección clonal. 5) Linfocitos B T1 que reconocen auto-antígenos con baja afinidad permanecen en un estado de anergia. 6) Linfocitos B T1 que reconocen auto-antígenos con muy baja afinidad permanecen en ignorancia clonal y pueden ser eliminados por delección. 7) Linfocitos B maduros en ausencia de cooperación por parte de los linfocitos T experimentan delección (Basten y Silveira, 2010).

En médula ósea la tolerancia central está determinada por los mecanismos de edición del receptor (mecanismo predominante) y delección clonal (Basten y Silveira, 2010). Se han descrito dos puntos de control en médula ósea para la eliminación de

clonas de linfocitos B auto-reactivas. El primero de ellos ocurre en el paso de linfocito pro-B a pre-B, el cual es regulado por el pre-BCR. En condiciones fisiológicas la formación del pre-BCR resulta en la selección positiva de los linfocitos pre-B en los cuales el rearreglo de la cadena pesada ha sido productivo, pero si el pre-BCR reconoce a un antígeno propio con alta afinidad (expresa cadenas pesadas potencialmente auto-reactivas) estos linfocitos pre-B son eliminados por delección clonal (Pillai y col., 2011). El segundo punto de control ocurre en la transición del estadio pre-B al estadio de linfocito B inmaduro y es mediado por la señalización del BCR, el reconocimiento con alta afinidad del BCR con antígenos propios da como resultado el mecanismo de edición del receptor (Pillai y col., 2011).

Solamente el 10% de los linfocitos B inmaduros salen a la periferia como linfocitos B transitorios-1 (T1), los cuales migran al bazo donde pueden encontrar otros auto-antígenos que no se encuentran en médula ósea. Así las clonas auto-reactivas que escapan de médula ósea son sometidas a mecanismos de tolerancia periférica (Basten y Silveira, 2010). El primero punto de control ocurre en los linfocitos B transitorios, en la transición de T1 a T2, en el cual se evita que clonas auto-reactivas continúen el proceso de maduración mediante los mecanismos de delección clonal y/o anergia (Pillai y col., 2011). Todos aquellos linfocitos T1 que mediante el BCR interactúen con alta afinidad con auto-antígenos, serán eliminados por delección clonal. Mientras que todos aquellos que interactúen con baja afinidad permanecerán en anergia (Basten y Silveira, 2010). Finalmente los linfocitos B maduros también son sometidos a mecanismos de tolerancia.

La falla en algún punto de control para eliminar las clonas auto-reactivas contribuye al desarrollo de autoinmunidad y/o enfermedad autoinmune (Meffre y Wardemann, 2008; Von Boehmer y Melchers, 2010), como en el caso de lupus eritematoso sistémico (LES), en donde se ha demostrado una falla en la tolerancia tanto en pacientes (Yurasov y col., 2005; Yurasov y col., 2006), como en ratones (Basten y Silveira, 2010; Lamoureux y col., 2007).

Lupus Eritematoso Sistémico

Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida que puede afectar prácticamente cualquier órgano o sistema del organismo (Lipsky, 2001). Los pacientes con LES presentan defectos en la tolerancia (central y periférica) (Meffre y col., 2008; Von Boehmer y col., 2010) dando lugar a la aparición de clonas auto-reactivas tanto de linfocitos T como de B, estos linfocitos presentan anormalidades en su activación, producción de citocinas y diferenciación a células de memoria. Además, existe una hiperactividad por parte de los linfocitos B que se identifica por la presencia de auto-anticuerpos, dirigidos contra diversas moléculas del núcleo como el DNA, RNP, Ro, La, histonas, etc., los cuales pueden formar complejos inmunes que con frecuencia salen de circulación y se depositan en el riñón, piel, cerebro entre otros tejidos causando inflamación y daño tisular (Lipsky, 2001; Grammer y Lipsky, 2003).

Se desconoce la etiología de LES. Sin embargo, se considera una enfermedad multifactorial en la cual los aspectos genéticos, ambientales hormonales e inmunológicos tienen una estrecha interacción para que se desarrolle autoinmunidad y se exprese clínicamente la enfermedad (Grammer y Lipsky, 2003; Petri, 2008). LES afecta predominantemente a mujeres (con una relación mujer:hombre de 10:1) en edad reproductiva, este predominio hacia el sexo femenino se ha atribuido a las propiedades inmunoestimuladoras de las hormonas, como la prolactina (PRL). LES tiene una tendencia a presentarse o bien a exacerbarse durante el embarazo cuando se encuentran elevados los niveles séricos de PRL. Los niveles séricos elevados de PRL se han asociado con la actividad de la enfermedad (Blanco y col., 1999; Leaños y col., 2001).

Se han empleado distintas cepas de ratones para entender los aspectos relevantes de la patogenia de LES. Estas cepas son NZBxNZW F₁, BXSB, MRL y MRL-FAS^{lpr} (MRL/lpr), que tiene la característica de desarrollar espontáneamente una enfermedad semejante a lupus en humanos (Andrews y col., 1978; Furukawa y Yoshimasu, 2005). La cepa MRL/lpr, tiene una mutación en la molécula FAS y se

caracteriza por presentar glomerulonefritis, depósitos de complejos inmunes, vasculitis, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia y producción de anticuerpos anti-nucleares principalmente dirigidos contra DNA de doble cadena (dsDNA). Estas manifestaciones de la enfermedad comienzan a aparecer a las 12 semanas de edad, la vida media de esta cepa es de 25 semanas. Mientras que la cepa MRL no presenta la mutación en FAS y la enfermedad aparece más tardíamente y es menos agresiva (Watanabe y col., 1992; Adachi y col., 1996).

Prolactina (PRL)

La PRL es una hormona sintetizada y secretada por la hipófisis anterior y, de forma extra-hipofisiaria por endometrio, médula ósea, bazo, células epiteliales mamarias, linfocitos T y B entre otros (Bole-Feysot y col., 1998). En base a sus propiedades genéticas, estructurales y funcionales, la PRL pertenece a la familia de la hormona del crecimiento y del lactógeno placentario, los cuales provienen de un gen ancestral en común. El gen que codifica para la PRL en el ratón se localiza en el cromosoma 13 y en el humano en el cromosoma 6, tiene un tamaño de 10Kb y está compuesto por 5 exones y 4 intrones (Freeman y col., 2000). La transcripción de este gen es regulada por dos regiones promotoras diferentes; la región proximal se encarga de la expresión hipofisiaria, mientras que la otra región se encarga de la expresión extra-hipofisiaria (figura 4).

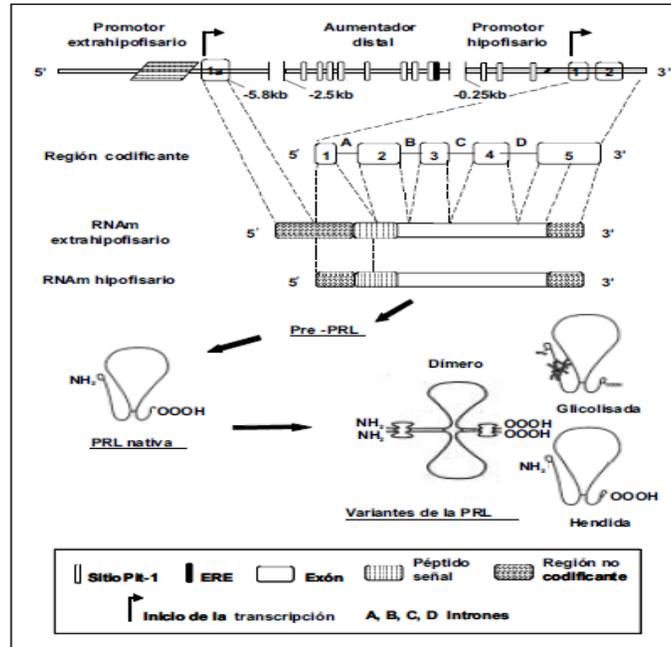


Figura 4. Procesamiento del gen de la PRL. Estructura del gen de la prolactina mostrando las regiones codificantes y no codificantes, los sitios de inicio y los productos de la transcripción de los promotores hipofisario y extrahipofisario. También se muestra el producto de la traducción y algunas de las variantes de la prolactina (Ben-Jonathan y col., 1996).

El gen de la prolactina da origen a una proteína globular compuesta por 199 aminoácidos, formada por 4 α -hélices, con tres puentes disulfuro y dos sitios de unión para el receptor de PRL (figura 5). Existen diferentes isoformas de la PRL, la principal en hipófisis y suero tiene un peso molecular de 23kDa (Bole-Feysot y col., 1998). Se han descrito otras isoformas como la glicosilada (25 kDa) con menor actividad biológica, una pequeña de 16 kDa implicada en el proceso de angiogénesis (Piwnica y col., 2006), 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) (Bole-Feysot y col., 1998; Leños y col., 2001). Estas isoformas resultan de distintos mecanismos como: splicing alternativo, rompimiento proteolítica y modificaciones post-traduccionales (dimerización, polimerización, fosforilación, glicosilación, sulfonación) (Freeman y col., 2000).

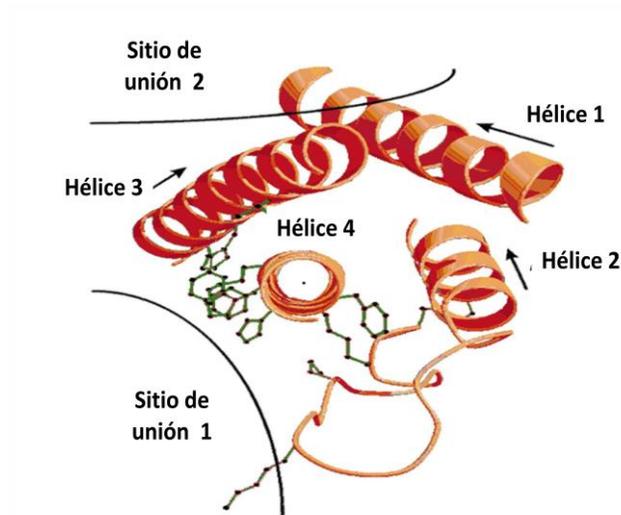


Figura 5. Estructura tridimensional de la PRL. La estructura tridimensional de la PRL está conformada por 4 α -hélices unidas mediante puentes disulfuro, formando dos sitios de unión para el receptor de PRL (Bole-Feysot y col., 1998).

La PRL puede actuar de forma paracrina y/o autocrina. Su liberación es estimulada por serotonina, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo y por diferentes fármacos como la domperidona y metoclopramida, es inhibida por dopamina y por sus agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina (Bernichtein y col., 2010) (figura 6).

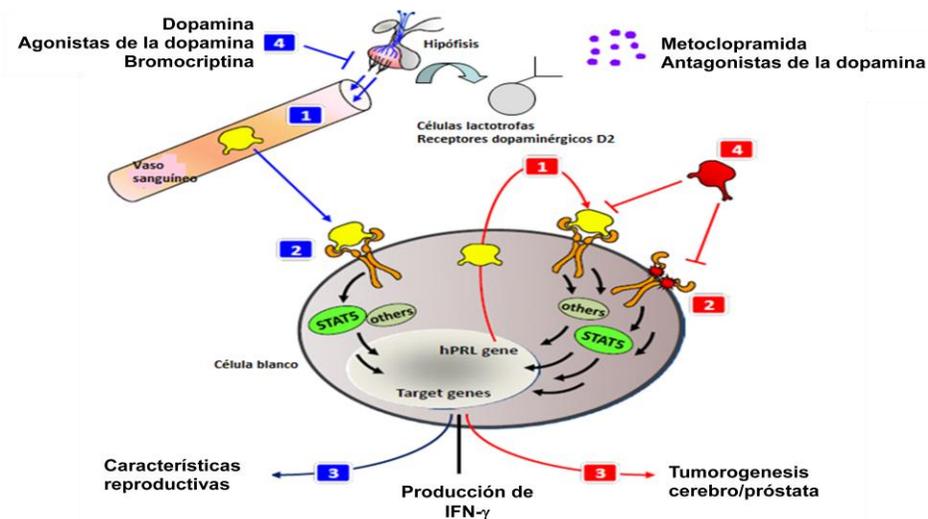


Figura 6. Inducción de hiperprolactinemia. La metoclopramida actúa sobre las células lactótropas de la hipófisis bloqueando los receptores dopaminérgicos D2 e induce la liberación de PRL, la cual llega a las células que expresan el receptor de PRL para ejercer su efecto. (Bernichtein y col., 2010).

Actualmente se conocen más de 300 diferentes funciones de la PRL, las cuales se pueden clasificar en cinco categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) crecimiento y desarrollo, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos e 5) inmunoregulación, cada una de estas funciones dependerá del tipo celular en donde se exprese su receptor (Bole-Feysot y col., 1998).

Receptor de prolactina

El receptor de PRL es una proteína transmembranal; distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células NK, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B. Pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase I, dentro de la que se encuentran los receptores del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), de la eritropoyetina y de la interleucina 2 (IL-2), entre otros. Esta constituidos por tres regiones: extracelular, transmembranal e intracelular. La región extracelular está constituida por aproximadamente 200 aminoácidos, presenta dos puentes disulfuro e interacciona con la PRL. La región transmebranal posee 24 aminoácidos y la intracelular presenta un dominio con motivo (motif) de triptófano y serina (WS) y dos regiones conservadas (caja1 y caja 2) (Bole-Feysot y col., 1998; Freeman y col., 2000).

El gen en el humano se localiza en el cromosoma 5 y está compuesto por 11 exones que por “splicing” alternativo generan cinco isoformas del receptor: la larga, intermedia, dos cortas y forma soluble del receptor de PRL. En el ratón el gen del receptor de PRL se localiza en el cromosoma 15 y se conocen 4 isoformas, una larga y tres cortas. Las diferentes isoformas del receptor de PRL son idénticas en el dominio extracelular, pero difieren en longitud y composición de aminoácidos de la cola intracitoplásmica (Ben-Jonathan y col., 2008; Binart y col., 2010; Freeman y col., 2000) (figura 7).

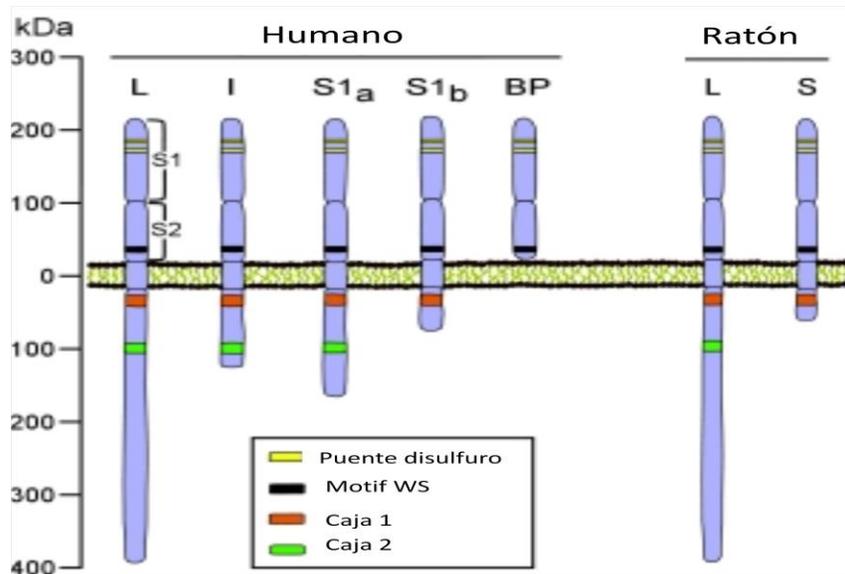


Figura 7. Receptor de prolactina. Se muestran las distintas isoformas del receptor de PRL en humano y ratón. Las cuales son idénticas en el dominio extracelular pero difieren en el dominio intracelular. (Ben-Jonathan y col., 2008).

La unión de la PRL a su receptor induce la dimerización de este, lo cual desencadena la fosforilación de tirosinas (Tyr) de distintas proteínas intracelulares encendiendo diferentes vías de señalización como JAK2/STAT y/o MAPK (Binart y col., 2010; Bole-Feysot y col., 1998; Freeman y col., 2000) (figura 8).

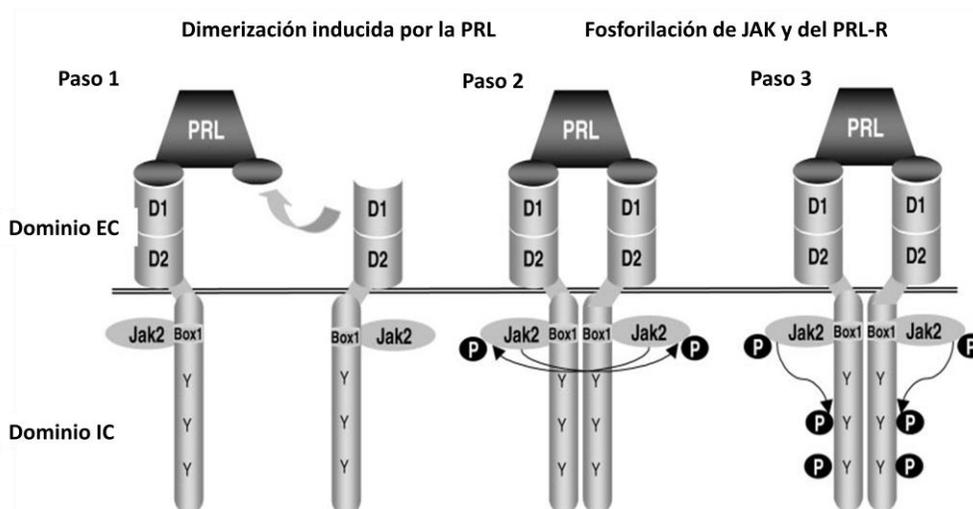


Figura 8. Unión de la PRL a su receptor. La unión de la PRL a su receptor provoca la dimerización de éste y la activación intracelular. (Freeman y col., 2000).

Sistema inmune y PRL

La relación entre PRL y el sistema inmune se hizo evidente en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas hipofisectomizadas sufría un proceso de atrofia (Smith, 1930). Posteriormente en 1983 Nagy y Berczi indujeron inmunodeficiencia en ratas tratadas con bromocriptina (agonista dopaminérgico e inhibidor de la secreción de PRL). Además, el sistema inmune es capaz de regular la secreción de PRL a través de citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α que actúan como reguladores parácrinos o endócrinos en la liberación o inhibición de PRL hipofisiaria (De Laurentiis y col., 2002). Los timocitos y células mononucleadas son capaces de sintetizar PRL (Chavez-Rueda y col., 2005; Horiguchi y col., 2004). La estimulación *in vitro* con PRL regula el proceso de maduración (ontogenia) de timocitos dobles negativos ($CD4^-CD8^-$) a dobles positivos ($CD4^+CD8^+$) mediante la inducción de la expresión del receptor de IL-2 (Carreno y col., 2005). En linfocitos pro-B murinos ($B220^+CD43^+$) transfectados con el receptor, la PRL aumenta la diferenciación hacia linfocitos pre-B ($B220^+CD43^-$) (Morales y col., 1999).

La PRL aumenta la expresión de moléculas que participan en la maduración y diferenciación de linfocitos B como CD40 y BAFF-R, lo cual contribuye a la pérdida de tolerancia. También se ha encontrado que la PRL incrementa la formación de anticuerpos, e inhibe la apoptosis en linfocitos (Saha y col., 2011). En bazo se ha reportado que en ratones BALB/c con hiperprolactinemia el porcentaje de linfocitos B T1 se modifica (Venkatesh y col., 2006) e incrementa la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2, sugiriendo que la PRL podría estar salvando las clonas auto-reactivas en bazo (Saha y col., 2009). En ratones con trasplante de médula ósea la administración de PRL recombinante induce un incremento en la linfopoyesis (Sun y col., 2003). En ratones “knock out” para PRL y su receptor no se encuentran defectos en la producción de los linfocitos a pesar de que el número absoluto de los linfocitos B y sus precursores estén ligeramente disminuidos (Bouchard y col., 1999; Horseman y col., 1997). Estos resultados muestran que la PRL participa en el

proceso de linfopoyesis. Sin embargo, su ausencia no es crítica y su participación en este proceso puede ser sustituida por otros factores redundantes.

Prolactina y LES

En enfermedades autoinmunes se han reportado niveles elevados de PRL (Orbach y col., 2006). En pacientes con LES se han descrito concentraciones séricas altas de PRL que correlacionan con la actividad de la enfermedad (Blanco y col., 1999; Leañón y col., 2001; Pacilio y col., 2001).

En ratones NZB/NZW se ha reportado que la hiperprolactinemia exacerba la actividad de la enfermedad y causa una mortalidad temprana al presentar un incremento de proteinuria y secreción de anticuerpos IgG principalmente dirigidos contra DNA. En contraste, la inhibición de la secreción de PRL con bromocriptina incrementa la sobrevida en estos ratones. (McMurray y col., 1991; McMurray, 2001). También se ha observado que en ratones MRL/lpr y MRL la inducción de hiperprolactinemia con metoclopramida exacerba la enfermedad (Ledesma y col., 2012). En ratones BALB/c R4A- γ 2b (transgénicos para un anticuerpo patogénico dirigido contra dsDNA) que no desarrollan lupus ni presentan linfocitos B auto-reactivos, al ser tratados con PRL para inducir un estado de hiperprolactinemia, se observó un incremento en el número de células B auto-reactivas, en el título de anticuerpos anti-DNA y depósitos de complejos inmunes en glomérulo (Peeva y col., 2003; Saha y col., 2011). En un estudio posterior con los mismos ratones se demostró que los mecanismos de delección clonal y anergia que inducen tolerancia, se ven afectados por la PRL (Saha y col., 2009; Saha y col., 2011) (figura 9).

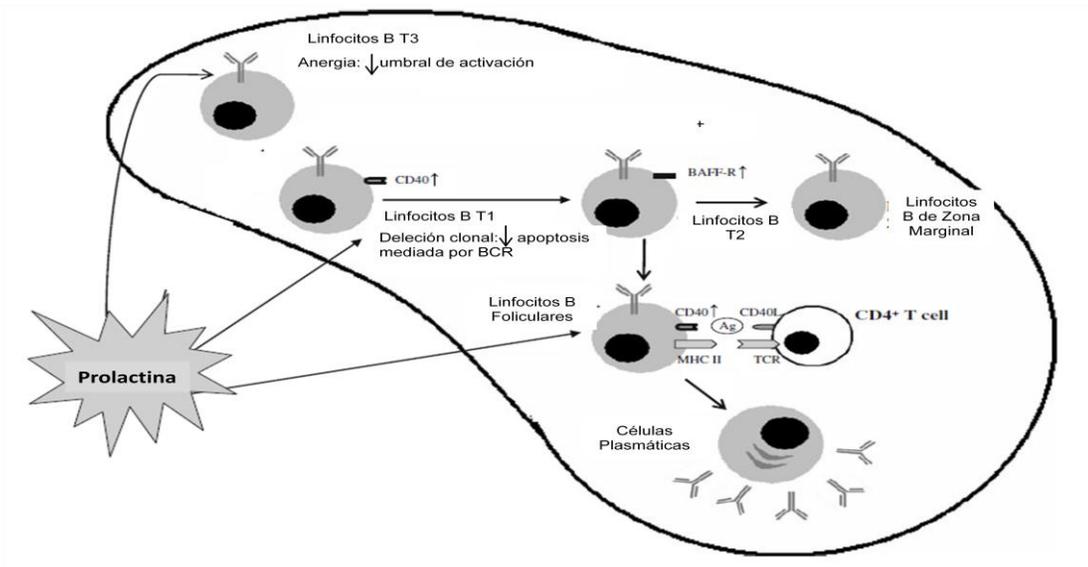


Figura 9. Efectos de la PRL en los linfocitos B. La prolactina afecta los mecanismos de deleción clonal y anergia, los cuales inducen tolerancia en los linfocitos B transitorios y maduros (Saha y col., 2011)

En otro estudio utilizando ratones MRL/lpr, MRL y C57BL/6 se demostró que las diferentes etapas de maduración del linfocito B en bazo (T1, T2, T3, foliculares y de zona marginal) expresan el receptor de PRL, expresión que disminuye con el grado de madures. La expresión del receptor de PRL fue mayor en los linfocitos más inmaduros (T1) y en las cepas que desarrollan lupus (MRL, MRL/lpr). Al inducirles un estado de hiperprolactinemia, se observó un incremento tanto de la expresión del receptor de PRL como del número absoluto de los linfocitos T1 en los ratones que desarrollan LES (MRL, MRL/lpr), no así en los ratones C57BL/6 (Ledesma y col., 2012).

Actualmente se sabe que los diferentes estadios de linfocitos B en bazo expresan el receptor de PRL; en ratones que desarrollan lupus los linfocitos B de bazo más inmaduros (T1) son los que expresan más receptor de PRL. Además, el estado de hiperprolactinemia en estos ratones exagera la enfermedad, incrementado la concentración de auto-anticuerpos, así como la expresión del receptor de PRL en los linfocitos B T1 (Ledesma y col., 2012). Por lo que resulta interesante determinar si los linfocitos B de medula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros) expresan el receptor de PRL y si su expresión se ve afectada en un estado de hiperprolactinemia.

JUSTIFICACION

El uso de ratones que desarrollan una enfermedad semejante a lupus, ha permitido entender mejor la patología de esta enfermedad. En estos se ha reportado que la hiperprolactinemia exagera la actividad de la enfermedad y causa una mortalidad temprana, también se ha demostrado la importancia de los linfocitos B en el desarrollo de la enfermedad y que los diferentes estadios de linfocitos B en bazo expresan el receptor de PRL, siendo mayor la expresión en los linfocitos más inmaduros (T1). Además, el estado de hiperprolactinemia en ratones MRL, MRL/lpr incrementa la expresión del receptor de PRL en los linfocitos B T1. Por lo que resulta interesante determinar si los linfocitos B de médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros) expresan el receptor de PRL y si su expresión se ve afectada en un estado de hiperprolactinemia.

HIPOTESIS

El receptor de PRL se expresará en todos los estadios del linfocito B de médula ósea, siendo mayor la expresión en un estado de hiperprolactinemia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión del receptor de PRL en los distintos estadios del linfocito B de médula ósea de las cepas C57BL/6, MRL/lpr y MRL, antes y después de inducir un estado de hiperprolactinemia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

En tres distintas cepas de ratones (C57BL/6, MRL y MRL/lpr).

1. Determinar la expresión del receptor de PRL a nivel de mRNA y proteína en los distintos estadios del linfocito B de médula ósea (pro-B, pre-B, inmaduras) purificados por citometría de flujo.
2. Inducir un estado de hiperprolactinemia con metoclopramida y determinar la exacerbación de la enfermedad.
3. Determinar la expresión del receptor de PRL a nivel de proteína en los distintos estadios del linfocito B de médula ósea (pro-B, pre-B, inmaduras) después de inducir un estado de hiperprolactinemia.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones de 9 semanas de edad de las cepas C57BL/6, MRL/MpJ (MRL) y MRL/MpJ-Fas^{lpr} (MRL/lpr) provenientes de Harlan (Indianapolis, USA) y Jackson Laboratory (Maine, USA) respectivamente. Se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, en cajas de policarbonato de piso sólido con micro aislador, con fotoperiodos de 12 horas de luz por día y temperatura del cuarto de 22-23 °C. Se les proporcionó alimento (18% de proteína cruda, 6% de grasa cruda y no más de 3% de minerales) y agua estéril a libre acceso. Así como los cuidados y la atención veterinaria especificada en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la ley general de salud y las disposiciones del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", donde se alojaron a los animales.

Nivel de bioseguridad

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

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti B220-perlas, anti B220-PE (clona RA3-6B2), anti CD23-PE-Cy7 (clona B3B4), anti IgM-APC (clona 11/41), anti CD43-FITC (clona eBioR2/60) de eBioscience, USA y anti receptor de PRL policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA). El anticuerpo biotinilado fue detectado con estreptavidina-PE-Cy5 (BD Biosciences, USA).

Obtención de células de médula ósea.

Los ratones de 9 semanas y de los grupos tratados con PBS (GIBCO, USA) y metoclopramida (Sigma Aldrich, USA) fueron sacrificados por eutanasia. La médula ósea se obtuvo de fémur y tibia al inyectar dentro de los huesos medio RMPI frío

(Thermo Scientific, USA) suplementado con BSA al 1% (MP Biomedicals, Francia) y EDTA 2mM (IBI Scientific, USA). Posteriormente, los eritrocitos se lisaron al incubarlos por 2 minutos con 1ml de solución de lisis (Sigma Aldrich, USA), las células se lavaron con medio y contaron con azul tripan (BioWhittaker, USA) en la Cámara de Neubauer.

Purificación de linfocitos B de médula ósea

A partir de células de médula ósea, se realizó una purificación de linfocitos B mediante una selección positiva, para lo cual las células fueron marcadas con un anticuerpo anti B220 conjugado a perlas magnéticas (15 minutos a 4°C) y se pasaron por columna de separación MACS LS (Miltenyi, Germany). La pureza se verificó empleando un anticuerpo anti B220-PE por citometría de flujo en el equipo FACSAria (BD Biosciences, USA).

Purificación de las poblaciones de linfocitos B en médula ósea

A partir de linfocitos B purificados por selección positiva. Las células se incubaron con DAPI (Sigma Aldrich, USA) y con los siguientes anticuerpos: anti B220-PE, CD43-FITC, CD23-PE-Cy7 e IgM-APC, durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron y re-suspendieron en medio RPMI. La purificación de los distintos estadios se realizó en el citómetro FACSAria (BD Biosciences, USA).

Extracción de RNA

Los linfocitos B y sus diferentes estadios, se resuspendieron en Trizol (Invitrogen, USA), se incubaron en hielo y se les adicionó glicógeno (10µl/ml Trizol). Posteriormente se adicionó cloroformo (Sigma Aldrich, USA) 200µl por ml de Trizol, se homogeneizó y se centrifugó. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio, se adicionó isopropanol (J.T Baker, USA) 550µl por ml Trizol y se incubó toda la noche a -70°C. Finalmente se centrifugó y eliminó el exceso de isopropanol, el botón obtenido se lavó con etanol (Sigma Aldrich, USA) al 75% 1ml por ml de Trizol.

El mRNA se resuspendió en agua inyectable, se cuantificó y evaluó su pureza utilizando el espectrofotómetro GeneQuant Pro.

Síntesis de cDNA

A 0.5µg de mRNA se le adicionó 1µl de oligo dT (Invitrogen, USA), se adicionó agua inyectable para un volumen final de 11µl. Esta reacción se colocó en un termociclador a 65°C por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 5µl del regulador 5X, 2µl de DDT (Invitrogen, USA) y 1µl dNTPs (Invitrogen, USA) a 10mM y 1µl de la enzima Superscript III (Invitrogen, USA); se corrieron las muestras en el termociclador en un ciclo de 1 hora a 50°C y 15 minutos 70°C. El cDNA obtenidos se almacenó a -40°C.

PCR tiempo real

La PCR tiempo real se realizó usando una mezcla sonda/iniciadores, para el receptor de PRL se colocó 1µl de sonda No.38 (Roche, Alemania) y 1.5µl de cada iniciador CAGTAAATGCCACGAACGAA (anti-sentido) (Roche, Alemania) y GAGGAGGCTCTGGTTCAACA (sentido) (Roche, Alemania); para la β-actina se colocó 1µl de la sonda No.56 (Roche, Alemania) y 1.5µl de cada iniciador AAGCCAACCGTGAAAAGAT (anti-sentido) (Roche, Alemania) y GTGGTACGACCAGAGGCATAC (sentido) (Roche, Alemania). Posteriormente se realizó la mezcla de reacción en la cual se colocaron 1µl de la mezcla sonda/iniciadores, 2µl de Master Mix (Roche, Alemania), 4.5µl de agua inyectable y 2.5µl de muestra. Las muestras se corrieron en el termociclador LightCycler II (Roche Diagnostic, Alemania) bajo las siguientes condiciones:

95°C x 15 minutos	} 1 ciclo
95°C x 10 segundos	} 40 ciclos
61°C x 30 segundos	
72°C x 01 segundos	
50°C x 30 segundos	} 1 ciclo

El análisis de la expresión relativa del receptor de PRL se realizó usando la fórmula $2\Delta CT$, como se muestra a continuación:

$$\Delta CT1 = C_p (\text{receptor de PRL}) - C_p (\beta - \text{actina})$$

$$\Delta\Delta = \Delta CT1 - (\Delta \text{ problema})$$

$$\text{Expresión relativa} = \frac{1}{e^{-(\Delta\Delta)}}$$

Tinción de células de médula ósea

La expresión del receptor de prolactina (PRL) a nivel de proteína se realizó por citometría de flujo (FACS Aria de BD, USA). Las células se marcaron con el anticuerpo cabra anti-receptor de PRL, un segundo anticuerpo anti-cabra biotinilado y Streptavidina-Pe-Cy5. Además se usaron los siguientes anticuerpos: anti CD43-FITC, B220-PE, CD23-PECy7 e IgM-APC, para separar los distintos estadios de linfocitos B (pro-B, pre-B e inmaduras). Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo no relacionado de cabra. Las células se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad con los distintos anticuerpos, se lavaron con FACS (PBS 1X, BSA 0.05%, EDTA 2mM, azida de sodio), se fijaron con para-formaldehído (5 minutos a 4°C en oscuridad), se leyeron en el citómetro FACS Aria (BD Biosciences, USA) y analizaron con el programa FlowJo (Tree Star Ashland, USA)

Inducción de hiperprolactinemia.

Se formarán dos grupos (6 hembras por grupo) por cada cepa de ratón, los tratamientos fueron: I) 100µl de PBS y II) 100µl de metoclopramida (Sigma Aldrich, USA) a una concentración de 2mg/ml disuelta en PBS. La administración del tratamiento se realizó durante 6 semanas por vía subcutánea (SC). Se tomaron muestras de sangre al inicio y al término del tratamiento para determinar las concentraciones séricas de PRL y de anticuerpos anti-dsDNA.

Determinación de proteinuria

Los niveles de proteínas en orina se determinaron al inicio y al final del tratamiento, mediante el uso de tiras reactivas (Uri Check-10).

ELISA para PRL

Se sensibilizó la placa de 96 pozos (Nunc, USA) con 100 μ l del anticuerpo anti-PRL de ratón (R&D Systems, USA) a una concentración de 2 μ g/ml, se incubó durante toda la noche a 4°C. Se bloqueó la placa (PBS-Tween-BSA 2%) y se incubó una hora a 37°C. Después de este tiempo se lavó (PBS-Tween), se adicionó el estándar de prolactina (10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml y 0ng/ml) y los sueros problema a una dilución 1:3. Nuevamente se incubó toda la noche a 4°C y una hora a 37°C. Se lavó y se adicionó el anticuerpo anti-PRL biotinilado (R&D Systems) a una concentración de 0.2mg/ml. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente, se lavó y se adicionó la avidina-AP a una dilución 1:1000. Finalmente se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se adicionó el sustrato de la fosfatasa alcalina (Sigma, USA). La placa se leyó en un lector de ELISA (Dynatech MR5000) a 405nm en intervalos de 15 minutos por una hora.

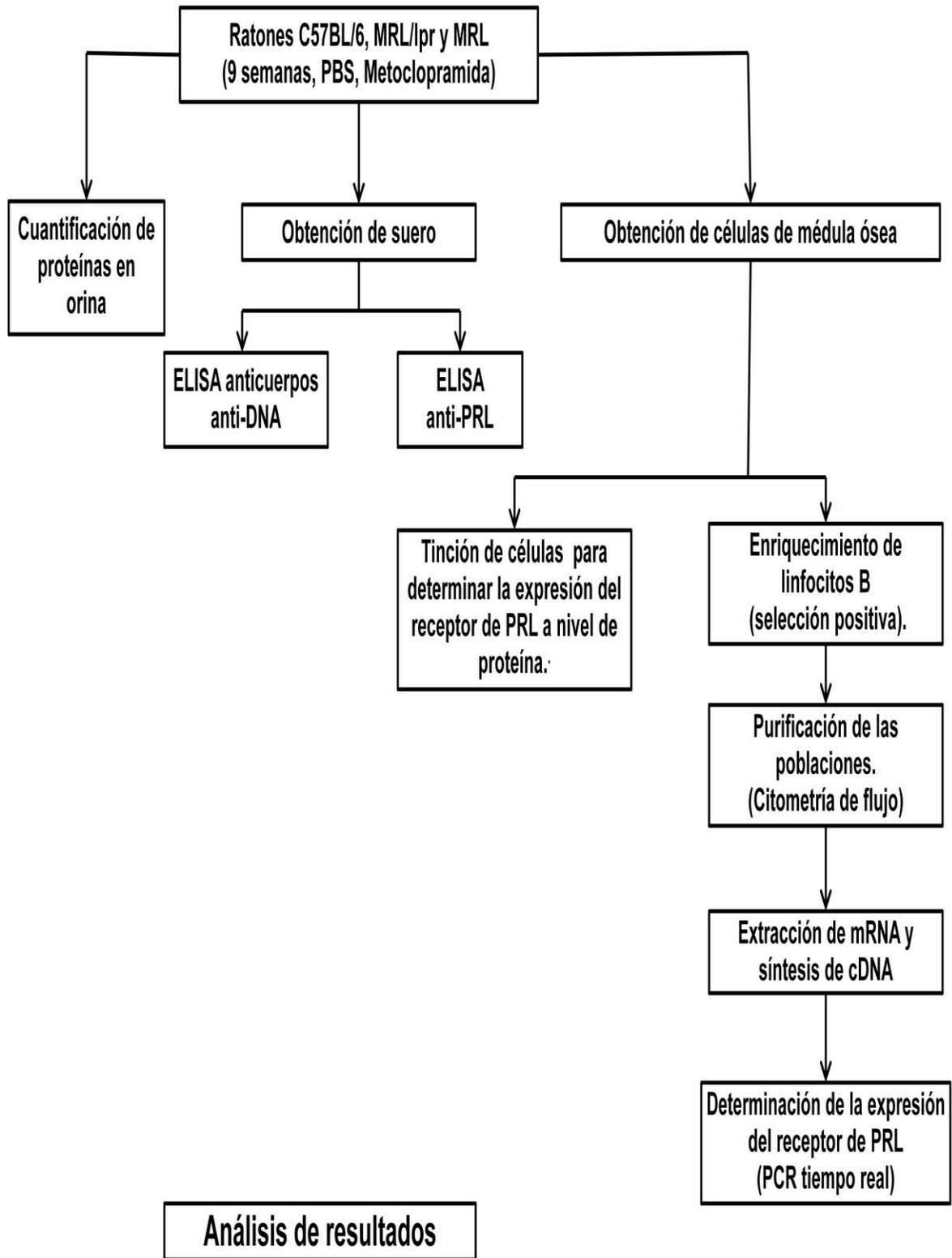
ELISA para anticuerpos IgG anti-dsDNA

Se sensibilizó la placa de 96 pozos (Nunc, USA) con 50 μ l de DNAds (Sigma Aldrich, USA) a una concentración de 5 μ g/ml, se incubó durante toda la noche a 4°C. Se bloqueó la placa (PBS-Tween-BSA 2%) y se incubó una hora a 37°C. Después de este tiempo se lavó (PBS-Tween), se adicionó el estándar de anticuerpo anti-DNA (500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62.5 μ g/ml, 31.25 μ g/ml y 0 μ g/ml) y los sueros problema a una dilución 1:50. Después se incubó una hora a 37°C, se lavó y se adicionó el anticuerpo anti-IgG-AP a una dilución 1:800. Finalmente se incubó 45 minutos a 37°C y se adicionó el sustrato de la fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich, USA). La placa se leyó en el lector de ELISA (Dynatech MR5000) a 405nm en intervalos de 15 minutos por una hora.

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 compararán mediante la prueba de t de Student. Las diferencias entre grupo se determinó utilizando la prueba ANOVA. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$, el análisis estadístico de los datos se realizar utilizando el programa de computo SPSS 15.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Expresión del receptor de PRL en células B

A partir de células de médula ósea de ratones C57BL/6 (cepa control) se realizó la purificación de los linfocitos B por selección positiva, obteniendo purezas mayores al 95% verificado por citometría de flujo (figura 10-A). La expresión del receptor de PRL a nivel de mRNA fue determinada por PCR tiempo real, empleando primers para la porción extracelular del receptor, como gen constitutivo se utilizó β -actina (figura 10-B).

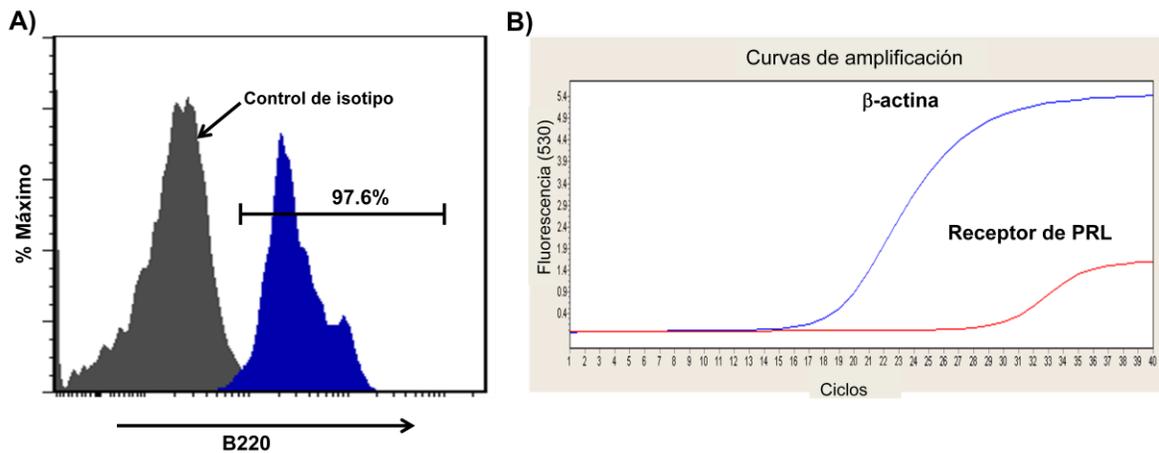


Figura 10. Expresión del receptor de PRL en linfocitos B. A) Se realizó la purificación de linfocitos B mediante una selección positiva con anticuerpo anti-B220 asociado a perlas magnéticas. La pureza se determinó por citometría de flujo al marcar con anticuerpo anti-B220- PE, obteniendo purezas mayores al 95%. B) Mediante PCR tiempo real se determinó la expresión del receptor de PRL. Se muestran la curva de amplificación para el receptor de PRL y β -actina.

Por citometría de flujo se purificaron los distintos estadios de maduración de linfocito B de médula ósea (pro-B, pre-B e inmaduros), obteniendo purezas mayores al 95% (figura 11).

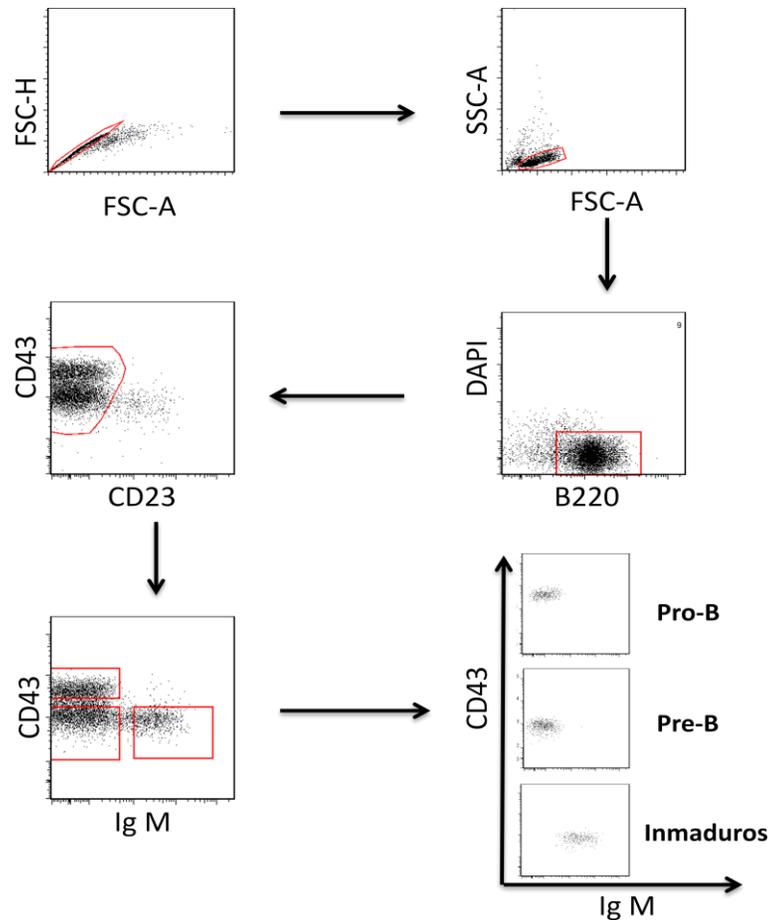


Figura 11. Purificación de los estadios de maduración del linfocito B. A partir de células de médula ósea se realizó la purificación de linfocitos B por selección positiva, las células fueron marcadas con distintos anticuerpos anti CD43, CD23, B220, IgM, para purificar los distintos estadios y con DAPI para purificar solo las células vivas. La pureza de las poblaciones obtenidas oscilo entre 95% y 98%. Se muestra una imagen representativa.

Nuestros resultados mostraron que el estadio con menor expresión del receptor de PRL a nivel de mRNA con una diferencia estadísticamente significativa fue el de linfocito B inmaduro (0.4 ± 0.04), mientras que la expresión del receptor en los linfocitos pro-B (1.1 ± 0.1) y pre-B (1.2 ± 0.2) fue similar (figura 12-A). A nivel de proteína el estadio con mayor expresión del receptor fue el pro-B (465.8 ± 32.1 IMF [Intensidad Media de Fluorescencia]), siguiéndole el estadio pre-B (251.0 ± 15.0 IMF) y el estadio con menor expresión fue el de linfocito B inmaduro (154.0 ± 37.6 IMF) (figura 12-B). En la figura 12-C se muestra un histograma representativo de la

expresión en IMF de los distintos estadios de maduración de los linfocitos B provenientes de ratones C57BL/6.

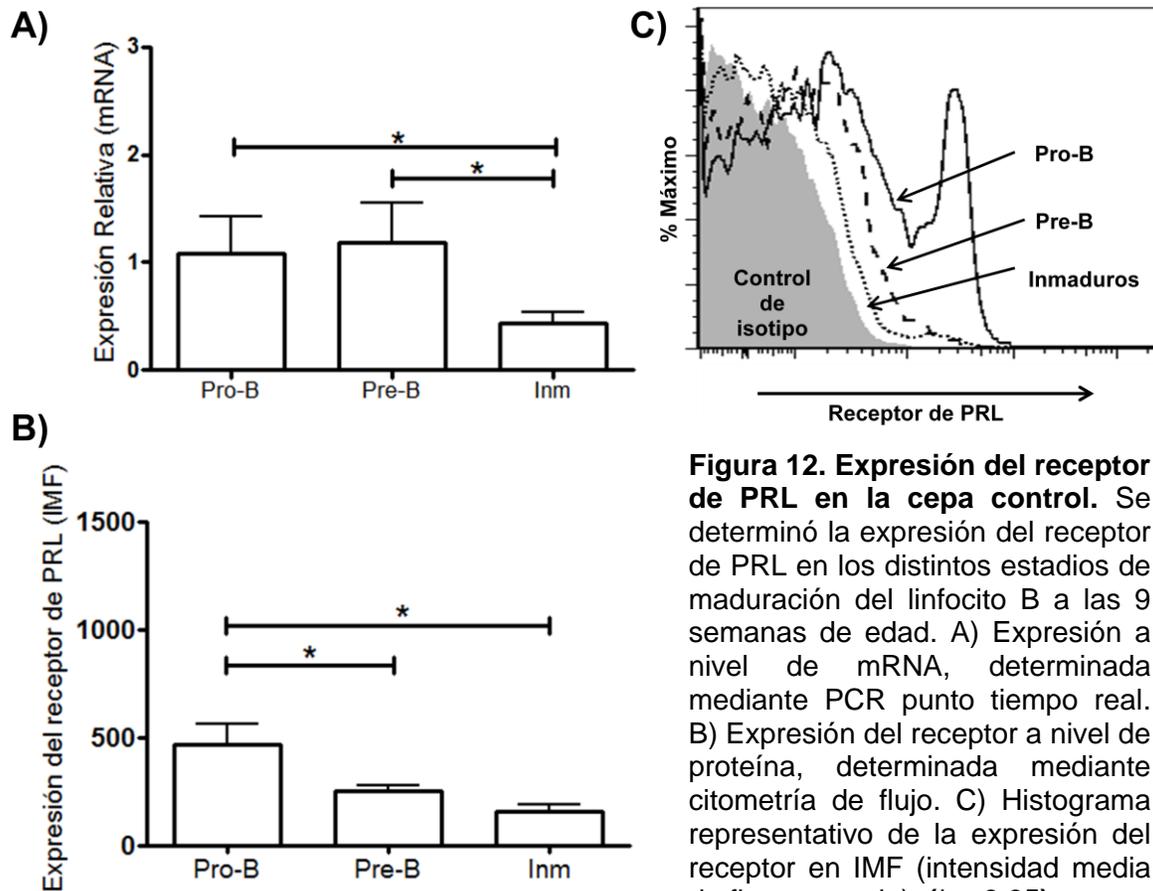


Figura 12. Expresión del receptor de PRL en la cepa control. Se determinó la expresión del receptor de PRL en los distintos estadios de maduración del linfocito B a las 9 semanas de edad. A) Expresión a nivel de mRNA, determinada mediante PCR punto tiempo real. B) Expresión del receptor a nivel de proteína, determinada mediante citometría de flujo. C) Histograma representativo de la expresión del receptor en IMF (intensidad media de fluorescencia). (* $p < 0.05$)

Expresión del receptor de PRL en ratones que desarrollan lupus

La expresión del receptor de PRL en los linfocitos B de las cepas que desarrollan lupus (MRL, MRL/lpr) presentó un patrón diferente al de la cepa control (C57BL/6). En las cepas MRL y MRL/lpr a las 9 semanas de edad (sin manifestaciones de la enfermedad) los linfocitos que expresaron más receptor fueron los pro-B seguidos de los linfocitos B inmaduros y los linfocitos que expresaron menor receptor fueron los pre-B (figura 13-A). Cepa MRL: pro-B (1167.8 ± 63.5 IMF), pre-B (149.0 ± 34.7 IMF), inmaduros (326.7 ± 54.5 IMF); cepa MRL/lpr: pro-B (421.5 ± 90.3 IMF), pre-B (96.8 ± 25.6 IMF), inmaduros (132.8 ± 28.9 IMF). Al comparar la expresión del receptor de PRL en las tres distintas cepas; se observó que los linfocitos pro-B fueron los que

expresaron mayor receptor de PRL en las tres cepas. Por otra parte al comparar la expresión del receptor de PRL en los linfocitos pro-B de las 3 cepas encontramos que la mayor expresión del receptor se encontró en la cepa MRL (1167.8 ± 63.5 IMF), mientras que las cepas MRL/lpr (421.5 ± 90.3 IMF) y C57BL/6 (465.8 ± 32.1 IMF) expresaron cantidades semejantes de receptor como se puede apreciar en la figura 13-B.

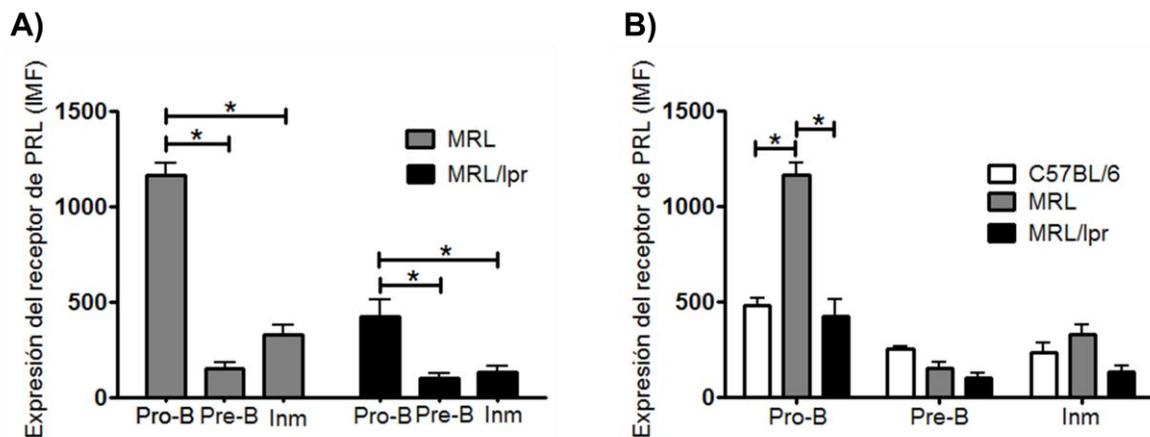


Figura 13. Expresión del receptor de PRL en cepas que desarrollan lupus. Se determinó la expresión del receptor de PRL a nivel de proteína mediante citometría de flujo. A) Cepas MRL y MRL/lpr a las 9 semanas y B) Comparación de la expresión del receptor entre las tres cepas. (* $p < 0.05$)

Exacerbación de LES por hiperprolactinemia

Ratones de 9 semanas de edad de las diferentes cepas fueron tratados con metoclopramida durante 6 semanas para inducir hiperprolactinemia. Las concentraciones séricas de PRL antes y al final del tratamiento (15 semanas de edad) fueron las siguientes: 4.2 ± 1.4 y 10.7 ± 1.2 ng/ml en la cepa C57BL/6; 12.5 ± 2.0 y 26.3 ± 2.7 ng/ml en la cepa MRL; 12.7 ± 2.3 y 34.5 ± 4.3 ng/ml en la cepa MRL/lpr. En donde los niveles de PRL en las tres cepas se elevaron más del doble en el tratamiento con metoclopramida con respecto a los que se trataron con PBS (control de tratamiento) induciendo un estado de hiperprolactinemia. En el tratamiento con PBS en la cepa MRL/lpr se observó un incremento en la concentración de PRL con respecto a las 9 semanas, pero sin alcanzar las concentraciones de los ratones tratados con metoclopramida (figura 14-A).

Se compararon las manifestaciones de lupus en los ratones MRL y MRL/lpr antes y al término del tratamiento con metoclopramida (hiperprolactinemia) o PBS. Los ratones MRL presentaron proteinuria (121.7 ± 37.4 mg/dl) solamente en los ratones con hiperprolactinemia no así en los ratones control (PBS). En cambio los ratones MRL/lpr tratados con PBS desarrollaron proteinuria (48.0 ± 18.7 mg/dl) incrementando de forma estadísticamente significativa y casi tres veces (166.6 ± 23.56 mg/dl) en los ratones con hiperprolactinemia. Figura 14-B. En cuanto a las concentraciones séricas de anticuerpos anti-dsDNA del isotipo IgG, en los ratones MRL tratados con PBS (15 semanas de edad), se comenzó a detectar anticuerpos anti-dsDNA (5.4 ± 2.0 µg/ml). Sin embargo, estas concentraciones de auto-anticuerpos se elevan cuatro veces (23.0 ± 5.1 µg/ml) cuando se les induce hiperprolactinemia, el mismo comportamiento se observó en la cepa MRL/lpr, las concentraciones séricas de auto-anticuerpos se elevan en los ratones con hiperprolactinemia (22.5 ± 5.1 µg/ml), en comparación con los tratados con PBS (11.6 ± 1.3 µg/ml) como se puede apreciar en la figura 14-C. Los ratones de la cepa control C57BL/6 no presentaron ni proteinuria ni anticuerpos anti-dsDNA cuando se les indujo un estado de hiperprolactinemia.

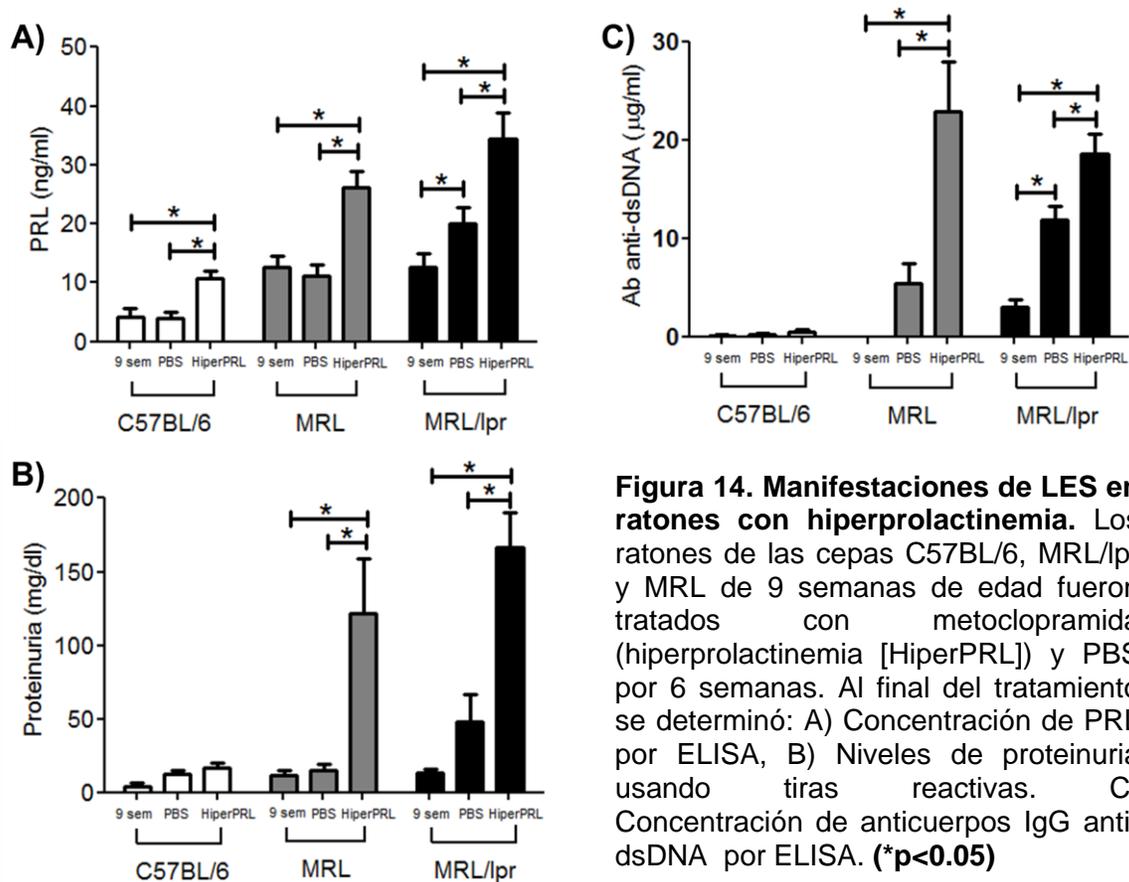


Figura 14. Manifestaciones de LES en ratones con hiperprolactinemia. Los ratones de las cepas C57BL/6, MRL/lpr y MRL de 9 semanas de edad fueron tratados con metoclopramida (hiperprolactinemia [HiperPRL]) y PBS por 6 semanas. Al final del tratamiento se determinó: A) Concentración de PRL por ELISA, B) Niveles de proteinuria usando tiras reactivas. C) Concentración de anticuerpos IgG anti-dsDNA por ELISA. (* $p < 0.05$)

Expresión del receptor de PRL en ratones con hiperprolactinemia.

En el estado de hiperprolactinemia se determinó la expresión del receptor de PRL a nivel de proteína en los distintos estadios de maduración del linfocito B de médula ósea. En la cepa control (C57BL/6) no se vio afectada la expresión del receptor (figura 15-A). Sin embargo, en las cepas que desarrollan lupus se observó un incremento con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la expresión del receptor de PRL en los linfocitos pro-B en los ratones con hiperprolactinemia con respecto al control. El incremento en la expresión fue más evidente en la cepa MRL/lpr ya que se incremento 9 veces con respecto al control (PBS 63.4 ± 13.3 , hiperprolactinemia 583.7 ± 42.2 IMF); mientras que en la cepa MRL solo hubo un leve incremento de 512 ± 44.8 IMF (PBS) a 652.8 ± 47.7 IMF (hiperprolactinemia). La expresión en los linfocitos pre-B e inmaduros fue similar en ambos tratamientos: La expresión del receptor en los linfocitos pre-B fue: en la cepa MRL 100.3 ± 10.3 (PBS)

y 112.2 ± 12.1 IMF (hiperprolactinemia); y en la cepa MRL/lpr 322.8 ± 40.7 y 172.8 ± 33.2 IMF. En los linfocitos B inmaduros la expresión fue la siguiente: en la cepa MRL 192.5 ± 29.8 y 215.0 ± 21.9 IMF; en la cepa MRL/lpr 126.3 ± 24.3 y 123.2 ± 31.6 IMF, como se puede apreciar en la figura 15-B y 15-C.

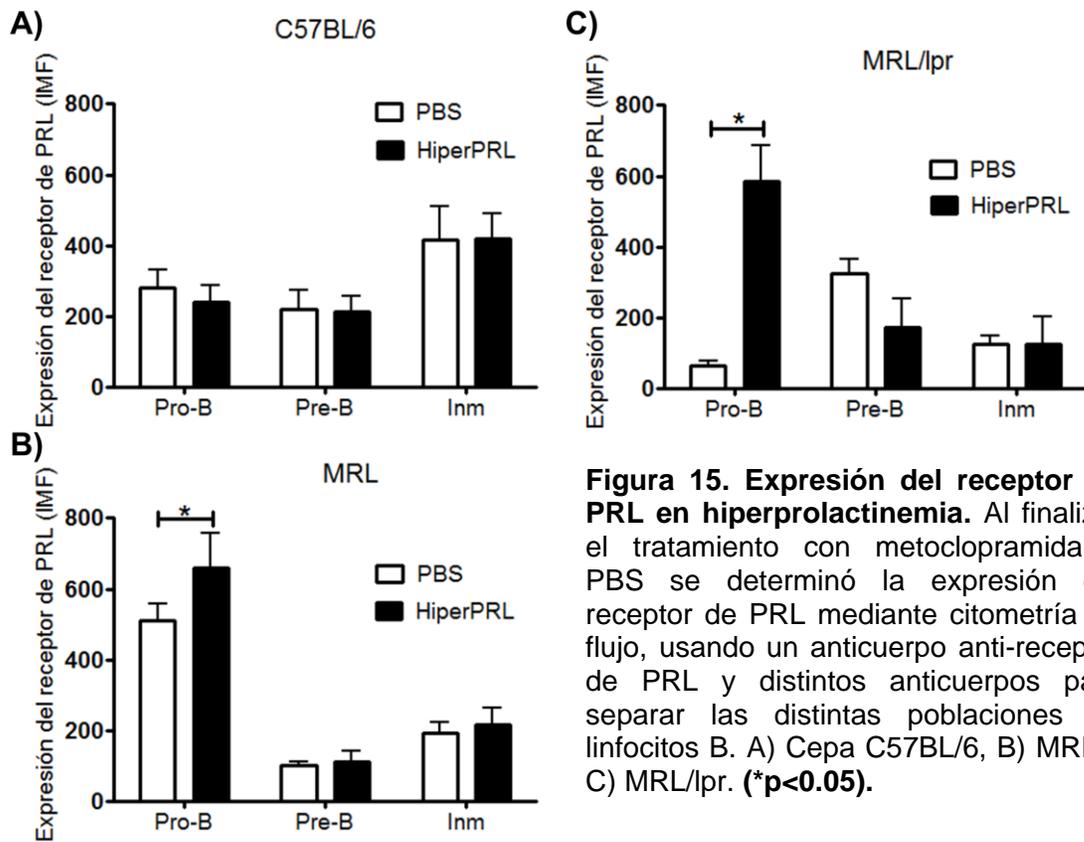


Figura 15. Expresión del receptor de PRL en hiperprolactinemia. Al finalizar el tratamiento con metoclopramida y PBS se determinó la expresión del receptor de PRL mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo anti-receptor de PRL y distintos anticuerpos para separar las distintas poblaciones de linfocitos B. A) Cepa C57BL/6, B) MRL y C) MRL/lpr. (* $p < 0.05$).

DISCUSION

Lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune, que presenta defectos en la tolerancia dando lugar a la aparición de clonas auto-reactivas tanto de linfocitos T como de B. Existiendo una hiperactividad de los linfocitos B que se identifica por la presencia de auto-anticuerpos, dirigidos contra diversas moléculas del núcleo. Diversos estudios han demostrado la importancia que tienen los linfocitos B en la aparición de la enfermedad, así como la presencia de hormonas como la PRL. En este trabajo se evaluó la expresión del receptor de PRL en linfocitos B de médula ósea antes y después de un estado de hiperprolactinemia, utilizando las cepas de ratón MRL y MRL/lpr (mutación en el gen Fas) las cuales desarrollan una enfermedad parecida al LES (Andrews y col., 1978), las manifestaciones de la enfermedad aparecen antes en la cepa MRL/lpr además de tener una vida media menor que la cepa MRL.

En 1993 se reportó la expresión del receptor de PRL en linfocitos B de bazo (Garnerault y col., 1993), en estudios publicados en nuestro laboratorio se demostró que las diferentes subpoblaciones de linfocitos B en bazo (transitorios, foliculares y de zona marginal) expresan el receptor de PRL, siendo mayor la expresión en los linfocitos B más inmaduros (transitorios-1) (Ledesma y col., 2012;). Estos resultados sugirieron que los linfocitos B de médula ósea podrían expresar el receptor de PRL. Nuestros resultados mostraron que los diferentes estadios de maduración del linfocito B en médula ósea (pro-B, pre-B, inmaduros) expresaron el receptor de PRL, esta expresión dependió del grado de madurez del linfocito B. En el ratón que no desarrolla LES (C57BL/6) la expresión del receptor de PRL es mayor en el estadio más temprano que estudiamos (pro-B) y conforme el linfocitos B va madurando la expresión del receptor de PRL va disminuyendo; este patrón fue semejante a lo reportado previamente en bazo (Ledesma y col., 2012). Nuestros resultados junto con lo reportado por Morales y col. quienes en líneas celulares de linfocitos pro-B transfectados con el receptor de PRL e incubados con PRL lograron la diferenciación a linfocitos pre-B, apoyan una participación del receptor de PRL en el desarrollo del linfocito B.

En las cepas que desarrollan espontáneamente LES al igual que en la cepa control el estadio que expresa mayor receptor de PRL es el linfocito pro-B. Durante el desarrollo del linfocitos B un paso importante es la eliminación de las clonas auto-reactivas en médula ósea, la cual se da por edición del receptor y delección clonal en el estadio de linfocito B inmaduro. Nuestros resultados mostraron un patrón diferente en la expresión del receptor de PRL en los linfocitos pre-B e inmaduros entre las cepas que desarrollan LES y la cepa control. Mientras en la cepa control la expresión del receptor fue menor en los linfocitos B inmaduros y mayor en los pre-B, en las cepas MRL y MRL/lpr la expresión del receptor fue mayor en los linfocitos B inmaduros en comparación a los pre-B. Además, de que se ha reportado que la señalización del receptor de PRL incrementa la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 (Buckley, 2001; Kochendoerfe y col., 2003), sugiriendo que el aumento en la expresión del receptor de PRL en los linfocitos B inmaduros solo en las cepas que desarrollan LES, podría favorecer la sobrevivencia de las clonas-autoreactiva, aunque será necesario realizar más experimentos para poder comprobar esta hipótesis

Se ha reportado que la metoclopramida induce un estado de hiperprolactinemia si se administra en dosis adecuadas (Ledesma y col., 2012; Oberberk y col., 2004). Los ratones de las cepas C57BL/6, MRL y MRL/lpr tratados con metoclopramida incrementaron sus niveles de PRL. Solamente en las cepas con el fondo genético para desarrollar LES se observó la exacerbación de la enfermedad al aumentar los niveles séricos de los anticuerpos anti-dsDNA y proteinuria, resultados que concuerdan con los reportados previamente en modelos de hiperprolactinemia y lupus, como McMurray quien indujo un estado de hiperprolactinemia en ratones NZB x NZW (McMurray y col., 1991) mediante un trasplante de hipófisis y Peeva en ratones *Sle3/5 R4A-γ2b* C57BL/6 (Peeva y col., 2006), en donde utilizaron PRL recombinante para causar la hiperprolactinemia. En ambos estudios el estado de hiperprolactinemia exacerbó la enfermedad. Estos resultados son similares a lo encontrado en ensayos clínicos, donde se demuestra que los niveles elevados de PRL correlacionan con la actividad de LES (Blanco y col., 1999; Orbach y col., 2011)

Al comparar la expresión del receptor de PRL en un estado de hiperprolactinemia, en la cepa C57BL/6 los cuales no desarrollaron manifestaciones de LES, no encontramos diferencia en la expresión del receptor de PRL a nivel de proteína en los distintos estadios de maduración de los linfocitos B. Estos resultados fueron similares a lo reportado por Ledesma y col., donde no se vio afectada la expresión del receptor de PRL en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B de bazo en estos mismos ratones. En contraste en las cepas que desarrollan lupus la expresión del receptor de PRL se vio afectada en el estado de hiperprolactinemia cuando las manifestaciones de la enfermedad se exacerbaron.

Dentro de los diferentes estadios de maduración del linfocito B, los pro-B fueron los únicos en los que se incrementó la expresión del receptor de PRL en el estado de hiperprolactinemia en las cepas que desarrollan LES, este incremento podría estar asociado a la exacerbación de la enfermedad. Por lo que resultará interesante investigar qué genes pueden ser regulados en la interacción PRL- receptor en los linfocitos pro-B.

Es claro que la hiperprolactinemia exagera las manifestaciones de LES solamente en los ratones con fondo genético para desarrollar la enfermedad. Además de encontrar que los linfocitos B de médula ósea expresan el receptor de PRL y que el patrón de expresión es diferente entre las cepas control y las que desarrollan LES, esto aunado a que la expresión del receptor solo incrementa en los linfocitos pro-B en hiperprolactinemia. Con estos resultados es posible pensar que la interacción de la PRL con su receptor esté afectando algunos de los mecanismos de tolerancia central como: delección clonal y/o edición del receptor (Basten y Silveira, 2010; Pillai y col., 2011; Tussiwand y col., 2009). Como ya se ha reportado a nivel de bazo en ratones BALB/c R4A- γ 2b, en donde los mecanismos de delección clonal y anergia en linfocitos B transitorios se ven afectados por la PRL (Saha y col., 2009). Esto tendría relación con la aparición de LES, ya que la presencia de linfocitos B auto-reactivos es la principal característica de esta enfermedad autoinmune. Por lo que resultará

interesante investigar si la interacción de la PRL con su receptor afecta alguno de los mecanismos que inducen tolerancia central en los linfocitos B.

CONCLUSIONES

El receptor de PRL se expresa en todos los estadios de linfocito B de médula ósea antes y después de inducir un estado de hiperprolactinemia. Lo que sugiere que la PRL podría estar participando en la evasión de los mecanismos de tolerancia central ya que el estado de hiperprolactinemia solamente aumentó la expresión del receptor en el estadio pro-B en los ratones que desarrollan lupus.

PERSPECTIVAS

Con este trabajo se demostró la expresión del receptor de PRL en los distintos estadios de maduración del linfocito B (pro-B, pre-B e inmaduros) de médula ósea en cepas que desarrollan lupus, antes y después de inducir un estado de hiperprolactinemia.

Ahora resulta interesante demostrar la participación de la PRL y su receptor en la evasión de los mecanismos de tolerancia central (edición del receptor, delección clonal y anergia), lo cual puede estar favoreciendo el desarrollo de lupus en los ratones MRL y MRL/lpr

REFERENCIAS.

1. Adachi M., Suematsu S., Suda T., Watanabe D., Fukuyama H., Ogasawara J., Tanaka T., Yoshida N., Nagata S. 1996. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *PNAS* 93:2131-2136.
2. Allman D. and Pillai S. 2008. Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 20:149-157.
3. Andrews B., Eisenberg R., Theofilopoulos A., Izui S., Wilson C., McConahey P., Murphy E., Roths J., Dixon F. 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148:1198-1215.
4. Basten A. and Silveira A. 2010. B cell tolerance: mechanisms and implications. *Curr. Opin. Immunol.* 22:566-574.
5. Ben-Jonathan N., Mershon J., Allen D., Steinmetz R. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev.* 17:639-669.
6. Ben-Jonathan N., LaPensee C., LaPensee E. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans?. *Endocr. Rev.* 29:1-41
7. Bernichtein S., Touraine P., Goffin V. 2010. New concepts in prolactin biology. *J. Endocrinol.* 206:1-11.
8. Binart N., Bachelot A., Bouilli J. 2010. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* 21:362-368.
9. Blanco F., Quintal G., Leños A. 1999. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. *J. Rheumatol.* 26:55-59.
10. Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19:225-268.
11. Bouchard B., Ormandy C., Di-Santo J., Kelly P. 1999. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 163:576-582.

12. Buckley A. 2001. Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus*. 10:684-690
13. Carreno P., Sacedon R., Jimenez E., Vicente A., Zapata A. 2005. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol.* 160:135-145.
14. Chavez-Rueda K., Hernandez J., Zenteno E., Leaños-Miranda A., Legorreta-Haquet M., 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.
15. De Laurentiis A., Pisera D., Caruso C., Candolfi M., Mohn C., Rettori V., Seilicovich A. 2002. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic pituitary axis. *Neuroimmunomod.* 10:30-39.
16. Freeman M., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. 2000. Prolactin: structure function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80:1523-1631.
17. Furukawa F. and Yoshimasu T. 2005. Animal models of spontaneous and drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 4:345-350.
18. Gagnerault C., Touraine P., Savino W., Kelly P., Dardenne M. 1993. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J. Immunol.* 150:5673-5681.
19. Grammer A. and Lipsky E. 2003. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rev. Ther Suppl* 4:S22-S27.
20. Hardy R. and Hayakawa K. 2001. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19:595-621.
21. Herzog S., Reth M., Jumaa H. 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 9:195-205.
22. Horiguchi K., Yagi S., Ono K., Nishiura Y., Tanaka M., Ishida M., Harigaya T. 2004. Prolactin gene expression in mouse spleen helper T cells. *J. Endocrinol.* 183:639-646.
23. Horseman D., Zhao W., Montecino E., Tanaka M., Nakashima K., Engle S., Smith F., Markoff E., Dorshkind K. 1997. Defective mammopoiesis, but normal

- hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 16:6926-6935.
24. Kindt T., Goldsby R., Osborne B. 2007. *Kuby Immunology*. 6th ed. W.H. Freeman and Company. N.Y, USA.
 25. Kochendoerfer S., Krishnan N., Buckley D., Buckley A. 2003. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J. Endocrinol.* 178:265-273.
 26. Kurosaki T. 2002. Regulation of B cell fates by BCR signaling components. *Curr. Opin. Immunol.* 14:341–347.
 27. Lamoureux J., Watson L., Cherrier M., Skog P., Nemazee D., Feeney A. 2007. Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* 204:2853-2864
 28. Leañós A., Pascoe D., Chavez K., Blanco F. 2001. Detection of macroprolactinemia with the polyethylene glycol precipitation test in systemic lupus erythematosus patients with hyperprolactinemia. *Lupus.* 10:340-345.
 29. Ledesma Y., Blanco F., Fuentes E., Tesoro E., Hernández R., Arriaga L., Legorreta M., Montoya E., Chávez L., Castro M., Chávez K. 2012. Higher levels of PRL receptor in Transitional 1 B cells correlates with increased numbers of this population after PRL treatment and an early onset of lupus symptoms. *BMC Immunol.* 13:11.
 30. Lipsky E. 2001. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* 2:764-766.
 31. Martensson I., Keenan R., Licence S. 2007. The pre-B cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 19:137–142.
 32. Martensson I., Almqvist N., Grimsholm O., Bernardi A. 2010. The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Letters* 584:2572–2579.
 33. McMurray R., Keisler D., Kanuckel K., Izui S., Walker E. 1991. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *J. Immunol.* 147:3780
 34. McMurray R. 2001. Prolactin in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus J. Immunol.* 10:742-747.

35. Meffre E. and Wardemann H. 2008. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20:632-638.
36. Morales P., Carretero M., Geronimo H., Copín S., Gaspar M., Marcos M., Martín J. 1999. Influence of prolactin on the differentiation of mouse B-lymphoid precursors. *Cell. Growth. Differ.* 10:583-590.
37. Murphy K., Travers Paul., Walport M. 2008. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. Garland Science. N.Y, USA.
38. Nagy E., Berczi I., Wren G., Asa S., Kovacs K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacol.* 6:231-243.
39. Oberberk R., Schmitz D., Wilsenack K., Schüler M., Pehle B., Schedlowski M., Exton M. 2004. Metoclopramide and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Eur. Surg. Res.* 36:116-122.
40. Orbach H. and Shoenfeld Y. 2006. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 6:537-542.
41. Orbach H., Zandman-Goddard G., Boaz M., Agmon-Levin N., Amital H., Szekanecz Z., Szucs G., Rovensky J., Kiss E., Doria A., Ghirardello A., Gomez-Arbesu J., Stojanovich L., Ingegnoli F., Meroni P., Rozman B., Blank M., Shoenfeld Y. 2011. Prolactin and autoimmunity: Hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 42:189-198.
42. Pacilio M., Migliaresis S., Meli R., Ambrosone L., Bigliardo B., Di Carlo R. 2001. Elevated bioactive prolactin levels in systemic lupus erythematosus association with disease activity. *J. Rheumatol.* 28:2216-2221.
43. Peeva E., Michael D., Creary J., Rice J., Chen X., Diamond B. 2003. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J. Clin. Invest.* 111:2.
44. Peeva E., Gonzalez J., Hicks R., Diamond B. 2006. Cutting edge: lupus susceptibility interval *Sle3/5* confers responsiveness to prolactin in C57BL/6 mice. *J Immunol* 177:1401-1405.
45. Petri M. 2008. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:412-415.

46. Pillai S., Mattoo H., Cariappa A. 2011. B cells and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 23:721-731.
47. Piwnica D., Fernandez I., Binart N., Touraine A., Goffin V. 2006. A new mechanism for prolactin (PRL) processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Mol. Endocrinol.* 20:3263-3278.
48. Saha S., Gonzalez J., Rosenfeld G., Keiser H., Peeva E. 2009. Prolactin Alters the Mechanisms of B Cell Tolerance Induction. *Arthr. Rheum.* 60:1743–1752.
49. Saha S., Tieng A., Pepeljugoski P., Zandamn-Goddard G., Peeva E. 2011. Prolactin, Systemic Lupus Erythematosus, and Autoreactive B Cells: Lessons Learnt from Murine Models. *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* 40:8–15.
50. Smith P. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anac. Rec.* 47:119-129.
51. Sun R., Gault R., Welniak L., Tian Z., Richards S., Murphy J. 2003. Immunologic and hematopoietic effects of recombinant human prolactin after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Biol. Blood. Marrow. Transplant* 9:426-434.
52. Thomas M., Srivastava B., Allman D. 2006. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell. Immunol.* 239:92–102.
53. Tussiwand R., Bosco N., Ceredig R., Rolink A. 2009. Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *Eur. J. Immunol.* 39:2317–2324.
54. Venkatesh J., Peeva E., Xu X., Diamond B. 2006. Cutting Edge: Hormonal Milieu, Not Antigenic Specificity, Determines the Mature Phenotype of Autoreactive B Cells. *J. Immunol.* 176:3311-3314.
55. Von Boehmer H. and Melchers F. 2010. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease, *Nat. Immunol.* 11:1.
56. Watanabe R., Brannan C., Copeland N., Jenkins N., Nagata S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nat.* 356:314-317.
57. Yurasov S., Wardemann H., Hammersen J., Tsuiji M., Meffre E., Pascual V., Nussenzweig M. 2005. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201:703-711.

58. Yurasov S., Tiller T., Tsuiji M., Velinzon K., Pascual V., Wardemann H., Nussenzweig M. 2006. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J. Exp. Med.* 203:2255-2261.

ANEXO

Preparación de reactivos

PBS 10X pH 7.4

- NaCl 40.0g
- K₂HPO₄ 12.2g
- KH₂PO₄ 1.2g
- Agua destilada 500ml

Regulador FACS

- PBS 1X 400ml
- Suero Fetal Bovino 0.5% 2ml
- EDTA 2mM 1.6ml
- Azida de sodio 0.01% 1.6ml

Solución de lavados

- PBS 1X
- Tween 20 al 2%

Solución bloqueadora

- PBS 1X 50ml
- Tween 20 al 2% 1ml
- Albúmina 2% 1g

Regulador de Bicarbonatos pH 9.5

- Na₂CO₃ 0.795g
- NaHCO₃ 1.465g
- Agua destilada 500ml

Medio para células de médula ósea

- Medio RPMI 50ml
- BSA 0.5% 1.25ml
- EDTA 2mM 200μl

Regulador MACS

- PBS 1X 50ml
- BSA 0.5% 1.25ml
- EDTA 2mM 200μl

Sustrato de la fosfatasa alcalina

- Sustrato 2 tabletas
- Regulador de bicarbonatos 10ml
- MgCl₂ 20μl