



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA FUNCIÓN DE
LOS LINFOCITOS T REGULADORES
($CD4^+CD25^{HI}FOXP3^+CD127^{LOW/-}$) PROVENIENTES DE
PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

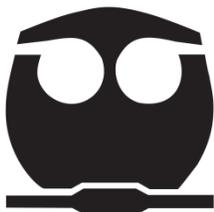
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ARIMELEK CORTÉS HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2013



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 Pastelín Palacios
VOCAL: Profesor: José Sullivan López González
SECRETARIO: Profesor: María Victoria Legorreta Haquet
1° SUPLENTE: Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría
2° SUPLENTE: Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA, UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA VICTORIA LEGORRETA HAQUET

SUSTENTANTE:

ARIMELEK CORTÉS HERNÁNDEZ

ÍNDICE

	PÁGINA
Índice	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Tablas	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
Introducción	1
Justificación	17
Planteamiento del Problema	17
Hipótesis	17
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	18
Materiales y Métodos	19
Diagrama de Flujo	26
Resultados	27
Discusión	34
Conclusiones	37
Perspectivas	38
Referencias Bibliográficas	39
Anexo I: Hoja de consentimiento informado	53
Anexo II: Reactivos	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Estructura terciaria de la prolactina.	1
2	Esquema de las siete isoformas conocidas del receptor prolactina humana.	4
3	Principales vías de señalización desencadenadas por isoformas larga y corta del PRL-R.	5
4	Diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ .	10
5	Purificación y caracterización fenotípica de linfocitos T CD4 ⁺ CD25 ^{HI} FOXP3 ⁺ CD127 ^{LOW/-} y T CD4 ⁺ CD25 ⁻ FOXP3 ⁻ CD127 ⁺ .	27
6	Capacidad funcional de linfocitos T _{reg} <i>in vitro</i> .	28
7	Expresión de RNAm del PRL-R en linfocitos T _{reg} CD4 ⁺ CD25 ^{HI} FOXP3 ⁺ CD127 ^{LOW/-} y T _e CD4 ⁺ CD25 ⁻ FOXP3 ⁻ CD127 ⁺ .	30
8	Porcentaje de linfocitos T _{reg} en sangre periférica en pacientes con lupus eritematoso sistémico e individuos sanos.	31
9	Ensayos de proliferación celular de linfocitos T _{reg} y T _e en presencia o ausencia de PRL.	33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Marcadores fenotípicos de Linfocitos T _{reg}	11
2	Mecanismos supresores de Linfocitos T _{reg}	13
3	Ensayos de proliferación celular	23

ABREVIATURAS

APC	Célula Presentadora de Antígeno (<i>Antigen-presenting cell</i>)
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CD	Grupo de Diferenciación (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD25	Cadena α del receptor para Interleucina 2
CD127	Receptor de Interleucina 7
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario (<i>complementary DNA</i>)
CMN	Células Mononucleares
ConA	Concanavalina A
cpm	Cuentas por minuto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
FACS	Separación Celular Activada por Fluorescencia (<i>Fluorescence activated cell sorter</i>)
FOXP3	Factor de transcripción forkhead box P3
IL	Interleucina
INF	Interferón
kDa	Kilodalton
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
MCH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
PBS	Regulador Fosfato Salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PRL	Prolactina
PRL-R	Receptor de Prolactina
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
TCR	Receptor del Linfocito T
T_e	Linfocito T efector
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfocito T cooperador (<i>T helper</i>)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
T_{reg}	Linfocito T regulador

RESUMEN

Diversos estudios han demostrado que la prolactina (PRL) interviene en la modulación de la respuesta inmune, por ejemplo participa en la maduración de los timocitos y regula la producción de citocinas como IL-6, IL-2 e INF- γ . Los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-} (T_{reg}) pueden suprimir funciones de los linfocitos T efectores (T_e), y su alteración se ha implicado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como lupus eritematoso sistémico (LES) el cual se ha asociado con hiperprolactinemia. En este estudio se planteó como objetivo determinar el efecto de la PRL sobre la función de los linfocitos T_{reg} provenientes de individuos sanos y de pacientes con LES. **Metodología:** A partir de sangre periférica de mujeres sanas y con LES, se purificaron los linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LOW/-} y T_e CD4⁺CD25⁻CD127⁺. Determinamos el porcentaje linfocitos T_{reg}, así como la expresión del RNAm del receptor de PRL (PRL-R) en linfocitos T_{reg} y T_e, en individuos sanos y en pacientes con LES. Se realizaron ensayos de proliferación celular en presencia o ausencia de PRL, co-cultivando linfocitos T_{reg} y T_e, y estimulándolos con anticuerpos anti-CD3/CD28. **Resultados:** El porcentaje de linfocitos T_{reg} en sangre periférica de pacientes con LES se encontró disminuido respecto a individuos sanos. Los linfocitos T_{reg} de individuos sanos expresan de manera constitutiva RNAm del PRL-R mientras que los linfocitos T_e no lo expresan. En pacientes con LES los linfocitos T_{reg} y T_e expresaron de manera constitutiva dicho mensajero y se encontró un aumento en la expresión en ambas extirpes celulares de pacientes con LES respecto a los sanos. En los ensayos funcionales los linfocitos T_{reg} de individuos sanos indujeron una inhibición del 53.5 % de la proliferación de linfocitos T_e en co-cultivo, y al adicionar PRL a este co-cultivo, los linfocitos T_e recuperaron su capacidad proliferativa. En contraste, en los ensayos de pacientes con LES, en el co-cultivo T_e:T_{reg} la función supresora de los linfocitos T_{reg} se encontró disminuida (23.7%) con respecto a individuos sanos. **Conclusiones:** 1) La expresión del RNAm del PRL-R es constitutiva en los linfocitos T_{reg} de individuos sanos; 2) El RNAm del PRL-R se expresa constitutivamente en los linfocitos T_{reg} y T_e provenientes de pacientes con LES; 3) La PRL inhibe *in vitro* la función supresora mediada por linfocitos T_{reg} de individuos sanos; 4) El porcentaje de linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-} en sangre periférica se encontró disminuido en pacientes con LES, respecto a individuos sanos; 5) La actividad supresora de los linfocitos T_{reg} *in vitro* se encuentra disminuida en pacientes con LES, respecto a individuos sanos.

INTRODUCCIÓN

Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica secretada por la hipófisis anterior, bajo la inhibición tónica del hipotálamo, a través de la dopamina y estimulada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH). Las citocinas interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2) e interleucina 6 (IL-6) estimulan la secreción de PRL, mientras que el interferón- γ (INF- γ) y la endotelina-3 inhiben su secreción [Chikanza 1999].

En humanos el gen de la PRL está localizado en el cromosoma 6 [Owerbach *et al.* 1981] y tiene 10 Kilobases de tamaño: se compone de 5 exones y 4 intrones [Cooke *et al.* 1981, Truong *et al.* 1984]. La transcripción del gen de la PRL está regulada por dos regiones promotoras independientes, la región proximal de 5000 pares de bases dirige la expresión específica en la hipófisis [Berwaer *et al.* 1991], mientras que la región del promotor río arriba es responsable de la expresión extrahipofisaria [Berwaer *et al.* 1994]. El cDNA humano de PRL tiene 914 nucleótidos de longitud y contiene un marco de lectura abierto de 681 nucleótidos que codifica la pro-prolactina de 227 aminoácidos, mientras que el péptido señal contiene 28 aminoácidos, por lo que la PRL humana madura se compone de 199 aminoácidos y tiene un peso molecular de 23 kiloDalton [Sinha *et al.* 1995].

La PRL es una proteína globular formada por cuatro cadenas α -hélice y dos sitios de unión para el receptor de PRL [Bole-Feysot *et al.* 1998], en los seres humanos está dispuesta en una única cadena de aminoácidos con tres enlaces disulfuro intramoleculares entre seis residuos de cisteína, Cys4-Cys11, Cys58-Cys174 y Cys191-Cys199 (figura 1) [Cooke *et al.* 1981].

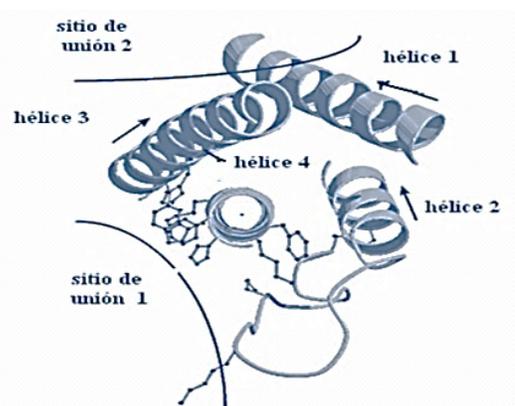


Figura 1. Estructura terciaria de la prolactina. Presenta cuatro dominios alfa hélices y dos sitios de unión a su receptor [Bole-Feysot *et al.* 1998].

Existen tres isoformas de PRL, resultado de modificaciones postraduccionales [Chikanza 1999, Freeman *et al.* 2000]. Las isoformas de PRL son: PRL monomérica libre (little), big PRL y big big PRL (macro). La macro PRL es un complejo de PRL monomérica libre y un anticuerpo de la clase IgG, el peso del complejo es de al menos 150 kiloDalton; comprende hasta el 1% de toda la PRL circulante en el suero sanguíneo, el resto lo compone la forma monomérica y la forma intermedia [Peeva *et al.* 2005, Kostrzak *et al.* 2010]. La isoforma biológicamente más activa es el monómero libre de PRL de 199 aminoácidos [Rivero *et al.* 2011].

La PRL se puede sintetizar en sitios intra o extra-hipofisarios incluyendo neuronas, epitelio mamario, próstata, endotelio y células del sistema inmune: timocitos, células mononucleares de sangre periférica y linfocitos [Zen *et al.* 2010].

Receptor de Prolactina

Todas las actividades de la PRL están mediadas por el receptor de PRL (PRL-R). El PRL-R es miembro de la súper-familia de receptores hematopoyéticos tipo I [Vera-Lastra *et al.* 2002].

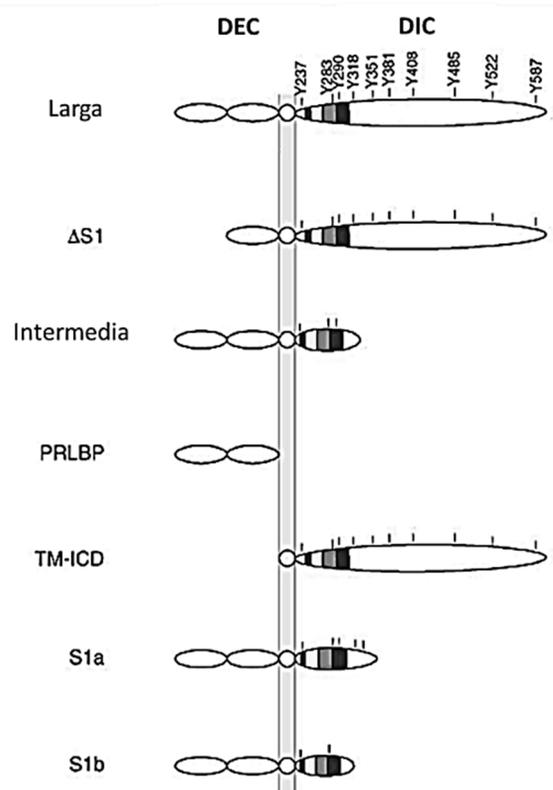
El PRL-R esta expresado en monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, células asesinas naturales (NK), granulocitos y células epiteliales del timo [Bole-Feysot *et al.* 1998, Davis *et al.* 1989, Kline *et al.* 1999, Hu *et al.* 2001, Trott *et al.* 2004].

En el humano el gen que codifica para el PRL-R se encuentra en el cromosoma 5 [Nira *et al.* 2008]. Existen distintas isoformas del PRL-R que son iguales en sus dominios extracelular y transmembranal, difiriendo entre si únicamente en la longitud de su dominio intracelular [Ben *et al.* 2008]. El dominio extracelular, con aproximadamente 200 aminoácidos, tiene analogía con la fibronectina tipo III y se divide en dos subdominios, cada uno de ~100 aminoácidos. El primero presenta dos puentes disulfuro (Cys12-Cys22, Cys51-Cys62) y el segundo un motivo penta péptido denominado WS (Trp-Ser-aa-Trp-Ser) [Freeman *et al.* 2000, Swaminathan *et al.* 2008]. El dominio transmembranal tiene 24 aminoácidos, mientras el intracelular presenta diferentes tamaños y composición dependiendo de la

isoforma del receptor. Existen dos regiones relativamente conservadas en el dominio intracelular: la caja 1, es una región compuesta por 8 aminoácidos muy rica en prolinas y residuos hidrófobos; y la caja 2 que es mucho menos conservada y consiste en una sucesión de residuos hidrófobos cargados negativamente seguida de los residuos cargados positivamente. Mientras que la caja 1 se conserva en todas las isoformas del PRL-R, la caja 2 no se encuentra en las isoformas cortas [Nadine *et al.* 2010].

En el humano se han reportado siete isoformas distintas del PRL-R (figura 2) [Charles *et al.* 2009]. El PRL-R largo está compuesto de un dominio extracelular necesario para la unión al ligando, una región transmembranal y un dominio intracelular que contiene una región proximal a la membrana, homóloga a otros receptores de citocinas [Nadine *et al.* 2010]. El PRL-R corto está compuesto por 310 aminoácidos y la forma larga por 610 aminoácidos [Boutin *et al.* 1989, Zhang *et al.* 1990]. La isoforma intermedia de 412 aminoácidos, es resultado de una delección de 198 aminoácidos en el dominio intracelular de la isoforma larga [Ali *et al.* 1991]. Las isoformas intermedias y $\Delta S1$ se generan a partir de un empalme alternativo que resulta en la eliminación de una parte del dominio intracelular o por delección de una porción del dominio extracelular, respectivamente. Dos isoformas cortas, S1a y S1b, también se generan mediante corte y empalme alternativo [Charles *et al.* 2009]. La proteína de unión a PRL (PRLBP) representa la porción libre en circulación del dominio extracelular de la isoforma larga y surge de un evento proteolítico en lugar de un evento de empalme [Kline-Clevenger *et al.* 2001]. Además, un anticuerpo específico para el PRL-R reconoce el dominio transmembranal y el dominio intracelular de longitud completa y esta isoforma se denomina TM-ICD [Gadd & Clevenger 2006]. Dicha isoforma es quizás generada en la escisión proteolítica que libera la PRLBP [Charles *et al.* 2009].

Figura 2. Esquema de las siete isoformas conocidas del receptor prolactina humana. Dominios extracelulares e intracelulares se indican mediante "DEC" y "DIC", respectivamente. El único dominio transmembranal está representado por el círculo pequeño dentro de la membrana. Designaciones en el DIC representan los residuos de tirosina conocidos en el PRL-R, y las franjas negras representan la caja 1, V-Box, Box 2 y X-Box (de izquierda a derecha) [Modificado de Charles *et al.* 2009].



Señalización de la PRL a través de su receptor

El acontecimiento inicial en la señalización es la unión de una molécula de PRL a dos monómeros del PRL-R de superficie celular, lo que induce su dimerización y posterior activación. La unión del ligando resulta en la fosforilación rápida del dominio intracelular del PRL-R y la activación de vías de señalización [Clevenger *et al.* 2009]. A través del PRL-R largo, la PRL activa varias vías de señalización intracelular, incluyendo Jak2/Stat, Src cinasa, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt, proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y Nek3-Vav2 Rac1 (figura 3) [Goffin *et al.* 2002, Clevenger *et al.* 2003, Swaminathan *et al.* 2008, Berlanga *et al.* 1997, Bole-Feysot *et al.* 1998, Clevenger 2004]. Estos eventos de señalización inducen la expresión de varios genes implicados en la proliferación celular (ciclina D1 y la citocina inducible con dominios SH2) y diferenciación [Brockman *et al.* 2002, Fang *et al.* 2008]. La PRL a través del PRL-R corto solo puede activar las vías MAPK y PI3K (figura 3) [Kline *et al.* 2001].

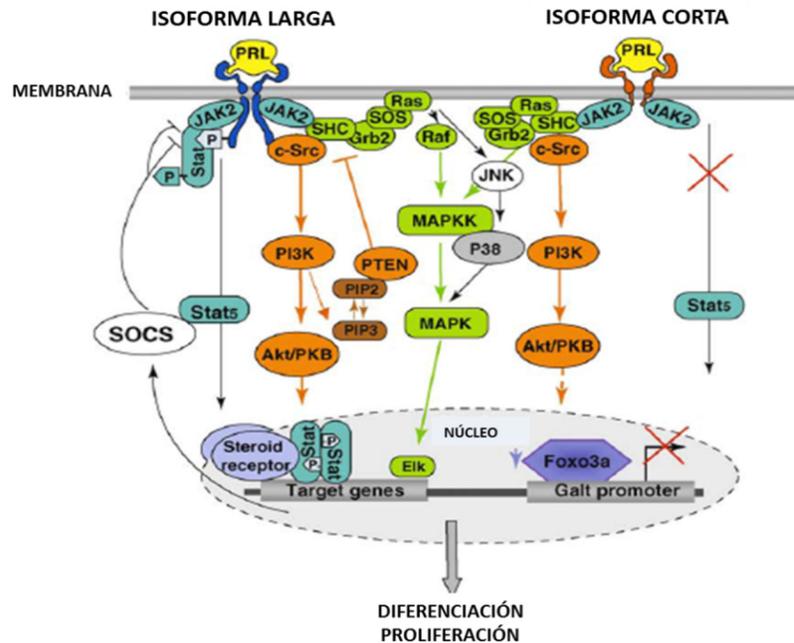


Figura 3. Principales vías de señalización desencadenadas por isoformas larga y corta del PRL-R. PRL induce la activación del PRL-R que desencadena varias cascadas de señalización. La principal vía implica la tirosina quinasa JAK2, que a su vez activa dos miembros de la familia STAT, STAT5a y Stat5b. La ruta de MAPK es otra vía importante, se trata de los intermediarios Shc/Grb2/Sos/Ras/Raf rio arriba hasta quinasas MAPK. El reclutamiento de PI3K conduce a la producción de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol difosfato (PIP2). Como un regulador negativo de la PI3K, la fosfatasa PTEN convierte PIP3 a PIP2 y Akt es reclutado para PIP3. Otras vías de señalización reportadas es de las cinasas Src, que se sabe juegan un papel importante en la proliferación [Modificado de Nadine *et al.* 2010].

Prolactina y el Sistema Inmune

Se han descrito más de 300 actividades biológicas distintas atribuidas a la PRL y pueden subdividirse en las siguientes categorías: 1) reproducción, 2) osmorregulación, 3) desarrollo y crecimiento, 4) metabolismo de carbohidratos y lípidos, y 5) particularmente inmunoregulación [Bole-Feysot *et al.* 1998].

El papel de la PRL en la modulación del sistema inmune se comenzó a describir en 1930, cuando Smith observó que el timo de ratas sufría un proceso de atrofia después de realizarles hipofisectomía [Smith 1930]. 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 reestablecieron la actividad inmunológica [Nagy & Berci 1978].

En 1983 se realizaron experimentos utilizando bromocriptina (agonista dopaminérgico) inhibiendo 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 suspender el tratamiento con bromocriptina [Nagy *et al.* 1983].

El bloqueo de PRL con un anticuerpo específico inhibe 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 [Hartmann *et al.* 1989]. La adición de PRL exógena evita la acción inhibitoria del anticuerpo en cultivos de linfocitos, además, en combinación con IL-2, fitohemaglutinina o concanavalina A estimula la proliferación de linfocitos T y B [Montgomery *et al.* 1987].

PRL participa en la regulación de la maduración de los timocitos CD4⁻CD8⁻ a linfocitos T CD4⁺CD8⁺ a través de la expresión del receptor de IL-2 [Moreno *et al.* 1998]. Aumenta significativamente la expresión de CD69, CD25 y CD154 en células dendríticas [Matera *et al.* 2000]. El bloqueo de la PRL autócrina con un anticuerpo anti-PRL disminuye la expresión de CD69 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ activados con PMA [Chávez-Rueda *et al.* 2005a]. Además, PRL incrementa la expresión de moléculas del MHC de clase II y moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno (APC) [Matera *et al.* 2001]. Por otro lado, la hiperprolactinemia afecta la maduración de células dendríticas, favoreciendo un fenotipo pro-inflamatorio con el aumento de la producción de INF- α [Jara *et al.* 2008].

La PRL también regula la producción de IL-6, INF- γ e IL-2 [Cesario *et al.* 1994, Vidaller *et al.* 1986, Jara *et al.* 1998]. Linfocitos T activados con PMA e incubados con anticuerpos anti-PRL presentan una disminución en la secreción de IL-2 e INF- γ [Chávez-Rueda *et al.* 2005b]. Mientras que la producción de prolactina por los linfocitos T está regulada por citocinas, tanto IL-2 como IL-4 reducen los niveles de RNAm de prolactina en linfocitos T [Gerlo *et al.* 2005].

Se ha reportado que niveles elevados de PRL interfieren con la inducción de tolerancia de linfocitos B al afectar la delección clonal mediada por el receptor del linfocito B (BCR), desregular la edición de receptor y disminuir el umbral para la activación de los linfocitos B anérgicos, promoviendo así la auto reactividad y el desarrollo de autoinmunidad [Saha *et al.* 2009, Saha *et al.* 2011].

Hiperprolactinemia y Enfermedades Autoinmunes

La hiperprolactinemia puede ser originada por diversas causas, entre ellas tumores hipofisarios, estrés, lactancia, embarazo, medicamentos, insuficiencia renal y hepática, hipotiroidismo, prolactinomas, etc. [Bolyako *et al.* 2011].

Estudios en pacientes con hiperprolactinemia asociada a diversas etiologías han sugerido un aumento en la concentración de autoanticuerpos (incluyendo antitiroideos, anti-dsDNA, anti-Ro, anticardiolipina y anticuerpos antinucleares ANA), aunque sin evidencia clínica de enfermedad autoinmune [Ishibashi *et al.* 1991, Buskila *et al.* 1995, Walker *et al.* 2000]. Se ha descrito hiperprolactinemia en diversas enfermedades autoinmunes órgano-específicas como la diabetes mellitus tipo I, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, hipofisitis linfocítica, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, miocardiopatía y uveítis y en enfermedades autoinmunes sistémicas como el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis reactiva, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, psoriasis, enfermedad de Behcet y polimiositis [Chikanza *et al.* 1996, Orbach *et al.* 2007, Cejkova *et al.* 2009].

Prolactina y Lupus Eritematoso Sistémico

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es el prototipo de enfermedad autoinmune, caracterizada por una excesiva producción de autoanticuerpos, formación de complejos inmunes y daño tisular mediado por mecanismos inmunológicos. Puede presentarse en cualquier edad, pero por lo general afecta a mujeres entre los 16 y los 55 años. La relación mujer-hombre presenta variaciones asociadas con la edad, pues mientras que es de 7 a 1 en los niños y de 9 a 1 entre los adultos jóvenes, en personas de edad avanzada es de 5 a 1 [Cervera *et al.* 1993].

El LES se caracteriza por manifestaciones clínicas multisistémicas, y pueden presentarse del tipo mucocutáneas (eritema malar, fotosensibilidad, alopecia, vasculitis, urticaria, úlceras orales y nasales), neuropsiquiátricas (síndrome orgánico-cerebral, alteraciones visuales, psicosis, convulsiones, cefalea lúpica), pulmonares (pleuritis), cardíacas (pericarditis, miocarditis, endocarditis), renales (hematuria, cilindruria, proteinuria, piuria, insuficiencia renal), musculoesqueléticas (artralgias, artritis, miositis) y digestivas (peritonitis aséptica, pancreatitis), así como alteraciones hematológicas (anemia, leucopenia, linfopenia y trombocitopenia) e inmunológicas (anticuerpos ANA, anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-histonas, anti-Ro, anti-La, anti-fosfolípido y anticuerpos anticardiolipinas) [García J. & Molina C].

La patogénesis del LES aun es desconocida. Lo que está claro, es que participan diversos factores, incluyendo ambientales, genéticos, hormonales e inmunológicos [Alarcón-Segovia *et al.* 2006].

Dentro de los factores ambientales podríamos destacar la exposición solar, los virus (fundamentalmente el Epstein-Barr y el citomegalovirus), diversos fármacos (derivados de las sulfas, antiarrítmicos, entre otros), siempre y cuando dichos factores afecten a un individuo genéticamente susceptible de desarrollar la enfermedad [Gómez-Puerta *et al.* 2008].

Se han identificado genes que se relacionan con una mayor susceptibilidad para el desarrollo del LES, que están asociados con la respuesta inmune e inflamación (HLA-DR, PTPN22, STAT4, IRF5, BLK, OX40L, FCGR2A, BANK1, SPP1, IRAK1, TNFAIP3, C2, C4, CIQ, PXX), reparación del ADN (TREX1), adhesión de células inflamatorias al endotelio (ITGAM), y la respuesta de los tejidos a la lesión (KLK1, KLK3). Algunos de los loci genéticos puede explicar la susceptibilidad a la enfermedad y su gravedad. Por ejemplo, STAT4, un factor de riesgo genético para la artritis reumatoide y el LES, se asocia con lupus grave. TNFAIP3 ha sido implicado en por lo menos seis trastornos autoinmunes, incluyendo LES [Bertsias & Cervera].

Actualmente, la asociación más evidente entre la PRL y autoinmunidad es en LES. En una serie de estudios, se ha demostrado que pacientes con LES presentan una mayor frecuencia de hiperprolactinemia (hasta el 40%) y estos niveles de PRL elevados se han correlacionado con la actividad clínica de la enfermedad [Blanco *et al.* 1999], así como con títulos altos de anticuerpos ANA y anti-dsDNA [Mann 2011, Colao 2011, Hoffman *et al.* 2011, Serri *et al.* 2003].

La terapia convencional con inmunosupresores, glucocorticoides e hidroxicloroquina en pacientes con LES ha demostrado reducir los niveles de PRL en correlación directa con la disminución de la actividad del LES [Rezaieyazdi *et al.* 2006]. Existe evidencia, tanto en modelos animales como en humanos, del efecto terapéutico de la bromocriptina; la inhibición de la secreción de PRL por el fármaco disminuyó los títulos de anticuerpos anti-dsDNA y mejoró la supervivencia de ratones propensos a desarrollar lupus [Saha *et al.* 2011, McMurray *et al.* 1991, Blank *et al.* 1995, Walker 2001]. Estudios controlados de tratamiento con bromocriptina en pacientes con LES apoyan la eficacia potencial de tales agentes, incluso durante el embarazo y el postparto [Jara *et al.* 2011]. En dos estudios de terapia con bromocriptina en pacientes con LES redujeron significativamente los índices de actividad de la enfermedad [McMurray *et al.* 1995, Alvarez-Nemegyei *et al.* 1998].

El desequilibrio en la homeostasis del sistema inmune es un evento importante en la patogénesis del LES, resultando en la desregulación de linfocitos B y T hiperactivos, remoción defectuosa de células apoptóticas, complejos inmunes, y pérdida de la tolerancia inmune, lo que conduce a la producción de autoanticuerpos y complejos inmunes [Mok *et al.* 2003]. El LES se considera un trastorno mediado por linfocitos B debido a la naturaleza patógena de los autoanticuerpos y porque la enfermedad no se desarrolla en la ausencia de linfocitos B [Shlomchik *et al.* 1994]. Sin embargo, los linfocitos T autorreactivos, que promueven el cambio de isotipo, la hipermutación somática y la participación de los linfocitos T_{reg} en el mantenimiento de la homeostasis inmune, pueden tener un papel importante en la patogénesis del LES.

Linfocitos T

Los precursores de los linfocitos T se originan en la médula ósea y migran a través de la sangre hacia el timo, donde sufren procesos de desarrollo y diferenciación. En la corteza tímica, los precursores de linfocitos T $\alpha\beta$ expresan el TCR y los co-receptores CD4 y CD8. Los procesos de selección eliminan a los linfocitos T autorreactivos en la corteza en el estadio de dobles positivos (DP) y también a los timocitos medulares simples positivos (SP). Se promueve la supervivencia de los timocitos cuyo TCR se une a moléculas propias del MHC con baja afinidad. La diferenciación funcional y fenotípica en linfocitos T $CD4^+CD8^-$ o $CD4^+CD8^+$ tiene lugar en la médula, y los linfocitos T maduros salen a circulación [Abbas *et al* 2012].

Los linfocitos T $CD4^+$ se diferencian en una amplia variedad de células efectoras dependiendo de la naturaleza de las señales que reciben durante su desarrollo en un ambiente de citocinas particular, principalmente en: linfocitos T $CD4^+$ cooperadores (T_H), entre los más importantes se encuentran T_H1 , T_H2 , T_H17 y particularmente linfocitos T reguladores (figura 4) [Murphy 2007].

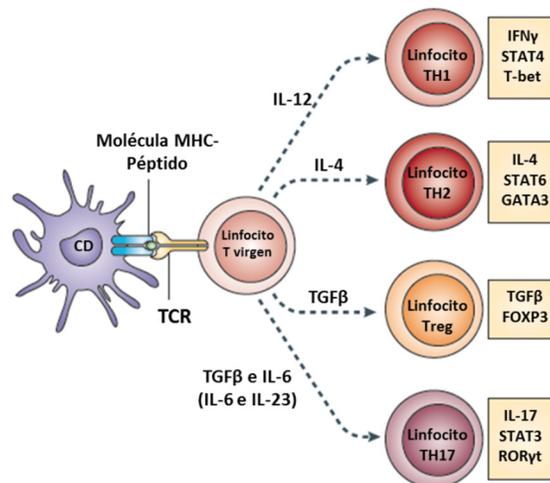


Figura 4. Diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+$ [Modificado de Weiping-Restilo 2010].

Linfocitos T reguladores (T_{reg})

Los linfocitos T reguladores (T_{reg}) constituyen aproximadamente el 10% de los linfocitos T CD4⁺ periféricos y son necesarios para el mantenimiento de la homeostasis inmune [Wing 2010, Rudensky 2011]. Los linfocitos T_{reg} derivados del timo expresan constitutivamente el factor de transcripción forkhead box P3 (FOXP3) y CD25 (cadena α del receptor de IL-2), entre otros marcadores fenotípicos (tabla 1) [Jane 2010].

Tabla 1: Marcadores fenotípicos de Linfocitos T _{reg}						
Factor de transcripción	Activación y memoria	Homing y Origen	Función supresora y efectoras		Apoptosis, supervivencia u otro	
FOXP3	CD45RA CD45RO CD25 HLA-DR Pérdida CD127 CD69	CD62L CCR4 CCR6 CCR9 CD103 CD304 CD31 Perdida de CD49d	CTLA4 ICOS CD39–CD73 LAP Granzima B Galectina 1 Galectina 10	TRANCE CD80 y CD86 IL-10 IL-17 CD2 Perdida de IL-2	CD27 OX40 CD95 PD1 GITR Galectina 3	GARP MS4A4B IL-1R CD6
CCR, receptor de quimiocinas CC; CTLA4, antígeno de linfocitos T citotóxicos 4; FOXP3, forkhead box P3; GARP, repeticiones predominantes glicoproteína A; GITR, glucocorticoides inducida por proteína relacionada receptor de TNF; ICOS, co-estimulador inducible de células T; IL , interleucina; LAP, péptido asociado a latencia; MS4A4B, miembro 4B de subfamilia A de 4 dominios transmembranales., PD1, muerte celular programada 1; R, receptor; TRANCE, citocina inducida por la activación relacionada con TNF; Treg, T reguladores [Fuente: Shimon <i>et al</i> 2010].						

Subpoblaciones de Linfocitos T_{reg}

Las subpoblaciones de linfocitos T_{reg} se definen por su origen, función, expresión de marcadores de superficie celular y la expresión del FOXP3 [Jane 2010].

Los linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ se pueden dividir en dos subgrupos: los derivados del timo (naturales) y los inducidos en periferia (adaptativos). Ambas poblaciones expresan FOXP3 y suprimen las respuestas inmunes a través de mecanismos dependientes de contacto y la producción de factores solubles, incluyendo citocinas como TGF-β, IL-10 e IL-35 [Sakaguchi *et al.* 2010, Vignali

2008]. Los linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ naturales son estables con respecto a la retención de la función reguladora y la expresión de FOXP3 en periferia. Como características únicas es que su locus FOXP3 está desmetilado [Janson *et al.* 2008] y expresan el factor de transcripción Helios [Thornton *et al.* 2010]. Los linfocitos T_{reg} CD4⁺FOXP3⁺ adaptivos puede ser inducidos en periferia a partir de una población de linfocitos T CD4⁺FOXP3⁻ después de la estimulación del TCR en presencia de TGF-β. Estas células expresan los mismos marcadores de superficie que los linfocitos T_{reg} naturales y se pueden distinguir de los linfocitos T_{reg} naturales en base a los patrones de metilación del locus FOXP3 y su falta de expresión de Helios [Jane 2010].

Además de los linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ se ha demostrado que otros linfocitos T también que poseen actividad reguladora y pueden, al menos en ciertas condiciones, prevenir la autoinmunidad en roedores [Jiang 2006]. Los linfocitos T reguladores Tipo 1 (T_{r1}), linfocitos T cooperadores 3 (T_{H3}), linfocitos T CD4⁻CD8⁻ y T CD8⁺CD28⁻ son reguladores adaptativos, es decir, adquieren las funciones de regulación después de la estimulación antigénica específica en un microambiente de citocinas particular. Por lo tanto, contrastan con los linfocitos T_{reg} naturales, quienes salen de timo como una subpoblación de linfocitos T con función supresora especializada [Jane 2010]. Los linfocitos T_{r1} son inducidos en la periferia por la IL-10, y tienen la función de suprimir la proliferación de linfocitos T a través de la producción de IL-10 y el TGF-β [Groux *et al.* 1996], no tienen un marcador específico, pero éstos pueden identificarse por su producción de IL-10 y no de citocinas pro-inflamatorias [Jane 2010]. Los linfocitos T_{H3} se origina en la periferia y median la supresión a través de la secreción de TGF-β; no tienen un marcador de superficie celular específico [Weiner 2001].

Función de los Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T_{reg} pueden suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras (como la producción de citocinas) de una amplia gama de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, células asesinas naturales (NK), células NKT, linfocitos B y APC tanto *in vitro* como *in vivo* [Sakaguchi *et al.* 2008].

Esta capacidad de controlar la respuesta inmune hace que los linfocitos T_{reg} sean esenciales para: a) prevención de enfermedades autoinmunes, inmunopatologías y alergias; b) regular la respuesta inmune contra infecciones de origen viral, bacteriano o parasitario; c) mantener la homeóstasis intestinal, así como la tolerancia del aloinjerto y la tolerancia materno-fetal durante el embarazo [Baecher *et al.* 2006, Belkaid, *et al.* 2007]. Los linfocitos T_{reg} también pueden suprimir la respuesta inmune antitumoral y favorecer la progresión del tumor [Jane 2010, Nishikawa *et al.* 2010].

Mecanismos de Supresión de los Linfocitos T_{reg}

Los mecanismos moleculares de supresión utilizados por los linfocitos T_{reg} incluyen los dependientes de contacto y mediados por citocinas, que se describen brevemente en la tabla 2 [Shimon *et al.* 2010].

Tabla 2. Mecanismos supresores de los linfocitos T _{reg}	
Molécula	Función
Mecanismos de supresión dependientes de contacto	
CTLA4	Desregulación de la función co-estimuladora de la APC mediante inducción indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) al interactuar con CD80/CD86.
CD73-CD39	Ectoenzimas que generan adenosina pericelular y suprime la función de los linfocitos T convencionales induciendo la activación del receptor de adenosina 2A.
LAG3	Induce una señalización inhibitoria al unirse a moléculas MHC de clase II en la célula dendrítica inmadura, lo cual inhibe su maduración y capacidad inmunoestimuladora.
Granzima A	Inducción de la apoptosis en linfocitos T convencionales.
CD95-CD95L	Inducción de la apoptosis en linfocitos T convencionales.
Mecanismos de supresión mediada por citocinas	
TGF-β	Inducción de FOXP3 en linfocitos T naive. Inhibe la proliferación y funciones efectoras de linfocitos T convencionales, y la activación de macrófagos. Promueve la reparación de tejido después de una reacción inflamatoria
IL-10	Inhibe la producción de IL-12 en células dendríticas y macrófagos. Inhibe la expresión de moléculas de co-estimulación y MHC clase II en células dendríticas y macrófagos. Conversión de los linfocitos T naive a linfocitos T _R 1.
Galectina 1	Detiene ciclo celular e induce la apoptosis en los linfocitos T convencionales.
CD25	Disrupción metabólica de linfocitos T convencionales por su alta afinidad a la IL-2.
IL-35	Mejora la función supresora de los linfocitos T _{reg} , el mecanismo aún queda por aclararse.
APC, célula presentadora de antígeno; CTLA4, antígeno de linfocitos T citotóxicos 4; FOXP3, forkhead box P3; IL, interleucina; LAP, péptido asociado a latencia; T _{reg} , T reguladores; LAG3, gen de activación de linfocitos 3 [Modificado de Shimon <i>et al.</i> 2010].	

Linfocitos T reguladores y Autoinmunidad

La alteración de la función y/o la homeostasis de los linfocitos T_{reg} se ha implicado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo la diabetes tipo 1, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y el lupus eritematoso sistémico [Horwitz 2008, Viglietta *et al.* 2004, Ehrenstein *et al.* 2004, Lindley *et al.* 2005].

La mutación en el gen de FOXP3 en humanos conduce al desarrollo de síndrome IPEX (immunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía, síndrome ligado al cromosoma X) [d'Hennezel *et al.* 2009, Ochs *et al.* 2007].

Factores que afectan la función de los linfocitos T_{reg} en autoinmunidad

La disfunción de los linfocitos T_{reg} en autoinmunidad puede ser debido a un defecto en uno de los mecanismos de supresión de linfocitos T_{reg} [Vignali *et al.* 2008]. Esto podría ocurrir a través de la expresión inadecuada de las moléculas involucradas en la supresión dependiente de contacto tales como CTLA4, CD39, LAG3, granzima A y CD95 o como resultado de una deficiente producción de factores solubles como TGF- β , IL-10 e IL-35 [Jane 2010]. Además el microambiente local que influye el tipo de APCs y de citocinas tales como TNF, IL-4, IL-6, IL-12, IL-7, IL-15 e IL-21 puede alterar la función de linfocitos T_{reg} [Korn *et al.* 2007, Valencia *et al.* 2006, Thornton *et al.* 2004, King *et al.* 2005, Ben *et al.* 2009, Clough *et al.* 2008].

Se han propuesto mecanismos de resistencia de los linfocitos T_e al efecto regulador de los linfocitos T_{reg} y se han demostrado en los linfocitos T CD4⁺ de memoria y linfocitos T_H17 [Walker 2009, Yang *et al.* 2007.]. La IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 inducen la proliferación de linfocitos T_e aun en presencia de linfocitos T_{reg}, a pesar de los efectos favorables de estas citocinas en la homeostasis de los linfocitos T_{reg}, la presencia de las mismas en cierto plazo permite que los linfocitos T_e eviten la supresión de los linfocitos T_{reg} [Yates *et al.* 2007].

Linfocitos T reguladores y Lupus Eritematoso Sistémico

En el LES existen muchos tejidos diana y en gran medida es una enfermedad mediada por las células B. Sin embargo, la deficiencia de linfocitos T_{reg} en ratones conduce la aparición de una enfermedad autoinmune sistémica que se asemeja al LES, caracterizado por glomerulonefritis y anticuerpos específicos contra ADN. Estos hallazgos indican que la falta de supresión mediada por linfocitos T_{reg} puede tener un papel relevante en LES [Sakaguchi *et ál.* 1995].

Algunos estudios han cuantificado el número de linfocitos T_{reg} en sangre periférica de individuos con LES [Gerli *et al.* 2009]. La mayoría han mostrado que el porcentaje de linfocitos CD4⁺CD25^{HI} está disminuido en pacientes con LES. Esta disminución de linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25^{HI} correlaciona inversamente con la actividad de la enfermedad [Crispin *et al.* 2003, Miyara *et al.* 2005, Mellor-Pita *et al.* 2006, Suen *et ál* 2009, Lee *et al.* 2006], aunque existe controversia dado que otros estudios no encuentran correlación alguna [Liu, M. F. *et al.* 2004] y en algunos casos incluso han encontrado incrementado el número de linfocitos T_{reg} [Venigalla, R. K. *et al.* 2008].

La función de los linfocitos T_{reg} en pacientes con LES ha sido evaluada por varios grupos y la mayoría de los estudios funcionales han demostrado un defecto en la actividad supresora, principalmente sobre la inhibición de la proliferación de linfocitos T_e. Este defecto en la supresión se ha correlacionado con la actividad de la enfermedad [Venigalla R.K. *et al.* 2008, Alvarado-Sánchez B. *et al.* 2006] y se ha atribuido tanto a las APCs como a los linfocitos T_{reg}. Otros estudios realizados han demostrado que los linfocitos T_e pueden evadir la supresión en pacientes con LES [Venigalla R. K. *et al.* 2008, Vargas-Rojas *et al.* 2008].

Los linfocitos T_{reg} constituyen un mecanismo importante de tolerancia periférica, su eliminación ha sido implicada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el LES, por otra parte en el LES se han reportado defectos en el número y función de los linfocitos T_{reg} , así como la resistencia de los linfocitos T_e a la supresión. El efecto de la PRL sobre la respuesta inmune es evidente. Sin embargo, su acción sobre la función de los linfocitos T_{reg} aún queda por estudiarse. Y en conjunto, estos factores podrían tener un papel importante en la patogénesis del LES.

JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han demostrado que la PRL tiene un papel importante en la modulación de la respuesta inmune. Por ejemplo aumenta la producción de citocinas y modula el desarrollo y diferenciación de progenitores de linfocitos T. Por otro lado, la alteración de la función y/o la eliminación de los linfocitos T_{reg} está implicada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, que además se han asociado con hiperprolactinemia, entre éstas se incluye el LES. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales actúa la PRL como modulador de la respuesta inmune, así como su participación en enfermedades autoinmunes como LES y particularmente en la función de los linfocitos T_{reg}, aún no han sido descritos. Por lo que resulta importante determinar el papel de la PRL en la función reguladora mediada por los linfocitos T_{reg} en individuos sanos y pacientes con LES.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}) pueden suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras de una amplia gama de células del sistema inmune, particularmente linfocitos T CD4⁺ efectoras. Sabiendo que la PRL modula la respuesta inmune, podría ser que ésta interviniera en la función reguladora mediada por los linfocitos T_{reg}. Por lo que nuestro estudio está orientado a determinar el efecto de la PRL sobre la función reguladora de los linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}) provenientes de individuos sanos y pacientes con LES.

HIPÓTESIS

Los linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LOW/-}) provenientes de pacientes con LES presentarán una menor capacidad reguladora *in vitro* en respuesta al estímulo con PRL en comparación con individuos sanos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la PRL sobre la función reguladora de los linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}) provenientes de individuos sanos y pacientes con LES.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la expresión del RNA mensajero del receptor de PRL en linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}) y T_e (CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻CD127⁺) provenientes de individuos sanos y de pacientes con LES.
2. Comparar el porcentaje de linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}) en sangre periférica provenientes de individuos sanos y pacientes con LES.
3. Comparar *in vitro* la función reguladora mediada por los linfocitos T_{reg} provenientes de individuos sanos y pacientes con LES, por medio de ensayos de proliferación celular en presencia o ausencia de PRL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Población en Estudio

Se incluyeron mujeres con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico. El grupo de mujeres sanas pareadas por edad se reclutó de banco de sangre. Ambos grupos se sometieron a una valoración médica integral por un médico reumatólogo.

Grupos de Estudio

- Grupo A: Mujeres sanas, que cumplieron con los criterios de inclusión.
- Grupo B: Mujeres con diagnóstico de LES con o sin actividad de la enfermedad, que cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de Inclusión

- Grupo A:
 1. Mujeres sanas sin antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo.
 2. Edad entre 18 y 45 años.
 3. Que aceptaron participar en el estudio.
- Grupo B:
 1. Mujeres con diagnóstico de LES que cumplieron con por lo menos cuatro criterios de la Asociación Americana de Reumatología [American College of Rheumatology Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus].
 2. Sin antecedentes de enfermedad neoplásica, inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo.
 3. Edad entre 18 y 45 años.

4. Con o sin actividad de la enfermedad evaluada por el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI).
5. Sin tratamiento con algún inmunosupresor en las últimas 9 semanas previas al estudio.

Criterios de Exclusión:

- Grupo A y B
 1. Negativa a firmar consentimiento informado

Criterios de Eliminación.

- Grupo A y B
 1. Sujetos en los que no se logró obtener el número necesario de linfocitos T_{reg} para cumplir con las expectativas de nuestro modelo experimental.

Hormona

PRL Hipofisiaria Humana donada por el National Hormone & Pituitary Program (USA).

Anticuerpos

Anti-human CD4 FITC (eBioscience, USA), anti-human CD25-PE (Miltenyi Biotec, Germany), anti-human Foxp3-APC (eBioscience, USA) y anti-human CD127-APC (eBioscience, USA), para determinar el fenotipo celular y discriminar entre linfocitos T_{reg} y linfocitos T_e.

Separación de Células Mononucleares

Se obtuvo sangre periférica por punción venosa con vacutainer, la toma se realizó por la mañana antes de las 10 AM y con ayuno previo de 8 h. La sangre se diluyó en Solución Salina Isotónica (NaCl 0,9%) en una relación de 1:2, se estratificó en un gradiente de densidad en 2.5 mL Lymphoprep (Axis Shield, Norway) por cada 7 mL de sangre diluida, se centrifugó a 2000 rpm por 30 minutos. Las células mononucleares (CMN) se recolectaron de la interfase. Se lavaron dos veces con

Solución Salina Isotónica a 900 rpm 15 minutos y a 1200 rpm 10 minutos, y además de un lavado con amortiguador MACS (PBS 1X, BSA 0,5 %, EDTA 2mM) previo a la purificación de linfocitos T_{reg} y T_e. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano (Bio Whittaker, USA) y se utilizaron las células con viabilidad mayor del 90 %.

Purificación de Linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺

Para la purificación se utilizó el “CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} Regulatory T Cell Isolation Kit II”(Miltenyi Biotec, Germany). A partir de CMN de sangre periférica y mediante un proceso de selección negativa se separaron los linfocitos CD4⁺ que son CD127^{LOW/-} marcando las células CD4⁻ y CD127^{HI} con anticuerpos unidos a perlas magnéticas. Primero las CMN se lavaron con amortiguador MACS (PBS 1X, BSA 0,5 %, EDTA 2mM) centrifugando 10 min a 1200 rpm, se aspiró el sobrenadante y se adicionaron por cada 10⁷ células totales 10 µL del “Cocktail” de anticuerpos biotinilados dirigidos contra CD8, CD19, CD123 y CD127, se incubaron durante 10 min a 4 °C. Se adicionaron 20 µL de anticuerpo anti IgG1 de ratón unido a perlas magnéticas por cada 10⁷ células totales, se incubaron durante 15 min/4 °C. Las células se lavaron con amortiguador MACS centrifugando 10 min a 1200 rpm, se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µL de amortiguador MACS previo a pasar por una columna de separación MACS LD (Miltenyi Biotec, Germany). Posteriormente, los linfocitos T CD4⁺CD127^{LOW/-} obtenidos son marcados directamente con 10 µL de microperlas magnéticas anti-CD25 por cada 10⁷ células totales e incubados 15 min/4°C. Las células se lavaron con amortiguador MACS centrifugando 10 min a 1200 rpm, se aspiró el sobrenadante, se resuspendieron las células en 500 µL de amortiguador MACS y se hicieron pasar por una columna de separación MACS MS (Miltenyi Biotec, Germany). Los linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} son obtenidos por selección positiva, mientras que los linfocitos T CD4⁺CD25⁻CD127⁺ por selección negativa.

A fin de optimizar la pureza de los linfocitos T CD4⁺CD25⁻CD127⁺, se realizó un paso adicional de enriquecimiento de linfocitos T CD4⁺ por selección negativa utilizando el “CD4⁺ T cell Isolation Kit II” (Miltenyi Biotec, Germany): se adicionaron 10 µL del “Cocktail” de anticuerpos Biotinilados (anti-CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, CD235a, glicoporina A, TCRγ/δ) por cada 10⁷ células totales, se incubaron durante 10 min a 4°C y posteriormente se adicionaron 20 µL perlas magnéticas anti-biotina por cada 10⁷ células totales, incubando 15 min a 4°C. Las células se lavaron con amortiguador MACS (1200 rpm durante 10 min), se aspiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µL de amortiguador MACS previo a pasar por una columna de separación MACS LS (Miltenyi Biotec, Germany).

Se tomaron muestras de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺ purificados, se lavaron con amortiguador FACS (PBS 1X, BSA 0.05%, EDTA 2mM, azida de sodio) centrifugamos a 1500 rpm durante 5 min y se marcaron con anticuerpos para su caracterización fenotípica final.

Tinción superficial de los Linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺

Las muestras de linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺ purificados se marcaron para su caracterización fenotípica con anticuerpos monoclonales anti CD4-FITC, anti CD25-PE y anti CD127-APC, se incubaron durante 20 min/4 °C en oscuridad, se lavaron con amortiguador FACS (PBS 1X, BSA 0.05%, EDTA 2mM, azida de sodio) centrifugando a 1500 rpm durante 5 min y se fijaron con 50 µL p-formaldehído 2% (incubamos 5 minutos a 4°C en oscuridad). Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo en FACS Aria™ II (BD Bioscience, USA) y se analizaron con el programa FlowJo 7.5 (Tree Star Ashland, USA) para discriminar entre linfocitos T CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺.

Tinción Intracelular para FOXP3 de Linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺

Para la tinción intracelular de FOXP3 se utilizó “Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set” (eBioscience, USA). A las muestras por separado de linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺ purificados, se les adicionó 1 mL de la solución Fixation/Permeabilization (1 parte del Concentrado con 3 partes del Diluyente) y se incubaron 1 hora a 4°C. Posteriormente se lavaron dos veces con 1 mL de Permeabilization Buffer (1X), marcamos con un anticuerpo anti-FOXP3, incubamos durante 30 min/4°C en oscuridad y lavamos con amortiguador FACS (PBS 1X, BSA 0.05%, EDTA 2mM, azida de sodio). Finalmente se marcaron con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD25, incubamos durante 30 min/4°C en oscuridad, se lavaron con amortiguador FACS centrifugando a 1500 rpm durante 5 min y se fijaron con 50 µL p-formaldehído al 2% (5 minutos a 4°C en oscuridad). Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo FACSAria™ II (BD Bioscience, USA) y se analizaron con el programa FlowJo 7.5 (Tree Star Ashland, USA) para discriminar entre linfocitos T CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺ y T CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻.

Ensayos de Proliferación Celular

Los ensayos de proliferación celular se realizaron por triplicado en placas de microcultivo de 96 pozos de fondo redondo (Nunc, Demark). Los linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-}) 4.0x10⁴ células/50µL y T_e (CD4⁺CD25⁻CD127⁺) 8.0x10⁴ células/50µL se co-cultivaron utilizando medio AIM-V (Gibco, USA) como testigo negativo y con estímulo mitogénico (anti-CD3 [2.5 µg/mL]/ anti-CD28 [2 µg/mL]) en presencia o ausencia de PRL humana en las siguientes condiciones de cultivo:

Medio	+	+	+	+
Anti-CD3/-CD28	+	+	+	+
PRL	-	+	-	+
Linfocitos T _e	+	+	+	+
Linfocitos T _{reg}	-	-	+	+

Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C durante 120h con 5% CO₂. 18 hrs antes de cosechar el cultivo, las células se marcaron con 1 µCi de [Td-³H] (Amersham Pharmacia Biotech, UK) por pozo y se cosecharon en un cosechador múltiple (Cell Harvester, Brandel M-24R, USA) en papel filtro (Whatman, England). El papel se colocó en viales con 3 mL con líquido de centello (EcoLumen ICN, USA). La proliferación celular se determinó por incorporación de timidina tritiada leyéndose en un contador de radiación beta (Packard 1900 TR).

Extracción de RNA:

A partir de 5X10⁵ linfocitos T_{reg} o T_e, se extrajo el RNAm. Se adicionó 1 mL de Trizol (Isotiocianato de guanidina/fenol (Invitrogen), después de 5 min de incubación a 4 °C se adicionaron 220 µL de cloroformo, se incubó durante 5 min a 4°C y se centrifugó por 15 min a 11000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio, se adicionaron 500 µL de isopropanol, se homogenizó y se dejó reposar toda la noche a -40°C. Posteriormente 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 eliminó el exceso de etanol, se resuspendió en agua libre de RNAsas (1:50) y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro GeneQuantPro (Amersham Pharmacia Biotech, UK)

RT-PCR

A 1 µg de RNA se le adicionó 0.5 µg de Oligo dT (Invitrogen, USA) y agua inyectable hasta completar un volumen final de 11 µL. Esta mezcla se colocó en un termociclador durante 5 min a 65 °C. Posteriormente se adicionaron 9 µL de la mezcla de reacción [5µL de amortiguador 5X, 1 µL de dNTP (10 mM), 2 µL de DTT (0.1M)] y 1 µL de enzima Superscript II (200 U/µL). La mezcla se incubó 60 min a 50°C, 15 min a 70°C y por último se mantuvieron 4 °C a fin de obtener cDNA.

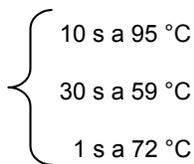
PCR Tiempo Real

Se utilizó el kit de detección LightCycler® TaqMan® Master para identificar y cuantificar secuencias de cDNA con las sondas de detección apropiadas (PRLR, sonda No.8 y 64 para β actina del “Universal Probe Library, Roche, Alemania).

Los iniciadores que se utilizaron fueron:

- PRL-R humano (5' a 3') CTT TCC ACA TGA ACC CTG AAG
- PRL-R humano (3' a 5') GCA GAT GCC ACA TTT TCC TT
- β actina (5' a 3') CCA ACC GCG AGAAGATGA
- β actina (3' a 5') CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG

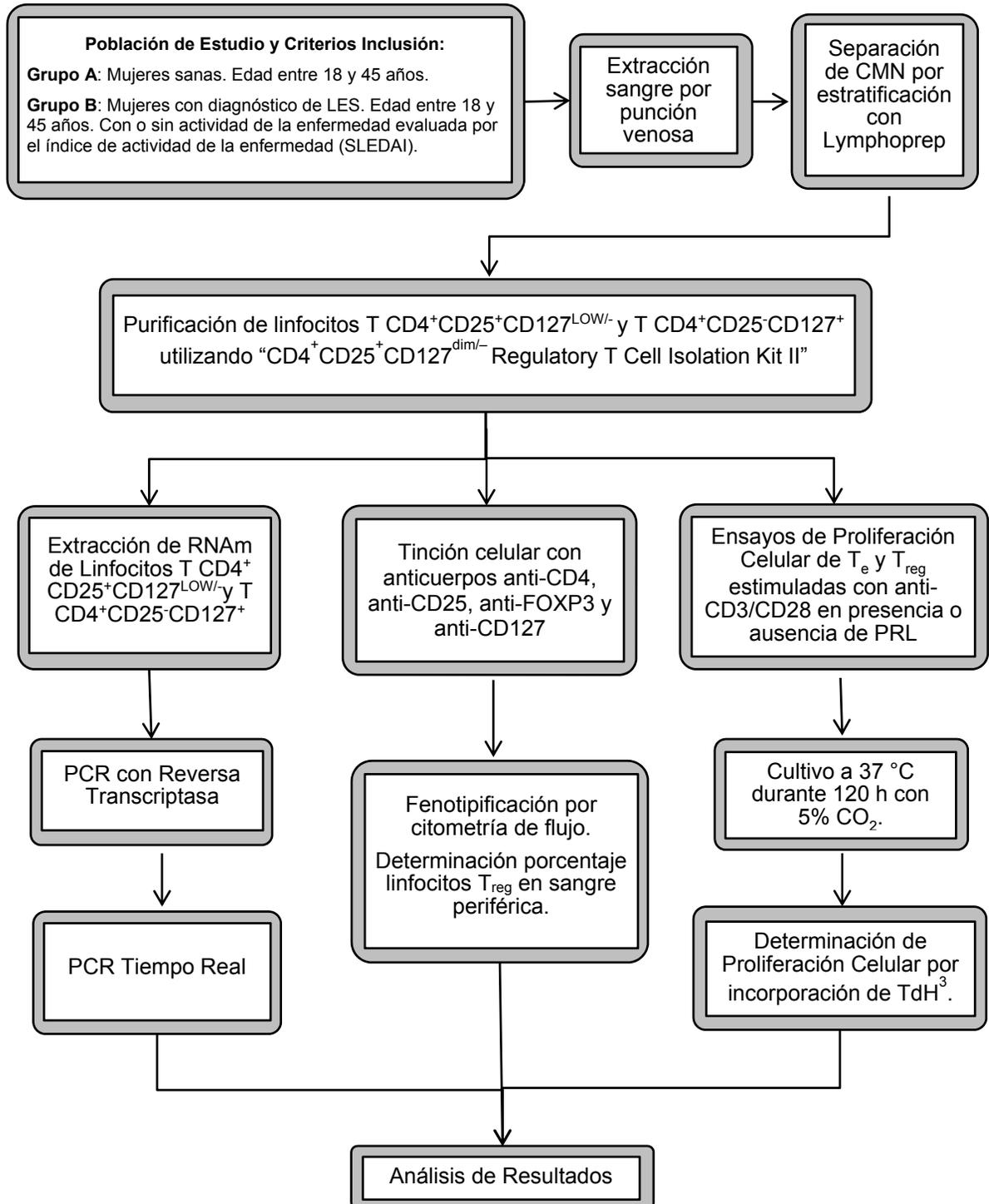
El protocolo de detección fue el siguiente:

- Pre incubación de 10 min. a 95 °C
 - Amplificación
 - Enfriamiento 30 s a 40 °C
- 
- 10 s a 95 °C
 - 30 s a 59 °C
 - 1 s a 72 °C

Análisis Estadístico

Los resultados se describieron de acuerdo a la distribución de los datos (media y desviación estándar). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante la prueba de t de Student. Las diferencias entre grupos se determinaron utilizando la prueba de ANOVA. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$, el análisis estadístico de los datos se realizó con el programa de computo SPSS15 (Chicago, IL, USA). El poder de la prueba estadística ($1 - \beta$) se determinó con la fórmula de Pagano.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Caracterización Fenotípica y Funcional de los Linfocitos T_{reg}

El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ purificados a partir de CMN, por selección negativa, fue superior al 90% (figura 5a). La figura 5b muestra la distribución de los linfocitos T (CD4/CD25) purificados, previo a la separación con perlas magnéticas anti-CD25.

A partir de los linfocitos T CD4⁺ se purificaron los linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻CD127⁺, obteniendo porcentajes mayores del 90% para ambas poblaciones (figura 5c). Los fenotipos determinados para las dos poblaciones de linfocitos T fueron: CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-} y CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻CD127⁺ (figura 5d).

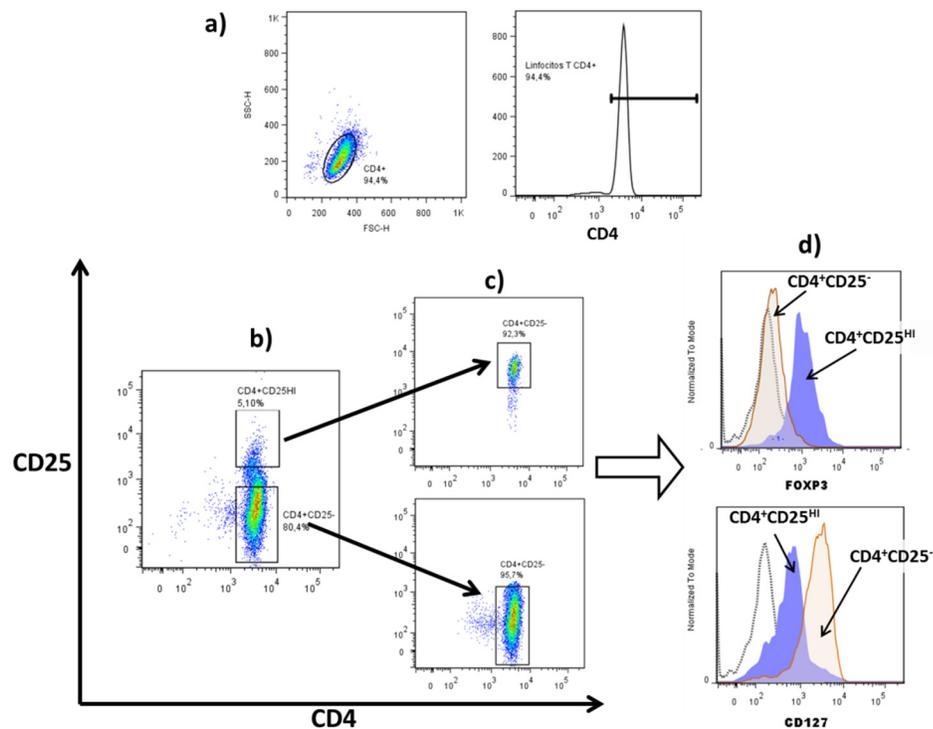


Figura 5. Purificación y caracterización fenotípica de linfocitos T CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-} y T CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻CD127⁺. a,b) A partir de células mononucleares se purificaron por selección negativa los linfocitos TCD4⁺ y las células se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25. c) Purificación de los linfocitos T CD4⁺CD25^{HI} y los linfocitos T CD4⁺CD25⁻ por separación con perlas magnéticas anti-CD25, se tomó una muestra de ambas poblaciones, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25. d) Se complementó el fenotipo de ambas poblaciones celulares marcando con anticuerpos anti-FOXP3 y anti-CD127 por separado. Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo BD FACSAria™ II y se analizaron con el programa FlowJo 7.5.

Una vez clasificadas fenotípicamente las subpoblaciones celulares de estudio, determinamos su capacidad funcional *in vitro*, para lo cual se realizaron ensayos de proliferación celular. Los linfocitos T CD4⁺CD25⁻CD127⁺ proliferan en respuesta al estímulo con anticuerpos anti-CD3/CD28 (figura 6). La función supresora mediada por los linfocitos T CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LOW/-} puede observarse claramente en el co-cultivo de linfocitos T CD4⁺CD25⁻CD127⁺:T CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LOW/-} (T_{reg}:T_e), donde se obtuvo una inhibición del 31.9 % en la proliferación celular de los linfocitos T_e (figura 6), lo cual fue estadísticamente significativo (p<0.05).

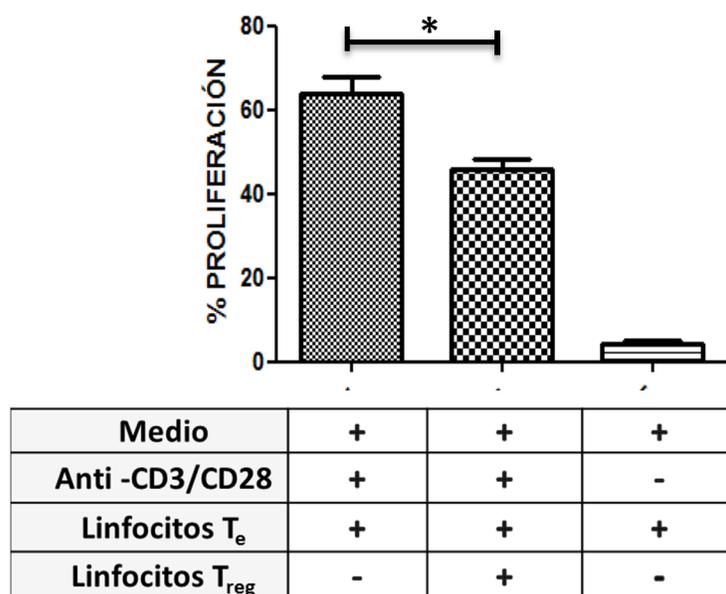


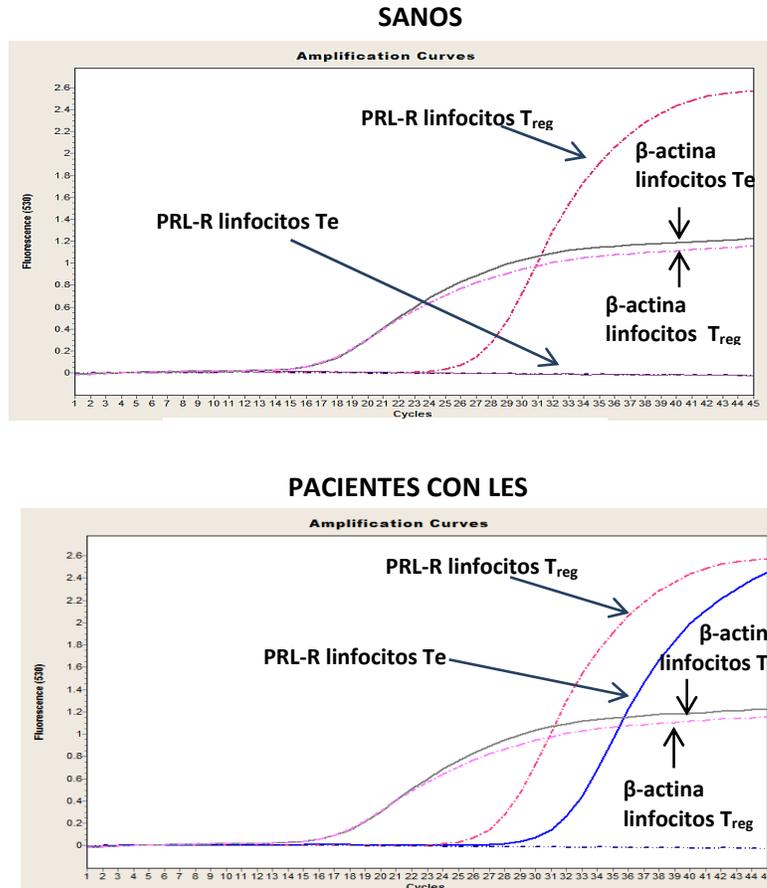
Figura 6. Capacidad funcional de linfocitos T_{reg} *in vitro*. Los linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-} y T_e CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻CD127⁺ fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 [2.5 µg/mL] y anti-CD28 [2 µg/mL] y se co-cultivaron. La proliferación celular se evaluó por incorporación de Timidina tritiada [TdH³] a las 120 horas de cultivo y se determinó su porcentaje de proliferación. La grafica muestra la media ± error estándar de ensayos independientes de proliferación celular de cinco individuos sanos, cada uno realizados por triplicado. ANOVA *p<0.05.

Expresión del RNAm del receptor de prolactina en los linfocitos T_{reg} y T_e provenientes de individuos sanos y pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico

Ya caracterizadas fenotípica y funcionalmente nuestras subpoblaciones celulares de estudio, se determinó la expresión del RNAm del PRL-R en los linfocitos T_{reg} y T_e provenientes de individuos sanos y pacientes con LES.

Los linfocitos T_{reg} de individuos sanos expresan de manera constitutiva el RNAm del PRL mensajero (media de expresión relativa de 2.049), a diferencia de los linfocitos T_e que no lo expresan. En contraste, al comparar la expresión del mensajero del PRL-R en linfocitos T_{reg} y T_e provenientes de pacientes con LES encontramos que ambas estirpes celulares expresan de manera constitutiva el mensajero del PRL-R, con valores de expresión relativa media de 32.617 para linfocitos T_e y 67.597 para linfocitos T_{reg}. Se encontró una mayor expresión del mensajero en pacientes con LES con respecto a los individuos sanos, tanto en los linfocitos T_e como en los linfocitos T_{reg}, siendo ésta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (figura 7b).

a)



b)

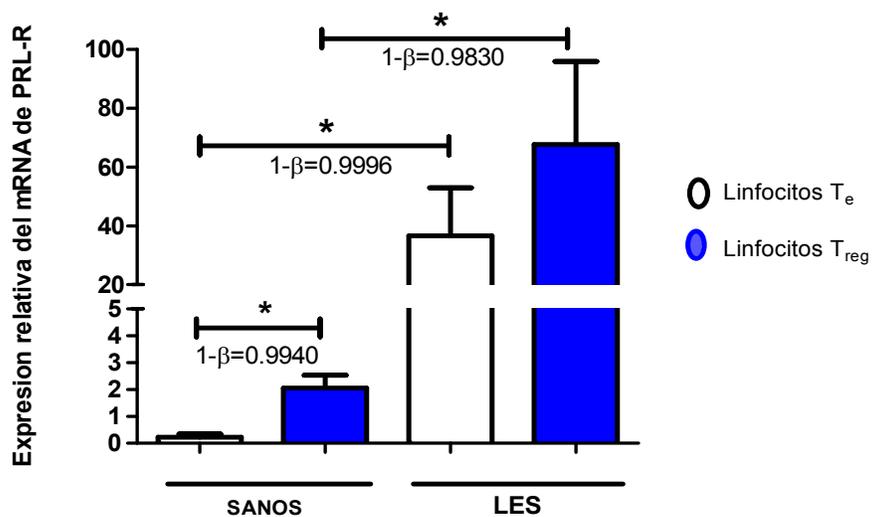


Figura 7. Expresión de RNAm del PRL-R en linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}) y Te (CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻CD127⁺). a) Curvas de amplificación obtenidas con el programa Light Cycler 4.0 para β-actina (control) y para el RNAm del PRL-R en linfocitos T_{reg} y T_e provenientes de individuos sanos (gráfica superior) y de pacientes con LES (gráfica inferior), se graficaron la intensidad de fluorescencia contra los ciclos de amplificación. b) Media ± error estándar de la expresión relativa del RNAm del PRL-R entre los linfocitos T_e y T_{reg} provenientes de individuos sanos y pacientes con LES. *p<0.05. 1-β= Poder de la prueba estadística.

Porcentaje y funcionalidad de los linfocitos T_{reg} provenientes de individuos sanos y pacientes con LES

Con el fin de determinar si el número de linfocitos T_{reg} podría estar afectado en pacientes con LES, se comparó el porcentaje de linfocitos T_{reg} (CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}) en sangre periférica entre individuos sanos y pacientes con LES. El porcentaje medio de linfocitos T_{reg} obtenido en pacientes con LES fue del 1.7%, lo cual se encuentra disminuido respecto a los individuos sanos cuyo valor fue 2.7% (figura 8). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

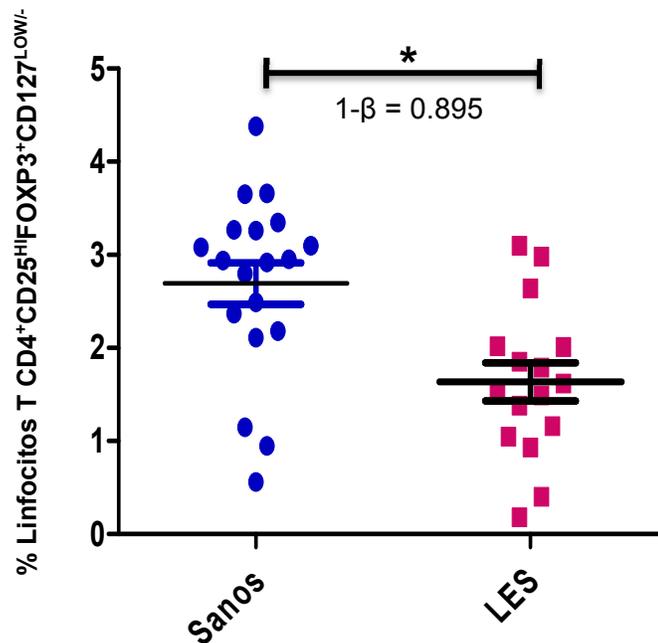


Figura 8. Porcentaje de linfocitos T_{reg} en sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso sistémico e individuos sanos. Las células mononucleares de pacientes con LES e individuos sanos se marcaron con anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127 y anti-FOXP3 para determinar por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}. La gráfica muestra la media ± error estándar. * $p < 0.05$. $1-\beta$ = Poder de la prueba estadística. Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo BD FACSAria™ II y se analizaron con el programa FlowJo 7.5.

Finalmente se evaluó si la función supresora de los linfocitos T_{reg} podría estar afectada en pacientes con LES. En los ensayos de individuos sanos observamos que los linfocitos T_{reg} inducen una inhibición del 55.6 % en la proliferación de los linfocitos T_e cuando se encuentran en co-cultivo, esta inhibición tuvo significancia estadística ($p < 0.05$), lo que concuerda con la función supresora esperada. Interesantemente al adicionar PRL a este co-cultivo, los linfocitos T_e recuperaron su capacidad proliferativa respecto al co-cultivo sin PRL, obteniéndose una inhibición de la proliferación de los linfocitos T_e de solo el 3.5 %, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Es decir, en presencia de PRL se abroga el efecto supresor mediado por los linfocitos T_{reg} (figura 9a).

En contraste, en el caso de los ensayos de pacientes con LES, si bien hay una tendencia de comportamiento similar al grupo control, la función supresora de los linfocitos T_{reg} en estos pacientes se encuentra disminuida con respecto a individuos sanos, ya que en el co-cultivo $T_{reg}:T_e$ hubo un porcentaje de inhibición en la proliferación de los linfocitos T_e de sólo 18.4% y no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar con los linfocitos T_e estimulados con anti-CD3/-CD28. Además, en el caso de los pacientes con LES encontramos que al adicionar la PRL se incrementa en un 89.4% la proliferación de los linfocitos T_e estimulados y en un 54.2% en co-cultivo con linfocitos T_{reg} , siendo ambas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (figura 9b).

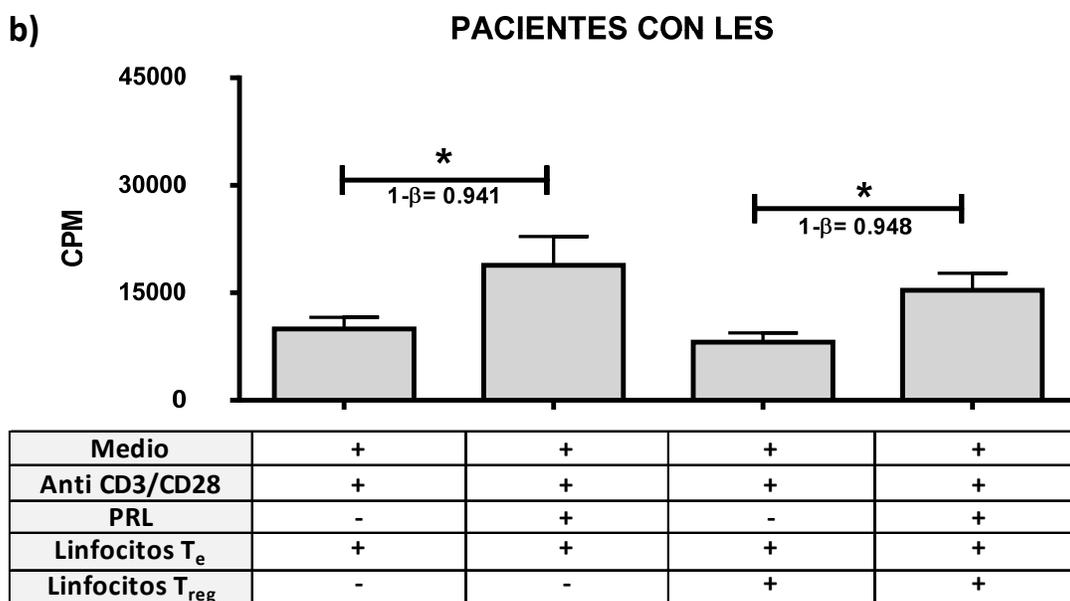
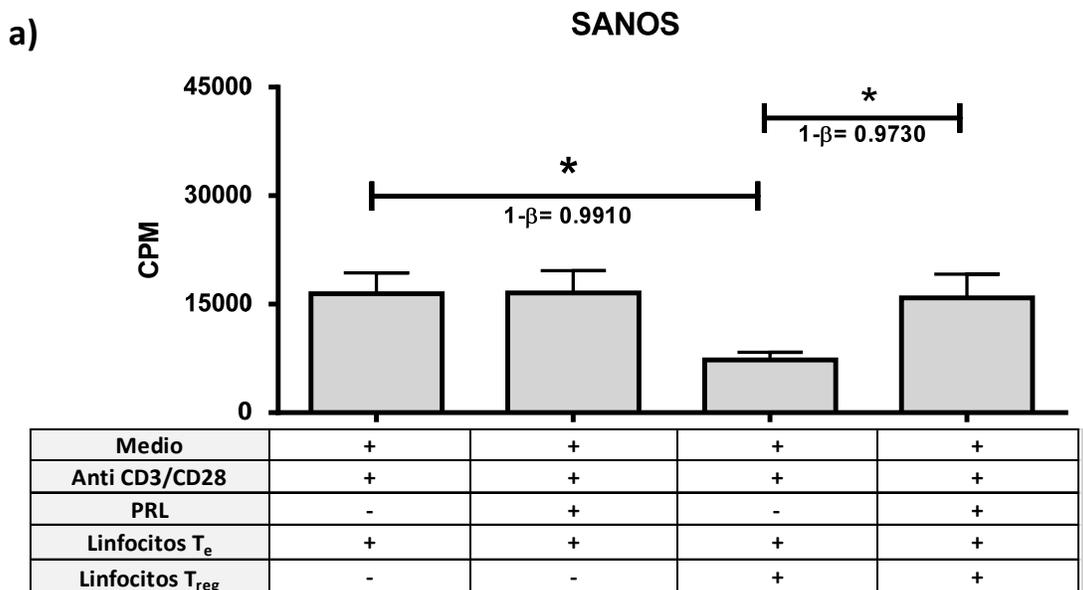


Figura 9. Ensayos de proliferación celular de linfocitos T_{reg} y T_e en presencia o ausencia de PRL. Los linfocitos T CD4⁺CD25^{HI}CD127^{LOW/-} (T_{reg}) y CD4⁺CD25⁻CD127⁺ (T_e) se co-cultivaron en presencia o ausencia de prolactina y estimulados con anticuerpos antiCD3 [2.5 µg/mL] y anti-CD28 [2 µg/mL]. La proliferación celular se evaluó a través de la incorporación de Timidina tritiada [TdH³] a las 120 horas de cultivo y se reportó como cuentas por minuto (cpm). Las gráficas muestran la media ± error estándar de los ensayos de proliferación celular independientes realizados cada uno por triplicado: a) ensayos independientes de ocho individuos sanos; b) ensayos independientes de quince pacientes con LES. *p<0.05. 1-β= Poder de la prueba estadística.

DISCUSIÓN

En este estudio demostramos que los linfocitos T_{reg} provenientes de individuos sanos expresan constitutivamente el RNAm del PRL-R, a diferencia de los linfocitos T_e que no lo expresaron. En contraste, ambas sub poblaciones celulares (linfocitos T_e y T_{reg}) provenientes de pacientes con LES expresaron constitutivamente dicho mensajero, lo que muestra por un lado la distribución del PRL-R en estas células del sistema inmune y por otro lado sugiere que la PRL podría estar participando en la desregulación de la respuesta inmune de los pacientes con LES, probablemente mediante la modulación de la función de los linfocitos T_e o de la actividad supresora de los linfocitos T_{reg} .

Encontramos que el porcentaje de linfocitos T_{reg} $CD4^+CD25^{HI}FOXP3^+CD127^{LOW/-}$ en sangre periférica está disminuido en pacientes con LES respecto a los individuos sanos. Un estudio realizado por Crispin mostró que en los pacientes con lupus activos la frecuencia de T_{reg} $CD4^+CD25^{HI}$ se redujo significativamente, mientras que los linfocitos T cooperadores con fenotipo efector ($CD4^+CD69^+$) aumentaron [Crispin *et al.* 2003]. Miyara sugiere que el aumento de la apoptosis de linfocitos T_{reg} $CD4^+CD25^{HI}$, mediada por CD95, podría dar lugar a frecuencias reducidas de T_{reg} en LES activo [Miyara *et al.* 2005]. Estas posibilidades son consistentes con nuestro hallazgo de una disminución de la frecuencia de los linfocitos T_{reg} $CD4^+CD25^{HI}FOXP3^+CD127^{LOW/-}$ en pacientes con LES y podría explicar la desregulación relacionada con la patogénesis del LES.

Demostramos que la PRL afecta la regulación mediada por los linfocitos T_{reg} provenientes de individuos sanos en co-cultivo con linfocitos T_e . Esto puede sugerir que la PRL actúa sobre los linfocitos T_{reg} , que expresan constitutivamente el RNAm del PRL-R, inhibiendo alguno de sus mecanismos de supresión, ya sea dependiente de contacto como CTLA-4, o mediado por citocinas como TGF- β e IL-10. También podría ser que la PRL actúe sobre los linfocitos T_e induciendo resistencia a la regulación mediada por los linfocitos T_{reg} y dándoles la cualidad de mantener su capacidad proliferativa aún en el co-cultivo, ya sea mediante la expresión de moléculas de co-estimulación o induciendo la producción de

citocinas [Legorreta-Haquet *et al.* 2012], de manera similar a lo demostrado en células mononucleares de sangre periférica [Chávez-Rueda *et al.* 2005]. Por otro lado, estos resultados ayudarían a explicar el efecto sobre la función de los linfocitos T_{reg} en condiciones de hiperprolactinemia como en el LES, donde niveles séricos de PRL altos se han correlacionado con la actividad de la enfermedad [Blanco *et al.* 1999].

En pacientes con LES se encontró que la actividad supresora de los linfocitos T_{reg} está disminuida en comparación con individuos sanos, y que la PRL aumentó la proliferación de los linfocitos T_e. Se sabe que la PRL promueve la proliferación de los linfocitos T [Chávez-Rueda *et al.* 2005, Carreño *et al.* 2005] y podría estar participando en el aumento de la proliferación de los linfocitos T_e observado en pacientes con LES. La función de los linfocitos T_{reg} en el LES ha sido evaluado por varios grupos y la mayoría de los estudios han demostrado un defecto en su actividad supresora, principalmente basado en la medida de la proliferación de los linfocitos T_e [Venigalla *et al.* 2008, Alvarado-Sánchez *et al.* 2006, Valencia X. *et al.* 2007]. Los defectos se han atribuido a la función de los linfocitos T_{reg} y a la resistencia a la supresión de los linfocitos T_e. Como defectos intrínsecos de los linfocitos T_{reg} se han ligado a una mayor sensibilidad de estas células a la muerte celular mediada por el receptor de muerte CD95 y a una disminución de la expresión de FOXP3 en LES debido a la falta relativa de IL-2 [Valencia X. *et al.* 2007]. Por otro lado, dos estudios realizados han demostrado la resistencia de los linfocitos T_e a la supresión en el LES más que una función reguladora anormal de los linfocitos T_{reg}. Venigalla observó resistencia a la supresión en pacientes con LES activo [Venigalla *et al.* 2008], mientras que Vargas-Rojas encontró resistencia de linfocitos T_e en LES independientemente de la actividad de la enfermedad [Vargas-Rojas *et al.* 2008]. Además el LES se caracteriza por la inflamación sistémica con la inducción de altos niveles de citocinas pro-inflamatorias [Wong *et al.* 2000], las cuales pueden de alguna manera favorecer la resistencia de los linfocitos T_e a la supresión mediada por los linfocitos T_{reg}, tal y como se observa en nuestros resultados. En diversos estudios con ensayos de supresión se ha reportado una abrogación de la función de los linfocitos T_{reg} en presencia de

citocinas pro inflamatorias como IL-18 [O'Sullivan *et ál* 2006.], TNF- α [Legorreta-Haquet *et al.* 2012, Valencia *et al.* 2006], IL-6 [Wan *et al.* 2007], e IL-12 [King *et al.* 2005], las cuales podrían ser producidas por los linfocitos T_e y actuar de forma autócrina [Venigalla R. K. *et al.* 2008]. La consistencia en estos hallazgos indica que la disminución de la función de los linfocitos T_{reg} y la resistencia a la supresión de los linfocitos T_e son factores probables de la pérdida de tolerancia en LES y la PRL podría estar participando directamente en estos eventos.

CONCLUSIONES

1. La expresión del RNAm del PRL-R es constitutiva en los linfocitos T_{reg} de individuos sanos.
2. El RNAm del PRL-R se expresa constitutivamente en los linfocitos T_{reg} y T_e provenientes de pacientes con LES.
3. La PRL inhibe *in vitro* la función supresora mediada por linfocitos T_{reg} de individuos sanos.
4. El porcentaje de linfocitos T_{reg} CD4⁺CD25^{HI}FOXP3⁺CD127^{LOW/-} en sangre periférica se encontró disminuido en pacientes con LES, respecto a individuos sanos.
5. La función supresora de los linfocitos T_{reg} *in vitro* se encuentra disminuida en pacientes con LES, respecto a individuos sanos.

PERSPECTIVAS

Estudiar los mecanismos de acción de la PRL sobre la función de los linfocitos T_{reg} y de los linfocitos T_e , a fin de entender su participación en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, que además se han asociado con estados de hiperprolactinemia, como en el LES.

En pacientes con LES se encontró una disminución en el número y función reguladora de los linfocitos T_{reg} , por lo que sería importante estudiar los mecanismos de regulación que están actuando en dichos fenómenos para determinar si se debe a defectos intrínsecos de los linfocitos T_{reg} o resistencia de los T_e a la supresión, y de esta manera entender el papel que desempeñan los linfocitos T_{reg} y T_e , aunado a la participación de la PRL, en la patogénesis del LES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. and Pober J. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B: Saunders Company. 7 th ed. Philadelphia, Pennsylvania **2012**.
2. Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME. *Etiopatogenia. Lupus eritematoso sistémico. In Tratado hispanoamericano de reumatología*. Colombia **2006**.
3. Ali S., Pellegrini I., Kelly P.A. A prolactin dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266: 20110–20117.
4. Alvarado Sanchez B., Hernández C.B., Portales P. D., Baranda L., Layseca E.E., Abud M. C., Cubillas A.C., González A.R. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity* **2006**, 27: 110–118.
5. Alvarez-Nemegyei J., Cobarrubias-Cobos A., Escalante-Triay F., Sosa-Munoz J., Miranda J.M., Jara L.J.. Bromocriptine in systemic lupus erythematosus: a doubleblind, randomized, placebo-controlled study. *Lupus* **1998**, 7:414–9.
6. American College of Rheumatology Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0041704/>. (acceso 11 noviembre 2012). 1997 Update of the 1982 American College of Rheumatology revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus
7. Baecher Allan C. and Hafler D. A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunological Reviews* **2006**, 212: 203–216.
8. Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology* **2007**, 7: 875–888.
9. Ben Ahmed M. *et al.* IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of Immunology* **2009**, 182: 6763–6770.
10. Ben Jonathan N., LaPensee C.R., Lapensee E.W. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Reviews* **2008**, 29: 1-41.
11. Berlanga J.J. Gualillo O., Buteau H., Applanat M., Kelly P.A., Edery M. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and

- phosphatidylinositol-3-OH kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272: 2050–2052.
12. Bertias G., Cervera R., Dimitrios T Boumpas. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. http://www.eular.org/myUploadData/files/sample%20chapter20_mod%2017.pdf (acceso 15 enero 2013) EULAR Textbook on Rheumatic Diseases.
 13. Berwaer M., Martial J.A., Davis J.R. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Journal of Molecular Endocrinology* **1994**, 8: 635–642.
 14. Berwaer M., Monget P., Peers B., Mathy-Hartert M., Bellefroid E., Davis J.R., Belayew A., Martial J.A. Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5000 bp of its upstream sequence. *Molecular and Cellular Endocrinology* **1991**, 80: 53–64.
 15. Blanco F., Quintal G., Leños A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. *The Journal of Rheumatology* **1999**, 26:55-59.
 16. Blank M., Krause I., Buskila D., Teitelbaum D., Kopolovic J., Afek A., *et al.* Bromocriptine immunomodulation of experimental SLE and primary antiphospholipid syndrome via induction of nonspecific T suppressor cells. *Cellular Immunology* **1995**, 162: 114–22.
 17. Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* **1998**, 19:225–68.
 18. Bolyakov A., Paduch D.A. Prolactin in men's health and disease. *Current Opinion in Urology* **2011**, 21:527–34.
 19. Boutin J.M., Edery M., Shiota M., *et al.* Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* **1989**, 3:1455–1461.
 20. Brockman, J.L. Schroeder M.D., Schuler L.A. PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. *Molecular Endocrinology* **2002**, 16: 774–784.

21. Buskila D., Berezin M., Gur H., Lin H.C., Alosachie I., Terryberry J.W., Barka N., Shen B., Peter J.B., Shoenfeld Y. Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. *Journal of Autoimmunity* **1995**, 8: 415-24.
22. Carreño P.C., Sacodon R., Jimenez E., Vicente A. and Zapata A.G. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *Journal of Neuroimmunology* **2005**, 160 135–145.
23. Cesario T.C., Yousefi S., Carandang G., Sadati N., Le J., Vaziri N. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. *Society for Experimental Biology and Medicine* **1994**, 205:89–95.
24. Cejkova P, Fojtikova M, Cerna M. Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmunity Reviews* **2009**, 9:23–7.
25. Cervera R., Khamashta M.A., Font J., Sebastiani G.D., Gil A., Lavilla P., Doménech I. Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and Immunologic Patterns of Disease Expression in a cohort of 1000 Patients. *Medicine* **1993**, 72:113-124.
26. Charles V. Clevenger, Samantha L. Gadd and Jiamao Zheng. New mechanisms for PRLr action in breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2009**, 20: 223–229.
27. Chavez-Rueda K., Legorreta Haquet M.V., Cervera C.H., Sánchez L., Jara L.J., Zenteno E., Blanco-Favela F. Prolactine effect on CD69 and CD154 expression by CD4+ cells from lupus erithematosus patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* **2005a**, 23:769-777.
28. Chavez-Rueda K., Hernández J., Zenteno E., Leaños M., Legorreta Haquet M.V., Blanco-Favela F. 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* **2005b**, 116: 182–191.
29. Chikanza I.C. Prolactin and neuroimmunomodulation: *in vitro* and *in vivo* observations. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1999**, 876:119–30.

30. Choi B.K., Bae J.S., Choi E.M., Kang W.J., Sakaguchi S., Vinay D.S., Kwon B.S. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *Journal of Leukocyte Biology* **2004**, 75: 785–791.
31. Clevenger C.V., Furth P.A., Hankinson S.E., Schuler L.A. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocrine Reviews* **2003**, 24: 1–27.
32. Clevenger C.V. Role of Stat family transcription factors in human breast cancer. *American Journal of Pathology* **2004**, 165, 1449–1460.
33. Clough L.E., Wang C.J., Schmidt E.M., Booth G., Hou T.Z., Ryan G.A., Walker L.S. Release from regulatory T cell mediated suppression during the onset of tissue specific autoimmunity is associated with elevated IL-21. *The Journal of Immunology* **2008**, 180: 5393–5401.
34. Colao A., Savastano S. Medical treatment of prolactinomas. *Nature Reviews Endocrinology* **2011**, 7:267–78.
35. Cooke N.E., Coit D., Shine J., Baxter J.D., Martial J.A. Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256: 4007–4016.
36. Crispin J.C., Martinez A. & Alcocer V.J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity* **2003**, 21: 273–276.
37. d’Hennezel, E., Ben-Shoshan M., Ochs H.D., Torgerson T.R., Russell L.J., Lejtenyi C., Noya F.J., Jabado N., Mazer B., Piccirillo C.A. FOXP3 forkhead domain mutation and regulatory T cells in the IPEX syndrome. *The New England Journal of Medicine* **2009**, 361: 1710–1713.
38. Davis J.A., Linzer D.I. Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Molecular Endocrinology* **1989**, 3: 674–680.
39. Ehrenstein M. R. Jamie G. E., Animesh S., Samantha M., Gary W., David A. I., Claudia M. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *The Journal of Experimental Medicine* **2004**, 277–285.
40. Fang F., Antico G., Zheng J., Clevenger C.V. Quantification of PRL/Stat5 signaling with a novel pGL4-CISH reporter. *BMC Biotechnology* **2008**, 8: 1–11.

41. Freeman M., Kanycska B., Lerant A., Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiology Reviews* **2000**, 80:1523-1587.
42. Gadd S. and Clevenger C.V. Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor: functional implications. *Molecular Endocrinology* **2006**, 20: 2734–2746.
43. García J., Molina C. Lupus eritematoso sistémico. <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/9-LES.pdf> (acceso enero 15 2013). Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría.
44. Gerli R., Nocentini G., Alunno A., Bocci E.B., Bianchini R., Bistoni O., Riccardi C. Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews* **2009**, 8: 426–430.
45. Gerlo S., Verdood P., Hooghe-Peters E.L., Kooijman R. Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines. *Journal of Neuroimmunology* **2005**, 162:190–3.
46. Goffin V., Binart N., Touraine P., Kelly P.A. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annuals Review of Physiology* **2002**, 64: 47–67.
47. Gómez-Puerta J.A, Ricard Cervera. Lupus eritematoso sistémico. *Medicina & Laboratorio* **2008**, 14: 211-223
48. Groux H., Bigler M., de Vries J.E., Roncarolo M.G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* **1996**, 184: 19–29.
49. Haghghi A., Lahmi F. Hyperprolactinemia in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Journal of Rheumatology* **2006**, 9: 227–231.
50. Hartmann D.P, Holaday J.W., Bernton E.W. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *The FASEB Journal* **1989**, 3:2194–202.
51. Hoffman A.R., Melmed S., Schlechte J. Patient guide to hyperprolactinemia diagnosis and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2011**, 96:35A–6A.
52. Horwitz, D. A. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Research & Therapy* **2008**, 10: 227.

53. Hu Z.Z., Meng J., Dufau M.L. Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276: 41086–41094.
54. Ishibashi M., Kuzuya N., Sawada S., Kitamura K., Kamoi K, Yamaji T. Anti-thyroid antibodies in patients with hyperprolactinemia. *Endocrinologia Japonica* **1991**, 38: 517-22.
55. Jane H.B. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology* **2010** 12:849-59.
56. Janson P.C. Winerdal M. E., Marits P., Thörn M., Ohlsson R., Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *Plos One* **2008**, 3: e1612.
57. Jara L.J., Benitez G., Medina G. Prolactin, dendritic cells, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews* **2008**, 7:251–5.
58. Jara L.J., Irigoyen L., Ortiz M.J., Zazueta B., Bravo G., Espinoza L.R. Prolactin and interleukin-6 in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology* **1998**, 17:110–4.
59. Jara L.J., Medina G., Saavedra M.A., Vera-Lastra O., Navarro C.. Prolactin and autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **2011**, 40:50–9.
60. Jiang, H. & Chess, L. Regulation of immune responses by T cells. *New England Journal of Medicine* **2006**, 354: 1166–1176.
61. King I.L. & Segal B.M. Cutting edge: IL-12 induces CD4+CD25– T cell activation in the presence of T regulatory cells. *The Journal of Immunology* **2005**, 175: 641–645.
62. Kline J.B., Clevenger C.V. Identification and characterization of the prolactin-binding protein (PRLBP) in human serum and milk. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276: 24760–24766.
63. Kline J.B., Roehrs H., Clevenger C.V. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274: 35461– 35468.

64. Korn T., Reddy J., Gao W., Bettelli E., Awasthi A., Petersen T.R., Bäckström B.T., Sobel R.A., Wucherpfennig K.W., Strom T.B., Oukka M., Kuchroo V.K. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature Medicine* **2007**, 13: 423–431.
65. Kostrzak A., Meczekalski B. Macroprolactinaemia. *Polski Merkurusz Lekarski* **2010**, 29: 47–9.
66. Lee J.H., Wang L.C., Lin Y.T., Yang Y.H., Lin D.T., Chiang B.L. Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* **2006**, 117: 280–286.
67. Legorreta-Haquet M V, K. Chávez-Rueda, E. Montoya-Díaz, L. Arriaga-Pizano, R. Silva-García, L. Chávez-Sánchez, M. Moreno-Lafont, E. Zenteno-Galindo, F. Blanco-Favela. Prolactin down-regulates CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/-} regulatory T cell function in humans. *Journal of Molecular Endocrinology* **2012**, 48:77-85.
68. Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., Roep B.O., Peakman M., Tree T.I. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **2005**, 54: 92–99.
69. Liu M.F., Wang C.R., Fung L.L., Wu C.R. Decreased CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* **2004**, 59: 198–202.
70. Mann W.A. Treatment for prolactinomas and hyperprolactinaemia: a lifetime approach. *European Journal of Clinical Investigation* **2011**;41:334–42.
71. Matera L, Galetto A, Geuna M, Vekemans K, Ricotti E, Contarini M, *et al.* Individual and combined effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prolactin on maturation of dendritic cells from blood monocytes under serum-free conditions. *Immunology* **2000**, 100:29–36.
72. Matera L, Mori M, Galetto A. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus* **2001**, 10:728-34.
73. McMurray R., Keisler D., Kanuckel K., Izui S., Walker S.E. Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse. *The Journal of Immunology* **1991**, 147: 3780–7.

74. McMurray R.W., Weidensaul D., Allen S.H., Walker S.E. Efficacy of bromocriptine in an open label therapeutic trial for systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* **1995**, 22:2084–91.
75. Mellor-Pita S. *et al.* Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2006**, 65: 553–554.
76. Miller S.L., DeMaria J.E., Freier D.O., Riegel A.M., Clevenger C.V. Novel association of Vav2 and Nek3 modulates signaling through the human prolactin receptor. *Molecular Endocrinology* **2004**, 19: 939–949 13.
77. Miller S.L., Antico G., Raghunath P.N., Tomaszewski J.E., Clevenger C.V. Nek3 kinase regulates prolactin-mediated cytoskeletal reorganization and motility of breast cancer cells. *Oncogene* **2007**, 26: 4668–4678.
78. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochov G., Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **2009**, 30: 899–911.
79. Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C., Dorgham K., Trad S., Nochy D., Debré P., Piette J.C., Gorochov G. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* **2005**, 175: 8392–8400.
80. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology* **2003**, 56:481–90.
81. Montgomery D.W., Zukoski C.F., Shah G.N., Buckley A.R., Pacholczyk T., Russell D.H. Concanavalin A–stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin–like bioactivity and immunoreactivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, 145:692–8.
82. Moreno J., Varas A., Vicente A., Zapata A.G. Role of prolactin in the recovered T-cell development of early partially decapitated chicken embryo. *Clinical and Developmental Immunology* **1998**, 5:183–95.
83. Murphy K., Travers P. Walport M. *Inmunobiología de Janeway*. Séptima Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. **2009**.

84. Nadine Binart, Anne Bachelot and Justine Bouilly. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2010**, 21: 362–368.
85. Nagy E., Berci I. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinology*. **1978**, 89:530-537.
86. Nagy E., Berci I., Wren G.E., Asa S.L., Kovaks K. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* **1983**, 6:231-243.
87. Nira Ben-Jonathan, Christopher R., and Elizabeth W. What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans? *Endocrine* **2008**, 29:1–41.
88. Nishikawa H. & Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer* **2010**, 127: 759–767.
89. Ochs H. D., Gambineri E. & Torgerson T.R. IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunologic Research* **2007**, 38: 112–121.
90. O'Sullivan B.J., Thomas H.E., Pai S., Santamaria P., Iwakura Y., Steptoe R.J., *et al.* IL-1 β breaks tolerance through expansion of CD25+ effector T cells. *The Journal of Immunology* **2006**, 176: 7278–87.
91. Orbach H., Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* **2007**, 6:537–42.
92. Orbach H., Zandman-Goddard G., Boaz M., Agmon-Levin N., Amital H., Szekanecz Z., *et al.* Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE Patients. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **2011**, 42:189-98.
93. Owerbach D., Rutter W.J., Cooke N.E., Martial J.A., Shows T.B. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* **1981**, 212: 815–816.
94. Peeva E., Zouali M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunology Letters* **2005**, 101:123–43.
95. Perks C.M., Keith A.J., Goodhew K.L., Savage P.B., Winters Z.E., Holly J.M. Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer* **2004**, 91: 305–311.

96. Rivero A., Garcia-Calvo A. Biochemical diagnosis of monomeric hyperprolactinemia. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **2011**, 34:145–52.
97. Rudensky A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews* **2011**, 241: 260–268.
98. Saha S., Gonzalez J., Rosenfeld G., Keiser H., Peeva E. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. *Arthritis & Rheumatology* **2009**, 60:1743–52.
99. Saha S., Tieng A., Pepeljugoski K.P., Zandamn-Goddard G., Peeva E. Prolactin, systemic lupus erythematosus, and autoreactive B cells: lessons learnt from murine models. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **2011**, 40:8–15.
100. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology* **1995**, 155: 1151–1164.
101. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. & Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **2008**, 133: 775–787.
102. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology* **2010**, 10:490–500.
103. Serri O., Chik C.L., Ur E., Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *Canadian Medical Association* **2003**, 169:575–81.
104. Shimon Sakaguchi, Makoto Miyara, Cristina M. Costantino and David A. Hafler. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology* **2010**, 10: 490-500.
105. Shlomchik, M. J., Madaio, M. P., Ni, D., Tronstein, M. & Huszar, D. The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* **1994**, 180: 1295–1306.
106. Sinha Y.N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews* **1995**, 16: 354–369.

107. Smith PE. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anatomical Record* **1930**, 47:119-129.
108. Suen J.L., Hsiao-Ting Li, Yuh-Jyh Jong, Bor-Luen Chiang, Jeng-Hsien Yen. Altered homeostasis of CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* **2009**, 127: 196–205.
109. Swaminathan G., Varghese B., Fuchs S.Y. Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **2008**, 13: 81–91.
110. Takeda I., Ine S., Killeen N., Ndhlovu L.C., Murata K., Satomi S., Sugamura K., Ishii N. Distinct roles for the OX40–OX40 ligand interaction in regulatory and non-regulatory T cells. *The Journal of Immunology* **2004**, 172: 3580–3589.
111. Thornton A.M., Donovan E.E., Piccirillo C.A., Shevach E.M.. Cutting edge: IL-2 is critically required for the *in vitro* activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *The Journal of Immunology* **2004**, 172: 6519–6523.
112. Thornton A.M., Korty P.E., Tran D.Q., Wohlfert E.A., Murray P.E., Belkaid Y., Shevach E.M. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *The Journal of Immunology* **2010**, 184: 3433–3441.
113. Trott J.F., Hovey R.C., Koduri S., Vonderhaar B.K. Multiple new isoforms of the human prolactin receptor gene. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2004**, 554: 495–499.
114. Truong A.T., Duez C., Belayew A., Renard A., Pictet R., Bell G.I., Martial J.A. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *The European Molecular Biology Organization Journal* **1984**, 3: 429–437.
115. Tsokos G.C. Mechanisms of disease: systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* **2011**, 365:2110–2121.
116. Valencia X., Yarboro C., Illei G., Lipsky P.E. Deficient CD4⁺CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* **2007**, 178: 2579–2588.

117. Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M., Lipsky P.E. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T regulatory cells. *Blood* **2006**, 108: 253–261.
118. Vargas-Rojas M.I., Crispín J.C., Richaud-Patin Y., Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* **2008**, 17: 289–294.
119. Venigalla R.K., Tretter T., Krienke S., Max R., Eckstein V., Blank N., Fiehn C., Ho A.D., Lorenz H.M. Reduced CD4+, CD25– T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+, CD25high, CD127–/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* **2008**, 58: 2120–2130.
120. Vera-Lastra O., Jara L.J., Espinoza L.R. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* **2002**, 1:360–4.
121. Vidaller A., Llorente L., Larrea F., Mendez J.P., Alcocer-Varela J., Alarcon-Segovia D. T-cell dysregulation in patients with hyperprolactinemia: effect of bromocriptine treatment. *Clinical Immunology and Immunopathology* **1986**, 38:337–43.
122. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine* **2004**, 199: 971–979.
123. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C. J. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* **2008**, 8: 523–532.
124. Walker S., Jacobson J. Neuroendocrine mechanisms in rheumatic diseases: Roles of prolactin and gonadotropin-releasing hormone in rheumatic diseases. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **2000**, 26: 713-36.
125. Walker S.E. Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2001**, 10:762–8.
126. Walker L. S. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology* **2009**, 126: 466–474.

127. Wan S., Xia C., Morel L. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4⁺CD25⁺ T cell regulatory functions. *The Journal of Immunology* **2007**, 178: 271–279.
128. Weiner H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor - β secreting Th3 regulatory cells. *Immunology Reviews* **2001**, 182: 207–214.
129. Weiping Z. & Nicholas P. Restifo. TH17 cells in tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* **2010**, 10: 248-256.
130. Wing K. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self-tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology* **2010**, 11: 7–13.
131. Wong C.K., Ho C.Y., Li E.K., Lam C.W. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **2000**, 9:589–93.
132. Yan B., Ye S., Chen G., Kuang M., Shen N., Chen S. Dysfunctional CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon- α -producing antigen-presenting cells. *Arthritis & Rheumatology* **2008**, 58: 801–812.
133. Yang J., Brook M.O., Carvalho-Gaspar M., Zhang J., Ramon H.E., Sayegh M.H., Wood K.J., Turka L.A., Jones N.D. Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **2007**, 104: 19954–19959.
134. Yates J., Rovis F., Mitchell P., Afzali B., Tsang J., Garin M., Lechler R.I., Lombardi G., Garden O.A. The maintenance of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *International Immunology* **2007**, 19: 785–799.
135. Yu-Lee L. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Progress in Hormone Research* **2002**, 57:435-55.
136. Zen M., Ghirardello A., Laccarino L. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Medical Weekly* **2010**, 140: 187 – 201.

137. Zhang R., Buczko E., Tsai-Morris C.H., Hu Z.Z., Dufau M.L. Isolation and characterization of two novel rat ovarian lactogen receptor cDNA species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1990**, 168:415–422.

ANEXO I: HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

Título del estudio:

“EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS T REGULADORES
(CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺CD127^{LOW/-})”

OBJETIVO:

- Determinar el efecto de la prolactina sobre la función reguladora de los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺CD127^{LOW/-}.

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 PARTICIPANTE _____ FIRMA _____ FECHA _____

NOMBRE TESTIGO _____ FIRMA _____ FECHA _____

ANEXO II: REACTIVOS

Medio AIM-V Enriquecido (GIBCO BRL) (100 mL)

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

PBS 10X PH 7,4

❖ NaCl	40,0 g
❖ K ₂ HPO ₄	12,2 g
❖ KH ₂ PO ₄	1,2 g
❖ Agua destilada	500 mL

PBS-BSA 10%

❖ BSA	5g
❖ PBS 1X	aforar a 50 mL

PBS-p-FORMALDEHÍDO 2%

❖ p-FORMALDEHÍDO	2 g
❖ PBS 1X	aforar 100 mL

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

Regulador MACS

❖ PBS 1X	47,3 mL
❖ BSA 10 %	2,5 mL
❖ EDTA 0.5 M	200 µL

Regulador FACS

❖ Suero fetal bovino	2 mL
❖ EDTA 0.5 M	1.6 mL
❖ Azida de Sodio 2.5%	1.6 mL
❖ PBS 1X	394.8 mL

SHEAT FLUID 10X

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